# Analyse von Benzothiazolen und Untersuchungen zu deren Auftreten und mikrobiellem Abbau in aquatischen Proben

von Diplom-Lebensmittelchemiker Achim Klöpfer

Fakultät III - Prozesswissenschaften -Technische Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften - Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender	Prof. Dr. Lothar W. Kroh
Gutachter	PD DrIng. Thorsten Reemtsma
Gutachter	Prof. DrIng. Martin Jekel
Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. Werner Engewald

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 6. September 2005

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2000 bis Februar 2005 innerhalb des BMBF-geförderten Forschungsprojektes *Weitergehende Entfernung organischer Stoffe aus kommunalen Abwässern und deren Eignung zur Grundwasseranreicherung* (Fkz 02WA0123) am Fachgebiet Wasserreinhaltung der TU Berlin, wo ich als Wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig war.

Für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen möchte ich Herrn Professor Jekel danken. Ich arbeitete in einem sehr produktiven, interdisziplinären Umfeld und ich möchte an dieser Stelle erwähnen, dass die gute Arbeitsatmosphäre, wie ich sie am Fachgebiet Wasserreinhaltung vorfand, den Mitarbeitern, vor allem aber dem "Chef", zu verdanken war.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Engewald für die Begutachtung der Arbeit und Herrn Professor Kroh für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Hervorheben möchte ich die herausragende Betreuung meiner Arbeit durch Herrn PD Thorsten Reemtsma. Ihm möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Trotz zahlreicher Termine und Aufgaben war er immer erreichbar für wissenschaftlichen Austausch und Diskussion. Durch seine motivierende und ausgeglichene Art hat das Arbeiten für und mit ihm stets Spaß gemacht.

Der netten Kollegen am Fachgebiet Wasserreinhaltung sind es leider zu viele, um alle namentlich aufzuführen. Es sei jedoch an dieser Stelle gesagt, dass ebendiese eine tolle Arbeitsatmosphäre schufen, in der die Wissenschaft in besonderer Weise vorangetrieben, aber auch der Kollegialität und einem guten Auskommen miteinander viel Beachtung geschenkt wurde.

Ich komme nicht umhin eine Mitarbeiterin des Fachgebiets hervorzuheben, mit der ich eng zusammenarbeitete. Ohne die Arbeitsfreude und den Tatendrang von Jutta Jakobs hätten die Arbeiten nicht in diesem Umfang und nicht mit dieser Qualität durchgeführt werden können. Liebe Jutta, vielen Dank für deine Unterstützung!

Abgesehen von Angehörigen des Fachgebietes, verdienen meine Freunde Thomas Krings und Jürgen Gruber Erwähnung. Aufregende Aktivitäten, spannende Diskussionen und entspannende gemeinsame Stunden mit ihnen entrissen mich in hervorragender Weise den alltäglichen "Diss"-Sorgen. Herzlichsten Dank möchte ich meiner Frau Antje sagen! Ihre Nerven beanspruchte ich gelegentlich arg. Sie entgegnete mir immer mit viel Verständnis und gab mir Kraft. Danke für Deine Unterstützung!

Berlin im September 2005

# Abstract

The presented thesis is the first extensive study on the occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate during biological treatment. Moreover street runoff, surface water and wastewater sludge were investigated. Samples were taken from municipal wastewater treatment plants in Ruhleben (Berlin, Germany) and GaoBeiDian (Beijing, China) and other locations in Berlin.

An analytical method for the quantitative determination of six benzothiazoles, among them benzothiazole-2-sulfonic acid (BTSA) and 2-methylthiobenzothiazole (MTBT), from complex aqueous samples was developed. The method consists of analyte enrichment by solid phase extraction (SPE) and analysis by high pressure liquid chromatography (HPLC) combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Detection limits of quantification in raw wastewater are in the range of 20-300 ng/L. *External sample calibration* is used to account for matrix effects and losses due to SPE. To minimize ionization suppression the flow into the ESI-source is reduced from 500  $\mu$ L/min to below 100  $\mu$ L/min by post-column splitting (PCS).

The mean total concentration of benzothiazoles in municipal wastewater is generally around the 3  $\mu$ g/L-range and exceeds in some instances 30  $\mu$ g/L. BTSA dominates the composition followed by BT and OHBT. Conventional activated sludge (CAS) treatment could remove ABT, BT, OHBT and MBT (elimination > 40 %), but elimination of BTSA and MTBT was poor (below 25 %) and in some cases an increase in concentration (BTSA: +20 %, MTBT: +160 %) in the CAS treatment process was observed. Even by sophisticated membrane bioreactor (MBR) treatment the elimination of benzothiazoles was insufficient. Due to the incomplete elimination of benzothiazoles (below 35 % in total) these substances are discharged by municipal treatment plant effluents into the aquatic environment where they exhibit considerable long lifetimes.

Emission sources for the release of benzothiazoles into municipal wastewater are largely unknown. Street runoff is shown to contain high concentrations of benzothiazoles (20-70 µg/L in total) but did not appear to be the decisive source for the occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater. Positive findings of benzothiazoles in sanitary wastewater from private households confirm that private households are sources of emission. Yet there is no information on benzothiazoles used in households or in consumables.

By investigating the microbial degradation of BT, OHBT and MBT by strains of *Rhodococcus* subspecies it could be demonstrated that their degradation follows the generally observed degradation pathway of aromatic compounds and prefers ortho-cleavage. Various metabolites from the degradation of BT, OHBT and MBT were identified using LC-ESI-MS/MS. However in samples of influent and effluent of a wastewater treatment plant these metabolites could not be detected.

The presented work shows for the first time that considerable amounts of benzothiazoles are released into the environment by municipal treatment plant effluents. Especially polar BTSA plays an important role as it bears the potential to migrate into ground water aquifers. Former investigations systematically underestimated aquatic contamination with benzothiazoles as they did not detect BTSA.

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die erste umfassende Untersuchung zum Auftreten und Verhalten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser und deren Elimination während der Abwasserbehandlung wiedergegeben. Außerdem wurden Straßenablauf, Oberflächenwasser und Klärschlamm untersucht. Die untersuchten Proben entstammen den kommunalen Kläranlagen in Ruhleben (Berlin) und in GaoBeiDian (Beijing, China) sowie weiteren Kompartimenten in Berlin.

Für die Untersuchungen wurde eine Analysenmethode für die quantitative Bestimmung von sechs Benzothiazolen, darunter Benzothiazol-2-sulfonsäure (BTSA) und 2-Methylthiobenzothiazol (MTBT), in wässrigen Proben mit komplexer Matrix ausgearbeitet. Die Methode umfasst eine Anreicherung der Analyte mittels Festphasenextraktion (SPE) und Analyse der Extrakte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), kombiniert mit Electrospray-Ionisierung-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS). Das Quantifizierungslimit der Benzothiazole in Rohabwasser liegt im Bereich von 20-300 ng/L. Wiederfindungsverluste während der SPE und Matrixeffekte werden durch Quantifizierung über *externe Kalibration in Probenmatrix* berücksichtigt. Matrixeffekte werden ferner durch Volumenreduktion des ESI-Flusses mittels *post-column splitting* (PCS) minimiert.

Die mittlere Gesamtkonzentration von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser liegt bei 3 µg/L, in Einzelfällen bei bis zu 30 µg/L. BTSA dominiert die Benzothiazolzusammensetzung, gefolgt von BT und OHBT. Die Elimination von ABT, BT, OHBT und MBT durch konventionelle Belebtschlammbehandlung (CAS) ist gut und beträgt über 40 %, doch die Entfernung von BTSA und MTBT ist schlecht (unter 25 %) bzw. deren Konzentration nimmt während der Abwasserbehandlung teilweise sogar zu (+20 % BTSA; +160 % MTBT). Auch bei der Abwasserbehandlung mit Membranbioreaktoren (MBR) blieb die Elimination unvollständig. Durch unvollständige Entfernung (weniger als 35 % Gesamtelimination) gelangen diese Stoffe über den Klarlauf in die Umwelt, wo sie eine beachtliche mikrobielle Stabilität aufweisen.

Die Emissionsquellen für den Eintrag der untersuchten Stoffe in kommunales Abwasser sind weitgehend unklar. In Straßenablauf wurden hohe Konzentrationen detektiert (Gesamtkonzentration 20-70 µg/L), doch scheint Straßenablauf nicht die primäre Quelle für das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser zu sein. Positive Benzothiazolbefunde in rein häuslichem Abwasser belegen die Emission von Benzothiazolen durch Privathaushalte, doch zur Verwendung von Benzothiazolen im Haushalt bzw. in Haushaltsprodukten liegen keine Informationen vor.

Durch Untersuchung des mikrobiellen Abbaus von BT, OHBT und MBT mit Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* konnte dargelegt werden, dass der Abbau dieser Benzothiazole dem allgemeinen Aromatenabbau unter ortho-Spaltung des Aromaten folgt. Verschiedene Metabolite des Abbaus von BT/OHBT und MBT wurden mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert. In Proben von Zu- und Ablauf einer Kläranlage konnten diese Metabolite jedoch nicht detektiert werden.

Zum ersten Mal wird gezeigt, dass bedeutende Mengen Benzothiazole mit Klarlauf kommunaler Kläranlagen in die Umwelt entlassen werden. Besonders das polare BTSA ist hierbei von Bedeutung, da es das Potential birgt in Grundwasserleiter zu migrieren. Frühere Untersuchungen haben BTSA nicht erfasst und unterschätzten die Benzothiazolbelastung systematisch.

# Inhaltsverzeichnis

Vo	orwort.		v
Ał	ostract		vii
Zι	ısamm	enfassung	ix
In	haltsve	erzeichnis	xi
Hä	aufig b	enutzte Abkürzungen	xv
		Allgemeine Abkürzungen Abkürzungen chemischer Substanzen	xv xvi
1		Hintergrund	1
		Polare gegenüber unpolaren Wasserkontaminanten Benzothiazole als Wasserkontaminanten	1 2
2		Zielsetzung	4
3		Grundlagen zur Stoffklasse der Benzothiazole	5
	3.1	Industrielle Anwendungsgebiete	5
	3.1.1	Obersiont	55 6
	3.2	Physikalische und chemische Figenschaften von Benzothiazolen	۰a
	3.2.1	Stabilität von Benzothiazolen	
	3.2.2	Polarität von Benzothiazolen	9
	3.3	Toxikologisches Potential von Benzothiazolen	12
	3.4	Analytische Techniken zur Analyse von Benzothiazolen in Umweltproben	13
	3.5	Auftreten von Benzothiazolen in der aquatischen Umwelt	14
	3.5.1	Industrielle Emissionen	15
	3.5.2	Kommunale Kläranlagen	15
	3.5.3	Eintrag in die Umwelt durch Reifenabrieb bzw. Straßenablauf	
	3.5.4	Autreten von Benzounazoien in Obernachengewassern	
	3.0	Allgemeines zur Biotransformation organischer Stoffe	
	3.6.1	Abbau von Aromaten	
	3.6.2	Biotransformation von Benzothiazolen	21
	3.6.3	Biotransformation bei Inkubation mit Mischkulturen	21
	3.6.4	Biotransformationen in der Umwelt	
		Straßenablauf	
		Duuensaulen Oberflächengewässer	
	3.6.5	Biotransformation bei Inkubation mit Reinkulturen	
		Benzothiazolabbauende Mikroorganismen	
		Untersuchungen zum Abbauweg	

	3.7	Elimination von Benzothiazolen in der Abwasserbehandlung	27
4		Material und Methoden	29
	4.1	Chemikalien	
	4.2	Chromatographische Trennung	
	4.2.1	Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC)	
	4.2.2	Ionenpaarchromatographie (IP-HPLC)	
	4.3	Massenspektrometrie	30
	4.4	Festphasenextraktion	
	4.4.1	Eingesetzte Festphasen	
	4.4.2	Geräte zur Extraktion	
	4.4.3	Extraktionsprogramm	
	4.4.4	Einongung von SEE Extrakton	
	4.4.5	Cabuta dan Thistomana ang NDT mit Oktobian (OOU)	
	4.5	Schutz der Thiolgruppe von MBT mit Glutathion (GSH)	
	4.6	Unterscheidung zwischen Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung	
	4.7	Volumenstromreduzierung durch <i>post-column splitting</i> (PCS)	33
	4.8	Quantifizierung	34
	4.9	Ermittlung der Bestimmungsgrenzen	
	4.9.1		
	4.9.2		
	4.10	Untersuchungen zu Metabolisierung, Abbau, Transformation	35
	4.11	Beprobungsorte und Probenahme zur Untersuchung des Auftretens von Benzotl	niazolen in
	1 1 1 1	aquatischen Systemen	
	4.11.1	Konventionelle Behandlung mit Belebtschlamm (CAS)	
		Behandlung mittels Membranbioreaktoren (MBR).	
	4.11.2	Beprobung Klärwerk GaoBeiDian (Beijing, China)	
	4.11.3	Beprobung Klärwerk Schönerlinde (Berlin)	
	4.11.4	Nordgraben	
	4.11.5	Beprobung von Straßenablauf	
	4.11.6	Beprobung von häuslichem/sanitärem Abwasser	
	4.11.7	Extrahiorbaro Bonzothiazolo	
		Rücklösung von Benzothiazolen	40
	4 12	Berechnung der statistischen Signifikanz	۸1
	4.12		
5		Entwicklung einer Analysenmethode	42
	5.1	Massenspektrometrie	42
	5.2	Chromatographie	42
	5.3	Festphasenextraktion - SPE	43
	5.3.1	Allgemeines	43
	5.3.2	Untersuchte Festphasen	
	5.3.3	Vergleich Oasis HLB mit StrataX	44
	5.3.4	Durchbruch von sechs Benzothiazolen bei Extraktion über Oasis HLB	
	5.3.5		46
	5.4	Prävention von MBT-Verlusten	
	5.4.1 542	NB I-VERIUSTE WARFEND DER FESTPRASENEXTRAKTION	
	0.4.Z		
	5.5		
	5.6	Reduktion des ESI-Volumenstromes durch post-column splitting (PCS)	52

	5.6.1	Kurze Theorie zur Electrospray-Ionisierung	53
	5.6.2	Positive Effekte der Reduktion des ESI-Volumenstromes	54
	5.6.3	ESI-MS-Response von Benzothiazolen bei Reduktion des ESI-Volumenstromes	55
		Benzothiazole in Reinstwasser/Methanol	55
		Benzothiazole in Klarlauf und Rohabwasser	57
		Betrachtung des absoluten Response	57
	5.7	Quantifizierung durch externe Kalibration in Probenmatrix	59
	5.8	Bestimmungsgrenzen	60
	5.8.1	Hier gewählte Möglichkeit zur Ermittlung von Bestimmungsgrenzen	61
	5.8.2	Instrumentelles Detektionslimit (IDL)	61
	5.8.3	Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) der gesamten Analysenmethode	63
6		Metabolisierung, Abbau, Transformation	65
		Allgemeines	65
	6.1	Abbauweg von OHBT und BT	66
	6.1.1	Ein Muconsäure-Derivat als Produkt der Ringspaltung	66
	6.1.2	Weitere Beobachtungen aus HPLC-MS/MS-Untersuchungen	70
	62		71
	6.2.1	Metabolite im Abbau von MBT	72
	6.2.2	Nicht identifizierte Metabolite im Abbau von MBT	75
	6.3	Schlussfolgerungen aus den Abbauversuchen	77
7		Auftreten von Benzothiazolen in kommunalen Kläranlagen	79
	7.1	Gehalte in kommunalem Abwasser	79
	7.1.1	Zulauf in Ruhleben (Ruhl1 und Ruhl2)	79
	7.1.2	Zulauf in GaoBeiDian ( <i>Beij</i> )	81
	7.1.3	Benzothiazolquellen	81
	7.2	Benzothiazole in Kläranlagenablauf	82
	7.3	Elimination mittels CAS im Klärwerk Berlin-Ruhleben	84
	7.4	Elimination mittels CAS in GaoBeiDian	88
	7.5	Elimination von Benzothiazolen in Membranbioreaktoren	88
	7.5.1	Vergleich der Benzothiazolelimination mittels MBR und CAS	89
	7.6	Elimination durch Flockung und GAC-Adsorption	92
8		Untersuchung weiterer aguatischer Systeme	94
Ū			
	8.1	Verhalten von Benzothiazolen nach Freisetzung in Oberflächengewässer	94
	8.2	Benzothiazole in Straßenablauf	96
	8.3	Benzothiazole in häuslichem Abwasser	99
	8.4	Untersuchung von Klärschlamm	101
	8.4.1	Extrahierbare Benzothiazole	101
	8.4.2	Rücklösung von Benzothiazolen während der Abwasserbehandlung	103
9		Abschließende Zusammenfassung und Ausblick	105
			105
		Transformation und Abbau von Benzothiazolen	105
		Renzothiazole im Zulauf von Kläranlagen	106
		Benzothiazole in Klärschlämmen	107
		Elimination von Benzothiazolen durch konventionelle Abwasserbehandlung und mittels	101
		Membranbioreaktoren	108
		Freisetzung von Benzothiazolen über Klarlauf und Verhalten in der Umwelt	108

		Benzothiazole in Straßenablauf Fazit	109 109
10		Literatur	111
Anh	nang		I
11		Weitere Verzeichnisse	I
1	11.1	Abbildungsverzeichnis	I
1	11.2	Tabellenverzeichnis	IV
12		Strukturformeln / Stoffparameter	VI
13		Ergänzende Tabellen und Abbildungen	VIII
1	13.1	Prävention von MBT-Oxidation mit Glutathion (GSH) Extraktion von MBT aus Reinstwasser Extraktion von MBT aus Zulauf bzw. Ablauf einer Kläranlage	<b>VIII</b> VIII
1	13.2	Unterscheidung zwischen Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung	IX
1	13.3	Reduktion des ESI-Volumenstromes durch post-column splitting (PCS)	XII
1	13.4	Quantifizierung durch externe Kalibration in Probenmatrix	xv
1	13.5	Instrumentelle Bestimmungsgrenze Ausschluss von Ausreißern mit dem Grubbs-Test	<b>XVI</b> XVI
1	13.6	Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) der gesamten Analysenmethode	XX
1	13.7	Metabolisierung von MBT	XXIV
1	13.8	Benzothiazolgehalte in unbehandeltem und behandeltem Abwasser	XXV
1	13.9	Auftreten von Benzothiazolen im Nordgraben	XXVII
1	13.10	Benzothiazole in Straßenablauf	XXVIII
1	13.11	Benzothiazole in häuslichem Abwasser	XXIX
1	13.12	Auf Benzothiazole untersuchte Haushaltsprodukte	XXX
1	13.13	Untersuchung von Klärschlamm auf Benzothiazole	XXXI

# Häufig benutzte Abkürzungen

# Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
av	arithmetischer Mittelwert (engl.: average)
Beij	Kennzeichnung von Proben der Kläranlage GaoBeiDian in Beijing, China
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BOD <sub>10</sub>	biologischer Sauerstoffbedarf in 10 Tagen (engl.: biological oxygen demand)
C12D	Catechol-1,2-Dioxygenase
C23D	Catechol-2,3-Dioxygenase
CAS	konventionelle Abwasserbehandlung mit Belebtschlamm (engl.: conventional activated sludge)
CE	Kollisionsenergie (engl.: collision energy)
CoA	Coenzym A
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
CV	Konusspannung (engl.: cone voltage)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (engl.: dissolved organic carbon)
EC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50 % der Versuchsorganismen eine Veränderung aufweisen
EIC	Ionenstrom einzelner Massen (engl.: extracted ion chromatogram)
EPA	Environmental Protection Agency (Umweltbehörde der USA)
ESI	Electrospray-lonisierung (engl.: electrospray ionization)
GAC	granulierte Aktivkohle (engl.: granulated activated carbon)
GC	Gaschromatographie
HLB	hydrophilic-lipophilic balance (engl.)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: high pressure liquid chromatography)
ID	Innendurchmesser
IDL	Instrumentelles Detektionslimit
IP-Chromatographie	Ionenpaar-Chromatographie
LC	Flüssigchromatographie (engl.: liquid chromatography)
LC <sub>50</sub>	Konzentration, die auf 50 % der Versuchsorganismen letal wirkt
LLE	Flüssig-flüssig-Extraktion (engl.: liquid-liquid-extraction)
LOD	Detektionslimit der gesamten Methode (engl.: limit of detection)
$\log \kappa_{\rm ow}$	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient; dekadischer Logarithmus
LOQ	Quantifizierungslimit der gesamten Methode (engl.: limit of quantification)
Lsg	Lösung
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung eines ionisierten Moleküls
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MBR	Membranbioreaktor
MRM	multiple reaction monitoring mode (engl.)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance)
PACI	Poly-Aluminiumchlorid (Flockungsmittel)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCS	post-column splitting (engl.)
рK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten
р <i>к</i> ь	negativer dekadischer Logarithmus der Basekonstanten

## Fortsetzung

Abkürzung	Bedeutung
R	Responsefaktor
raw	Rohabwasser (engl.: raw wastewater)
RP-Chromatographie	Umkehrphasen-Chromatographie (engl.: reversed phase)
rsd	Relative Standardabweichung (engl.: relative standard deviation)
Ruhl1	erste Beprobungsserie auf dem Klärwerk Ruhleben
Ruhl2	zweite Beprobungsserie auf dem Klärwerk Ruhleben
S/N-Verhältnis	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: signal to noise ratio)
Schö	Kennzeichnung von Proben der Kläranlage Schönerlinde, Berlin
sd	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SDB	Styrol-Divinylbenzol
Std-Add	Standard-Addition
TIC	Totalionenstrom (engl.: total ion chromatogram)
TOF-MS	time-of-flight-Massenspektrometer
TS	Trockensubstanz

# Abkürzungen chemischer Substanzen

Acronym	Chemische Bezeichnung	(Verweis auf Struktur)
2,6-diOHBT	2,6-Hydroxybenzothiazol	(Abbildung 3-8, S. 27)
24MoBT	2-(4-Morpholinyl)benzolthiazol	(Tabelle 3-1, S. 7)
ABT	2-Aminobenzothiazol	(Anhang, Tabelle 12-2, S. VII)
ACN	Acetonitril	
BT	Benzothiazo	(Anhang, Tabelle 12-2, S. VII)
BTCA	Benzothiazol-6-carbonsäure	
BTSA	Benzothiazolsulfonsäure	(Anhang, Tabelle 12-1, S. VI)
CBS (Synonym NCBSA)	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide	(Tabelle 3-1, S. 7)
DCBS	N,N-Dicyclo-2-benzothiazylsulfenamid	(Tabelle 3-1, S. 7)
EtOH	Ethanol	
GSH	Glutathion	
MBS (Synonym MoTBT)	2-Morpholinothiobenzothiazol	(Tabelle 3-1, S. 7)
MBT	2-Mercaptobenzothiazol	(Anhang, Tabelle 12-1, S. VI)
MBTS	Benzothiazolyldisulfid	(Tabelle 3-1, S. 7)
MeBT	2-Methylbenzothiazol	
MeOH	Methanol	
MoTBT	Morpholinothiobenzothiazole	(Tabelle 3-1, S. 7)
MoTBT (Synonym MBS)	2-Morpholinothiobenzothiazol	(Tabelle 3-1, S. 7)
MTBT	2-Methylthiobenzothiazol	(Anhang, Tabelle 12-2, S. VII)
NCBA	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolamine	(Tabelle 3-1, S. 7)
NCBSA (Synonym CBS)	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide	(Tabelle 3-1, S. 7)
NH₄OAc	Ammoniumacetat	
OHBT	2-Hydroxybenzothiazol	(Anhang, Tabelle 12-1, S. VI)
TBBS	N-tert-Butyl-2-benzothiazolylsulfenamid	(Tabelle 3-1, S. 7)
ТСМТВ	Thiocyanomethylthiobenzothiazol	(Abbildung 3-7, S. 24)
ZMBT	Zink-2-mercaptobenzothiazol	(Tabelle 3-1, S. 7)

# 1 Hintergrund

#### Polare gegenüber unpolaren Wasserkontaminanten

Vor dem weit verbreiteten analytischen Einsatz von HPLC und seit ca. 10 Jahren von HPLC-MS standen unpolare Umweltchemikalien im Fokus von Untersuchungen. Zum einen waren diese Stoffe mittels den damals gängigen GC-Techniken gut analysierbar und zum anderen hatte man das Gefährdungspotential unpolarer Stoffe erkannt, die in Abhängigkeit ihres hydrophoben Charakters ein hohes bis sehr hohes Bioakkumulationspotential bergen, das zu einer Anreicherung dieser Stoffe in der Nahrungskette führt. Darüber hinaus ist die Bioverfügbarkeit unpolarer Stoffe aufgrund ihrer Eigenschaft, stark an Oberflächen und organisches, partikuläres Material zu sorbieren, gering, was oft mit einem schlechten biologischen Abbau solcher Stoffe einhergeht. Die positiven Aspekte der Sorption unpolarer Umweltkontaminanten an Partikel sind deren gute Entfernung bei der Abwasserbehandlung über den Schlamm und eine daraus resultierende geringe Konzentrationen dieser Stoffe in der Wasserphase (Abbildung 1-1).



Abbildung 1-1: Verhalten und Entfernung unpolarer organischer Stoffe im Wasserkreislauf (Abbildung nach einer Vorlage aus einer Präsentation von Thorsten Reemtsma 2004).

Polare Umweltkontaminanten sind demgegenüber in aquatischen Systemen sehr mobil und zeigen nur geringe Neigung zur Sorption an partikulärem Material. Da sie als gelöste Stoffe in der Wasserphase vorliegen, ist ihre Bioverfügbarkeit hoch. Sind Umweltkontaminanten jedoch polar und gleichzeitig schlecht biologisch abbaubar, so werden sie durch die konventionelle Abwasserbehandlung mit Belebtschlamm oft nur unzureichend entfernt und in die Umwelt freigesetzt. Dort erfolgt zwar eine Verdünnung, aber aufgrund ihrer hohen Mobilität können die Stoffe ins Grundwasser gelangen. Aktuelle Verfahren zur Trinkwassergewinnung können zwar auch polare Organika teilweise entfernen (z. B. können polare Aromaten teilweise mit Aktivkohlefilter entfernt werden), sind aber oft nicht speziell dafür konzipiert. Eine Migration polarer Organika aus Oberflächenwasser über eine Bodenpassage ins Grundwasser und weiter durch die Trinkwasseraufbereitung ins Trinkwasser ist daher nicht auszuschließen (Abbildung 1-2). Diese Problematik erfährt derzeit eine große Beachtung, und das Auftreten einiger polarer organischer Stoffe in Leitungswasser wurde bereits gezeigt.

Besonders bei der Trinkwassergewinnung in Berlin birgt das Auftreten polarer, persistenter organischer Verbindungen Risiken, da ein großer Teil des zu Trinkwasser aufbereiteten Rohwassers über Uferfiltration aus Oberflächengewässern gewonnen wird und einige Oberflächengewässer in und um Berlin als Vorfluter zur Einleitung von Klarlauf der kommunalen Abwasserbehandlung fungieren. Dadurch entsteht ein teilgeschlossener Wasserkreislauf, wie er schematisch in Abbildung 1-1 und Abbildung 1-2 dargestellt ist.



Abbildung 1-2: Verhalten polarer organischer Stoffe im Wasserkreislauf (Abb. nach einer Vorlage aus einer Präsentation von Thorsten Reemtsma 2004).

Während der biologischen Abwasserbehandlung kommt es zum vollständigen Abbau eines Teils der organischen Wasserinhaltsstoffe (Mineralisation). Erfolgt die Entfernung organischer Stoffe jedoch nur durch Transformation in einen anderen Stoff, so wird dies Primärabbau genannt. Durch die Bestimmung von Summenparametern wie der CO<sub>2</sub>-Entwicklung, des O<sub>2</sub>-Verbrauches oder der DOC-Abnahme kann ermittelt werden, ob während der biologischen Abwasserbehandlung Mineralisation oder Primärabbau stattfindet bzw. wie hoch der jeweilige Anteil ist. Die spezifische Erfassung und Identifizierung von Transformationsprodukten, meist haben diese polaren Charakter, war bis vor wenigen Jahren aufgrund des Fehlens geeigneter Analysenmethoden oft nicht möglich. Transformationsprodukten sollte jedoch Beachtung geschenkt werden, denn sie können toxischer sein als die Ausgangsstoffe (wenngleich dieser Fall selten ist) und/oder können weniger gut transformierbar sein als die ursprünglichen Verbindungen, was die oben beschriebenen Konsequenzen zur Folge hat.

#### Benzothiazole als Wasserkontaminanten

Untersuchungen von Gerbereiabwasser zeigten, dass dieses verschiedene Benzothiazole (Mercaptobenzothiazol (MBT), Methylthiobenzothiazol (MTBT), Benzothiazol (BT), Benzothiazolsulfonsäure (BTSA)) in hoher Konzentration enthält. Die Quelle war unschwer zu finden, da beim Gerben von Leder große Mengen des Fungizids Thiocyanomethylthiobenzothiazol (TCMTB) eingesetzt werden. Erstaunlicherweise jedoch wurde kein TCMTB im Abwasser nachgewiesen, sondern nur noch dessen Transformationsprodukte. Diese erwiesen sich teilweise als schlecht abbaubar, traten in behandeltem Abwasser auf und wurden mit diesem in die aquatische Umwelt freigesetzt. Recherchen zum Auftreten von Benzothiazolen in der aquatischen Umwelt ergaben, dass in GC-MS-*screening*-Untersuchungen von Kläranlagenabläufen, Oberflächenwässern und Sedimenten regelmäßig Benzothiazole gefunden wurden (BT, MTBT u. a.), was sich nur teilweise auf Gerbereien oder die Gummiindustrie, in welcher Benzothiazole in großem Umfang verwendet werden, zurückführen ließ. Das ubiquitäre Auftreten von Benzothiazolen legte die Vermutung nahe, dass Benzothiazole ein weites Anwendungsspektrum haben, dessen Umfang bis heute lediglich bruchstückhaft geklärt ist.

Das Auftreten einiger Transformationsprodukte von industriell eingesetzten Benzothiazolen in der Umwelt wurde zwar registriert, da aber die analytischen Methoden auf GC-Techniken und weniger empfindliche HPLC-Techniken limitiert waren, beschränkte sich das Spektrum der in Umweltproben nachweisbaren Benzothiazole auf BT und MTBT und einige weitere, unpolarere Benzothiazole. Laborversuche zum Abbau von Benzothiazolen, die mit höheren Konzentrationen durchgeführt wurden, wiesen gleichwohl darauf hin, dass noch weitere Transformationsprodukte, die polarer als BT und MTBT sind, entstehen. Dabei ist nicht bekannt, ob die bisher detektierten Transformationsprodukte ein nahezu vollständiges Bild der wichtigsten Metabolite abgeben oder ob diese nur einen Teil der tatsächlich gebildeten Metabolite darstellen.

Für die Überprüfung des Auftretens polarer Metabolite in Umweltproben fehlten bis vor kurzem die analytischen Methoden, sodass sich bisherige Untersuchungen zum Auftreten von Benzothiazolen auf den Nachweis unpolarer Benzothiazole und Benzothiazolmetabolite beschränkten. Erst durch Anwendung einer LC-ESI-MS/MS-Analysenmethode war es möglich, in industriellem Abwasser auch sehr polare Benzothiazolmetabolite, wie z. B. BTSA, zu erfassen. Einige Untersuchungen hinsichtlich des Auftretens polarer Benzothiazole in industriellen Abwässern liegen seitdem vor, kommunale Abwässer konnten hingegen bislang nicht untersucht werden.

# 2 Zielsetzung

Dass Benzothiazole aufgrund ihres unvollständigen Abbaus in Abläufen industrieller Kläranlagen enthalten sind, ist seit einiger Zeit bekannt. Untersuchungen von Stichproben kommunalen Abwassers geben Grund zur Annahme, dass Benzothiazole regelmäßig auch in städtischem Abwasser auftreten. Die derzeitigen Analysenmethoden sind jedoch nicht in der Lage, Benzothiazole mit ausreichender Richtigkeit und Präzision in aquatischen Proben in Konzentrationsbereichen im unteren µg/L- bzw. Sub-µg/L-Bereich zu bestimmen. Aus diesem Grund liegen nahezu keine Daten hinsichtlich des Auftretens von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser vor. Ferner beschränken sich bisherige Untersuchungen zumeist auf Benzothiazole, die mittels GC-Techniken bestimmbar sind. Polare Benzothiazole werden bislang nur in wenigen Studien erwähnt, obgleich deren Bedeutung hoch ist, da die meisten mikrobiellen Transformationsprodukte polarer sind als ihre Ausgangssubstanzen.

Zentrales Ziel der Arbeit war die Erweiterung des Kenntnisstandes zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser und deren Verhalten während der Abwasserbehandlung. Dabei muss selbstverständlich auch auf die Frage nach den Quellen des Eintrags und dem Schicksal von Benzothiazolen nach deren Freisetzung in Oberflächengewässer eingegangen werden.

Zur Untersuchung entsprechender Proben ist die Entwicklung einer leistungsfähigen Analysenmethode, basierend auf LC-ESI-MS/MS, notwendig, die es ermöglicht, das Auftreten einer Gruppe mäßig polarer bis sehr polarer Benzothiazole (Benzothiazolsulfonsäure (BTSA), Mercaptobenzothiazol (MBT), Hydroxybenzothiazol (OHBT), Aminobenzothiazol (ABT), Benzothiazol (BT) und Methylthiobenzothiazol (MTBT)) in verschiedenen aquatischen Kompartimenten zu analysieren.

Da die in Abwasser und folglich auch in geklärtem Abwasser enthaltenen Benzothiazole nahezu ausnahmslos Transformationsprodukte der industriell eingesetzten Stoffe sind, soll der Detektion und Identifikation möglicher weiterer Transformationsprodukte Beachtung geschenkt werden. Insbesondere stellt sich hier die Frage, ob noch weitere, bislang unerkannte und zugleich relevante Transformationsprodukte im Abbau von Benzothiazolen existieren, die in das Analytspektrum aufgenommen werden müssen.

# 3 Grundlagen zur Stoffklasse der Benzothiazole

Benzothiazole sind Stoffe, deren Grundgerüst aus einem heterocyclischen, aromatischen Bicyclus besteht (Abbildung 3-1). Sowohl der Benzolring als auch der Thiazolring können substituiert sein.



Abbildung 3-1: Grundstruktur der Benzothiazole.

Benzothiazolderivate sind Strukturbestandteil einer Vielzahl von natürlichen Produkten wie z. B. Aromastoffen von Lebensmitteln wie Teeblätter, Beeren (Cranberry), Wein u. a. (De Wever & Verachtert 1997; Bellavia et al. 2000). Die Bildung von Benzothiazolen kann auf fermentative Weise erfolgen (Seifert & King 1982; Gallois et al. 1990; Stierle et al. 1991). Bei der Biolumineszenz des Leuchkäfers spielt das Benzothiazol Luciferin eine zentrale Rolle (Lehninger 1987; Day et al. 2004). In der so genannten Hetero-PAK-Fraktion sind Benzothiazole ferner in Rohöl enthalten (Li et al. 2001).

Bekannt geworden sind Benzothiazole nicht aufgrund ihres natürlichen Vorkommens, sondern aufgrund ihres weit verbreiteten Einsatzes in zahlreichen industriellen Fertigungsprozessen und als Zusatz zu verschiedenen Produkten und dem daraus resultierenden, anthropogenen Eintrag in die Umwelt, wo Benzothiazole in verschiedenen Kompartimenten gefunden wurden (s. u.).

Entsprechend der Produktionsmengen (in den 1980er-Jahren ca. 38 000 t/a in Westeuropa (BUA 1991)) gehören die Benzothiazole zur Klasse der so genannten *high-production-volume chemicals*. In Deutschland werden kaum Benzothiazole produziert. Demgegenüber steht jedoch ein geschätzter Gesamtverbrauch in Deutschland von mehr als 6 000 t/a (Erhebung im Jahr 1990 für MBT, dessen Salze, MBTS und Benzothiazolsulfenamide) (BUA 1991).

## 3.1 Industrielle Anwendungsgebiete

## 3.1.1 Übersicht

Der überwiegende Teil aller produzierten Benzothiazolderivate findet Einsatz in der Gummiindustrie, wo MBT-Derivate als Vulkanisationsbeschleuniger zugesetzt (BUA 1991) werden (Details zur Gummiproduktion s. u.).

Aufgrund ihrer mikrobioziden Eigenschaften werden Benzothiazole in weiteren industriellen Prozessen eingesetzt: TCMTB dient als Fungizid in der Lederindustrie (Fowler et al. 1987; Gattner et al. 1988) und bei der Konservierung von Holz, wo es als Substitut für das seit den 1980er-Jahren nicht mehr eingesetzten Pentachlorphenol dient (Kennedy 1986; Daniels & Swan 1987; Brownlee et al. 1992). Zur Konservierung von Holz wird TCMTB vor allem in Kanada eingesetzt, in Deutschland ist dessen Verwendung weniger üblich (BUA 1991). Seit dem EU-Verbot von zinnhaltigen Bootsanstrichen dient TCMTB als Fungizid in Farben und Anstrichen im Schiffsbereich (Thomas et al. 2002;

Konstantinou & Albanis 2004). Nach Angaben der *Pesticide Database* des *Pesticide Action Network* (Pesticide Action Network 2004) und Lacorte et al. (Lacorte et al. 2003) werden TCMTB-Formulierungen oder das Na-Salz von MBT den Pulpen bei der Papierherstellung zugesetzt wo diese die Schleimbildung unterbinden und zum Korrosionsschutz der Anlagen beitragen.

Aufgrund seiner antikorrosiven Eigenschaften wird MBT sowohl Kühlschmierstoffen (Bohr- und Schneideöle) (BUA 1991) als auch Kühlmitteln in Kühlkreisläufen zugegeben. Letzterer Punkt betrifft industrielle Kühlsysteme (Hahn 1993) und auch Kühlflüssigkeiten von PKWs (Reddy & Quinn 1997).

Ein weiteres bekanntes Benzothiazol ist das in der Landwirtschaft als Herbizid ausgebrachte Methabenzthiazuron (Wallnöfer et al. 1976; Baez et al. 2003; Malouki et al. 2003). Bedeutung kommt diesem Benzothiazolderivat zu, da es direkt in die Umwelt eingebracht wird. Verglichen jedoch mit den Mengen an Benzothiazolen, die in der Gummiindustrie eingesetzt werden, sind die Verbrauchsmengen von Methabenzthiazuron gering (ca. 150 kg/a in Deutschland (BUA 1991)).

Benzothiazole, besonders ABT, sind ferner Ausgangsstoffe für die Synthese von Azofarbstoffen (Towns 1999; Humphreys et al. 2003).

In jüngster Zeit haben Benzothiazole als Strukturbestandteil von Anti-Tumor-Pharmaka Aufmerksamkeit erregt (Bradshaw et al. 2001). Als bekanntestes Präparat wird DF203 (2-(4-Amino-3-phenyl)benzothiazol) genannt, mit welchem bereits *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt werden.

Neben den vorgenannten Haupteinsatzgebieten gibt es noch eine Reihe weniger bedeutender Verwendungen von Benzothiazolen mit geringem stofflichem Umsatz. So dient beispielsweise MBT als Stabilisator von Filmemulsionen im Photobereich, als Sammler bei der Flotation von Erzen, als Fällungsmittel bei der quantitativen Analyse von Schwermetallsalzen sowie als Hilfsstoff bei der elektrochemischen Beschichtung von Metalloberflächen (BUA 1991). Aufgrund seines hohen Siedepunktes wird BT (Sdp. 231 °C) gelegentlich als Lösungsmittel für bei hohen Temperaturen ablaufende chemische Reaktionen eingesetzt und dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Spiroverbindungen (Roempp 1995).

Die Grundlagen der Gummiproduktion werden an dieser Stelle näher beschrieben, da hier der Großteil aller produzierten benzothiazolischen Verbindungen verarbeitet wird.

#### 3.1.2 Gummiproduktion

Seit der Entdeckung von MBT im Jahr 1921 (Engels et al. 1993) sind dessen Derivate die am häufigsten verwendeten Vulkanisationsbeschleuniger. Zum Einsatz kommen MBT, MBTS, Zink-MBT-Salze und MBT-Sulfenamide. Tabelle 3-1 enthält eine Übersicht der wichtigsten benzothiazolischen Vulkanisationsbeschleuniger. Neben den Vulkanisationsbeschleunigern werden der Kautschukmischung noch Schwefel, Zinkoxid, Fettsäure und Amine zugesetzt. Bei Sulfenamiden wird bei der Vulkanisation die labile S-N-Bindung, bei MBTS die S-S-Bindung gespalten, der weitere Vernetzungsprozess läuft analog der Vulkanisation mit MBT ab (BUA 1991).

Tabelle 3-1: Benzothiazolische Vulkanisationsbeschleuniger und zwei in Formulierungen von Beschleunigern enthaltene Nebenprodukte. Angegeben sind die chemische Bezeichnung, das gebräuchlichste Akronym und die CAS-Nummer.

Bei der Gummiproduktion eingesetzte Vulkanisationsbeschleuniger 2-Mercaptobenzothiazol MBT SH 149-30-4 Benzothiazolyldisulfid MBTS 120-78-5 Zink-2-mercaptobenzothiazol Znź ZMBT 155-04-4 N-Cyclohexyl-2-benzothiazolylsulfenamid NCBSA (Synonym: CBS) 95-33-0 2-Morpholinothiobenzothiazol MoTBT (Synonym MBS) 102-77-2 N-tert-Butyl-2-benzothiazolylsulfenamid TBBS 95-31-8 N,N-Dicyclo-2-benzothiazylsulfenamid DCBS 4979-32-2 Verunreinigungen in Formulierungen von Vulkanisationsbeschleunigern N-Cyclohexyl-2-benzothiazolamin NCBA 028291-75-0 2-(4-Morphlinyl)benzothiazol 24MoBT

4225-26-7

Die Gummivulkanisation mit Beschleunigern ist komplex und besteht aus mehreren konkurrierenden Reaktionen. Abbildung 3-2 zeigt in vereinfachter Form die grundlegenden, bei der Vulkanisation von Gummi mit MBT ablaufenden Reaktionen: Bei einer Temperatur von 100-250 °C wird zunächst MBT durch ZnO unter Bildung eines Beschleuniger-Zink-Komplexes aktiviert (Abbildung 3-2 (i)). Durch Einbau weiterer Schwefelatome wird ein Beschleuniger-Schwefel-Komplex (ii) gebildet. Dieser Komplex reagiert mit dem Kautschukpolymer, bevorzugt mit allylständigen C-Atomen (iii). Die Weiterreaktion und Ausbildung einer polysulfidischen Quervernetzung (iv) erfolgt nur in Anwesenheit weiterer Beschleuniger-Zink-Komplexe. Der Beschleuniger-Zink-Komplex ermöglicht nicht nur die Ausbildung einer polysulfidischen Quervernetzung, sondern bewirkt auch die Verkürzung der

Polysulfidkette und die Bildung von monosulfidischen Quervernetzungen (v). Neben der Bildung von monosulfidischen Quervernetzungen kommt es noch zu einer Reihe weiterer Nebenreaktionen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird (BUA 1991; Engels et al. 1993). MBT kann im Zuge der Vulkanisation als Seitenkette (*pending group*) oder inkorporiert ins Polymer eingebaut werden (BUA 1991). Als benzothiazolische Nebenprodukte entstehen bei der Vulkanisation BT und MBTS.



Abbildung 3-2: Hauptreaktionen bei der Vulkanisation von Gummi beim Einsatz von MBT-Derivaten als Beschleuniger.

Mit Beschleunigern lassen sich Vulkanisationsprozess und -grad besser steuern. Im Detail erhöhen sie die Quervernetzung und ermöglichen dadurch kürzere Reaktionszeiten, wobei gleichzeitig eine effizientere Ausnutzung des eingesetzten Schwefels erreicht wird und unerwünschte Nebenreaktionen verringert werden. Außerdem erfolgt die Vulkanisation bei geringerer Temperatur, was den Prozess ökonomischer macht. Die Gefahr der Schädigung des Gummis durch hohe Temperatur wird vermieden und Alterungsprozesse des Produktes werden verzögert (Engels et al. 1993).

Kautschukmischungen werden bei der Gummiproduktion 0,25 bis 1 % MBT zugesetzt. Der Stoffumsatz bei Vulkanisationsprozessen hängt von den Reaktionsbedingungen ab, bleibt aber gering und liegt teilweise unter 55 % (BUA 1991). Untersuchungen zum Gehalt von nicht gebundenem MBT in Kautschukmischungen nach der Vulkanisation ergaben Werte von über 65 % des eingesetzten MBT (BUA 1991). In den 1980er-Jahren lag die Produktion von Benzothiazolderivaten, die zur Gummiherstellung eingesetzt wurden, in Westeuropa bei ca. 38 000 t pro Jahr (BUA 1991), in den USA in ähnlicher Größenordnung (Mark et al. 1982).

Benzothiazole können durch wässrige Extraktion aus Gummiartikeln ausgewaschen werden. Dies spielt besonders bei Reifengummi eine Rolle. Durch Abnutzung wird Reifenabrieb in die Umwelt freigesetzt. Durch die große Oberfläche des Abriebs ist der Extraktionsgrad, der durch Niederschläge erfolgt, sehr hoch (s. u.). Eine Schätzung aus dem Jahr 1989 beziffert die jährliche in Deutschland anfallende Menge Reifenabrieb auf 75 000 t (BUA 1991). Das Altgummiaufkommen in Deutschland lag 1988 bei ca. 900 000 t (BUA 1991), wovon ca. 50 % Reifengummi sind.

### 3.2.1 Stabilität von Benzothiazolen

Bei den industriell eingesetzten Benzothiazolen handelt es sich vorwiegend um MBT, TCMTB und Benzothiazolsulfenamide. TCMTB sowie Benzothiazolsulfenamide sind sehr reaktionsfreudig und werden bei oder nach deren Einsatz rasch transformiert. Beispielsweise wird TCMTB in alkalischem Medium oder durch Photolyse (Brownlee et al. 1992; Reemtsma et al. 1995) zu MBT und BT hydrolysiert. Aufgrund schneller Hydrolysereaktionen konnte bei der Lederherstellung eingesetztes TCMTB bereits im Zulauf zur industriellen Kläranlage der Gerberei nicht mehr detektiert werden, jedoch TCMTB-bürtige Transformationsprodukte (Reemtsma et al. 1995).

Die bei der Gummiproduktion eingesetzten Benzothiazolsulfenamide zersetzen sich bei Vulkanisationstemperaturen von 100-250 °C unter Bildung von MBT (BUA 1991). Außerdem sind Benzothiazolsulfenamide empfindlich gegenüber Wasser, worin sie unter Abspaltung des Amins zu MBTS, der Sulfinsäure (BT-S-OOH) oder der Sulfonsäure (BTSA) von MBT reagieren (Spies et al. 1987; BUA 1991).

MBT ist stabiler als die Sulfenamide oder TCMTB und weniger hydrolyseempfindlich. Jedoch neigt MBT aufgrund der freien SH-Gruppe zu Oxidationsreaktionen unter Bildung von Mercaptobenzothiazolyldisulfid (MBTS). Weiterhin wird MBT photochemisch transformiert. Unter simulierten Umweltbedingungen reagiert MBT in wässriger Lösung in erster Linie zu BT und OHBT (Malouki et al. 2004). In organischen Lösungsmitteln dimerisiert MBT zu MBTS und unter Verwendung wassermischbarer Lösungsmittel (MeOH, EtOH, ACN) läuft die photochemische Reaktion unter Oxidation der Schwefelatome von MBTS weiter, wobei als Endprodukt BTSA entsteht (Parkanyi & Abdelhamid 1985). Zur photochemischen Dekomposition von MBT existieren noch weitere Arbeiten, bei welchen die photochemische Reaktion mit TiO<sub>2</sub> als Katalysator (Habibi et al. 2001), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Andreozzi et al. 2001) oder durch den Fenton-Prozess (Andreozzi et al. 2001) unterstützt wird.

BT wird durch photochemische Prozesse nur schlecht transformiert (Andreozzi et al. 2001). Hingegen erfolgt nach Unterstützung der Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rasche, nahezu vollständige Transformation von BT innerhalb von wenigen Minuten (Andreozzi et al. 2001).

Zu den Benzothiazolen BTSA, MTBT, ABT und OHBT liegen keine detaillierten Informationen bezüglich ihres photochemischen Verhaltens vor.

#### 3.2.2 Polarität von Benzothiazolen

Polarität und Lipophilie sind grundlegende Größen zur Beurteilung der Mobilität von Stoffen in der aquatischen Umwelt sowie des Bioakkumulationspotentials. Benzothiazole können je nach der Art der funktionellen Gruppen sehr unterschiedliche Polarität haben. In Tabelle 3-2 sind  $pK_{a}$ - und log  $K_{OW}$ -Werte von sechs Benzothiazolen aufgelistet. Der obere Teil der Tabelle enthält Werte, die mittels der Software *ACD/Labs* (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002) berechnet wurden. Der untere Teil der Tabelle enthält weitere in der Literatur publizierte  $pK_{a}$ - und log  $K_{OW}$ -Werte. Wie zu erkennen, konzentrierten sich Untersuchungen in der Vergangenheit auf MBT. Die Daten sind teilweise experimentell ermittelt, berechnet oder geschätzt (weitere physikalische und chemische Daten im Anhang Kapitel 12). Nur teilweise lässt sich im Detail nachvollziehen, wie und unter welchen

Bedingungen die Daten ermittelt wurden. Die teilweise recht großen Schwankungen der Werte sind vermutlich auf unterschiedliche Versuchs- bzw. Ausgangsbedingungen und auf die Messgenauigkeit zurückzuführen.

Tabelle 3-2: Werte für  $pK_a$ ,  $pK_b$  und log $K_{OW}$  für sechs Benzothiazole. Oberer Tabellenteil: Daten aus der Datenbank von (CAS database 2002). Die Werte wurden mittels der Software *ACD/Labs* (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002) berechnet. Unterer Tabellenteil: weitere Werte aus unterschiedlichen wissenschaftlichen Quellen.

	BTSA	MBT	OHBT	ABT	BT	MTBT
berechnente Daten (Advanced Chemistry Develo	pment Inc. 1994	-2002; CAS data	base 2002)	_		
Log $\mathcal{K}_{\text{OW}}$ des ungeladenen Moleküls	1,670+/-0,659	2,377+/-0,745	1,76+/-0,250	2,01+/-0,297	2,01+/-0,297	3,100+/-0,194
Log K <sub>ow</sub> bei pH1	-1,66	2,38	1,76	0,56	0,56	1,48
pH4	-2,43	2,38	1,76	2	2	3,08
pH7	-2,43	2,38	1,76	2,01	2,01	3,1
pH8	-2,43	2,37	1,76	2,01	2,01	3,1
pH10	-2,43	1,97	1,62	2,01	2,01	3,1
p <i>K</i> a		9,8	10,41			
pKb				6,53	11,56	11,39
weitere Daten aus unterschiedlichen Quell		:				
рK <sub>a</sub>		6,94 [1] 7,03 [2]				
Log K <sub>ow</sub>	-0,99 [3]	2,41 [4] 2,84 [2] 1,61 [2] 2,42 [2;5;6]	1,76 [6]	2,00 [6] 2,00 [6]	2,01 [6;5] 1,99 [4]	3,15 [7] 3,1 [4]
Quellen: [1] (Malouki et al. 2004) [2] (BUA 1991) [3] (Reemtsma 2000)		[4] (Brownlee et al. 1992) [5] (Merck KGaA 2005) [6] (SRC 2005)		[7] (Platford 1983)		

Auffällig ist der negative log  $K_{OW}$ -Wert von **BTSA** (Tabelle 3-2). Dies ist auf die stark saure Sulfonsäuregruppe zurückzuführen. Zwar ist für BTSA kein p $K_a$ -Wert angegeben, doch kann angenommen werden, dass dieser sehr klein ist, da Arylsulfonsäuren etwa die gleiche Säurestärke aufweisen wie Mineralsäuren (Streitwieser et al. 1994). Dafür sprechen auch die log  $K_{OW}$ -Werte für BTSA bei pH1 und pH4: das Dissoziationsgleichgewicht verschiebt sich bei Änderung des pH-Wertes von 4 nach 1 nur wenig. Für eine Verschiebung des Gleichgewichts weit zur undissoziierten Säure hin, notwendig um log  $K_{OW}$  = 1,67 (neutrales Molekül) zu erreichen, muss deutlich unter pH1 angesäuert werden. Das bedeutet wiederum, dass der p $K_a$ -Wert sehr klein sein muss.

Die log  $K_{OW}$ -Werte von **MBT**, **OHBT**, **ABT** und **BT** liegen im gleichen Bereich (zwischen 1,8 und 2,4). Ein grundlegender Unterschied besteht jedoch in der Acidität bzw. Basizität dieser Stoffe. Während MBT und OHBT sehr schwache Säuren sind, hat ABT schwach basischen und BT sehr schwach basischen Charakter.

**MTBT** ist der unpolarste Vertreter in dieser Gruppe von Benzothiazolen (log  $K_{OW}$  = 3,1) und ist wie BT eine sehr schwache Base.

Durch saure (BTSA, MBT, OHBT) oder basische (ABT) funktionelle Gruppen und natürlich auch durch die Aminogruppe im Thiazolring, ist der Dissoziationsgrad der aufgeführten Benzothiazole und dadurch auch deren Affinität zu polaren bzw. unpolaren Lösungsmitteln vom pH-Wert abhängig. Ferner sind auch die Thiol-Thion-Tautomerie von MBT und die Keto-Enol-Tautomerie von OHBT pH-abhängig. Dies muss bei der Bestimmung von physikalisch-chemischen Parametern und besonders auch bei der Analyse dieser Stoffe berücksichtigt werden.

Eine graphische Übersicht über die  $pK_{a^-}$ ,  $pK_{b^-}$  und log  $K_{OW}$ -Werte ist in der halb-schematischen Darstellung in Abbildung 3-3 wiedergegeben, in welcher ABT, BT, MTBT, BTSA, OHBT und MBT entsprechend ihrer Acidität bzw. Basizität und Polarität eingeordnet sind. Hierin ist gut zu erkennen, dass Benzothiazole sowohl einen weiten Polaritäts- als auch Aciditätsbereich abdecken.



Abbildung 3-3: Darstellung der Polarität und der Acidität von sechs Benzothiazolen. Für diese halbschematische Darstellung wurden die in Tabelle 3-2 mittels *ACD/Labs* (Advanced Chemistry Development Inc. 1994-2002) berechneten  $pK_{a}$ - und  $pK_{b}$ -Werte sowie die log  $K_{OW}$ -Werte bei pH7 herangezogen.

In der Umwelt sind 5 der dargestellten Benzothiazole sehr mobil und es ist zu erwarten, dass Sorption an Boden und Sediment nur eine untergeordnete Rolle spielt. Lediglich bei MTBT ist zu vermuten, dass sich ein Gleichgewicht zwischen gelöstem und sorbiertem MTBT ausbildet, bei welchem deutliche Anteile partikulär gebunden vorliegen können.

Auch hinsichtlich des Bioakkumulationspotentials ist lediglich MTBT von Bedeutung. Allgemein wird Stoffen ab einem log  $K_{OW}$  > 3 ein signifikantes Bioakkumulationspotential zugemessen. MTBT weist mit log  $K_{OW}$  = 3,1 demnach schwaches bioakkumulatives Potential auf.

Aufgrund des weiten Polaritäts- und Aciditätsbereiches werden an eine Analysenmethode, die alle sechs Benzothiazole umfasst, besondere Anforderungen hinsichtlich der Probenvorbereitung, Probenaufreinigung, HPLC-Trennung sowie ESI-MS-Detektion gestellt.

## 3.3 Toxikologisches Potential von Benzothiazolen

Zwar sind die industriell eingesetzten Benzothiazole reaktive Verbindungen und weisen schon aufgrund ihres Einsatzgebietes (z. B. als Fungizid, Herbizid, Bakterizid) auf ein hohes toxikologisches Potential hin, doch durch ihre geringe Stabilität und ihrer raschen Transformation in aquatischen Systemen sollte insbesondere den Transformationsprodukten Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die Datenlage hinsichtlich ökotoxikologischer Parameter von Benzothiazolen ist in der Literatur allerdings spärlich und bruchstückhaft. Die publizierten Arbeiten befassen sich vorwiegend mit MBT und behandeln andere Benzothiazole, wenn überhaupt, oft nur am Rande. Untersuchungen zu MBT sind relevant, weil es ein zentrales Transformationsprodukt der Hydrolyse von TCMTB und der Hydrolyse sowie Zersetzung der Sulfenamidbeschleuniger der Gummiindustrie ist und darüber hinaus selbst in großen Mengen in der Gummiindustrie eingesetzt wird.

**MBT** ist aufgrund seiner freien Thiolgruppe ein physiologisch aktiver Stoff und in der Lage Enzyme zu inhibieren (De Wever & Verachtert 1997; BG Chemie 2000). Dies ist auf nucleophile Angriffe durch die Thiolgruppe, eine Komplexierung der metallischen Zentralatome von Enzymen (De Wever & Verachtert 1997) oder Wechselwirkungen der SH-Gruppe des MBT mit SH-Gruppen von schwefelhaltigen Aminosäuren der Enzyme zurückzuführen. Letzteres wird als Ursache für die Störungen der Ionenkanalaktivität verschiedener Membranproteine angesehen (De Wever & Verachtert 1997). MBT wirkt beim Menschen hautsensibilisierend (BG Chemie 2000) und gelangte, oft gemeinsam mit dem Disulfid MBTS, als Verursacher für die so genannte "Tennis-Schuh-Dermatitis", eine Form von Kontaktdermatitis, in die Schlagzeilen (Jung et al. 1988). Auch das Tragen von Latex-Handschuhen kann allergische Reaktionen auslösen. In diesem Zusammenhang wurde neben in Latex enthaltenen Proteinen auch MBT als Hapten identifiziert (Geier et al. 1994; Geier et al. 2003). Auf Latexallergien wurde man besonders in den 1980er-Jahren aufmerksam, als aufgrund der Ansteckungsgefahr mit dem HIV-Virus das Tragen von Latexhandschuhen im medizinischen Bereich zunahm und dadurch auch die Zahl der Fälle anstieg, in welchen allergische Reaktionen beobachtet wurden. Die MAK-Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe zählt MBT zu den Stoffen, die "wegen möglicher Krebs erzeugender Wirkung beim Menschen Anlass zur Besorgnis geben aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können" und ordnete MBT damit in "Kategorie 3" der Krebs erzeugenden Arbeitsstoffe ein (BG Chemie 2000). Der MAK-Wert von MBT liegt bei 4 mg/m<sup>3</sup> (einatembarer Aerosolanteil).

Zum ökotoxikologischen Potential von MBT liegen einige Daten älteren (BUA 1991) und jüngeren Datums (Reemtsma et al. 1995; De Wever & Verachtert 1997; Milanova et al. 2001) aus Toxizitätstests mit Mikroorganismen, Algen, Daphnien und einigen Fischarten vor. Das ökotoxikologische Potential kann demnach als mäßig eingestuft werden. Die akute Fischtoxizität 96 h LC<sub>50</sub> mit unterschiedlichen Fischarten liegt demnach bei 0,7-11 mg/L (BUA 1991; Milanova et al. 2001). Bei Mikroorganismen hemmt MBT die Nitrifikationsaktivität (50-100 % Hemmung) bereits bei Konzentrationen unter 3 mg/L (De Wever & Verachtert 1997). EC<sub>50</sub>-Werte hinsichtlich der Wachstumshemmung variieren in Abhängigkeit vom Testorganismus stark und liegen im Allgemeinen oberhalb von ca. 10 mg/L (De Wever & Verachtert 1997). Weit empfindlicher ist die Lumineszenz-Inhibierung durch MBT bei *Vibrio fischeri*. EC<sub>50</sub>-Werte liegen hier unter als 1 mg/L (Reemtsma et al. 1995). **BT** und **MTBT** sind weniger toxisch als MBT.  $EC_{50}$ -Werte hinsichtlich der Respirationshemmung im Abbauversuch (BOD<sub>10</sub>) und der Lumineszenzhemmung bei *Vibrio fischeri* liegen um das 5- bis 40-fache über denen von MBT (Reemtsma et al. 1995).

Eine aktuellere Untersuchung über endokrin wirksame Stoffe führt neben den bekannten endokrinen Disruptoren (Steroide, Phthalate, Alkylphenole) auch **OHBT** als hormonwirksame Substanz auf (Cespedes et al. 2004). Der  $EC_{50}$ -Wert für die östrogene Wirkung von OHBT innerhalb eines Tests mit Hefezellen wurde dabei zu 6,3 mg/L bestimmt. OHBT hat demnach ähnliches östrogenes Potential wie verschiedene Phthalate, bezogen auf Östradiol beträgt das Potential von OHBT jedoch weniger als ein Millionstel. Diese Arbeit war bislang die Einzige, die die hormonaktive Wirkung von Benzothiazolen untersuchte. Sehr aufschlussreich wären Vergleichswerte mit anderen Benzothiazolen und auch anderen Testsystemen. Bis dahin sollte das östrogene Potential von OHBT als Verdacht angesehen werden.

# 3.4 Analytische Techniken zur Analyse von Benzothiazolen in Umweltproben

Vor dem weit verbreiteten, routinemäßigen Einsatz von HPLC-Techniken in der Spurenanalytik wurden Umweltproben mittels GC-Techniken analysiert. Die meisten Veröffentlichungen zum Vorkommen von Benzothiazolen in der Umwelt bis in die 1990er-Jahre berichten folglich von den gut GC-gängigen Benzothiazolen BT und MTBT (Jungclaus et al. 1976; Jungclaus et al. 1978; Ellis et al. 1982; Dietrich et al. 1988; Louter et al. 1994).

Durch den Einsatz von HPLC-UV-Analysenmethoden war es möglich, das Analytspektrum auszuweiten, wodurch auch polare, thermisch instabile Benzothiazole wie BTSA, OHBT, MBT und ABT erfasst werden konnten (Warner et al. 1985; Brownlee et al. 1992; De Vos, De Wever & Verachtert 1993; Fiehn et al. 1994; Fiehn et al. 1998; Reyes & Wrobel 2002). Durch die begrenzte Empfindlichkeit und Selektivität der UV-Detektion waren Untersuchungen hinsichtlich des Benzothiazolgehaltes auf Proben beschränkt, die hohe Benzothiazolkonzentrationen aufwiesen.

Erst die Kombination von HPLC mit Massenspektrometrie durch Electrospray-Ionisierung (ESI-MS) ermöglichte die empfindliche und selektive Detektion eines Analytspektrums von acht Benzothiazolen (ABT, BT, BTSA, MBT, MTBT, MeBT, TCMTB) (Reemtsma 2000). Mit dieser Methode war die direkte Analyse von Proben aus Zu- und Ablauf einer industriellen Kläranlage einer Gerberei möglich. Erstmalig wurden im Abwasser einer Gerberei neben bisher bekannten, eher unpolaren Benzothiazolen (BT und MTBT) auch die polaren Benzothiazole BTSA, OHBT, MBT und ABT detektiert. Die Analysenmethode umfasst dabei zwei separate HPLC-Läufe und entsprechend zwei ESI-MS/MS-Methoden. ABT, BT, MTBT, MeBT und TCMTB werden mittels angesäuerter MeOH/H<sub>2</sub>O-Eluenten über RP-HPLC getrennt und nach positiver Ionisierung detektiert, wohingegen die MeOH/H<sub>2</sub>O-Eluenten bei der Bestimmung von BTSA, MBT und OHBT mit dem schwachen Ionenpaarreagenz Ammoniumacetat versetzt sind. Die Detektion erfolgt hier im negativen ESI-Modus. Abgesehen von der Durchführung von zwei getrennten HPLC-Läufen, die eine bessere Optimierung der Eluenten hinsichtlich HPLC-Trennung und ESI-Ionisierung ermöglichen, ist es der Empfindlichkeitsgewinn des MRM-Modus (multiple-reaction-monitoring), der zur Leistungsfähigkeit dieser Methode beiträgt. Diese Methode bildete die Grundlage für die innerhalb der vorliegenden Arbeit entwickelte Analysenmethode, mit welcher es nun möglich ist, 6 polare bis mäßig unpolare Benzothiazole in kommunalem Abwasser, in behandeltem kommunalem Abwasser, in Oberflächengewässern, in Straßenablauf und anderen Matrices empfindlich und selektiv nachzuweisen und zu untersuchen.

## 3.5 Auftreten von Benzothiazolen in der aquatischen Umwelt

Erste Publikationen, welche die Stoffklasse der Benzothiazole als Umweltkontaminanten thematisieren, erschienen in den 1970er-Jahren (Burnham et al. 1973; Jungclaus et al. 1976; Mainprize et al. 1976; Santodonato et al. 1976; Jungclaus et al. 1978).

Eine Übersicht über Publikationen bis zum Jahr 2000, die das Auftreten von Benzothiazolen in der Umwelt beschreiben, ist neben dem Bericht für MBT des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA 1991) in den Dissertationen von Schmegel (Schmegel 1995) und Krumwiede (Krumwiede 2001) gegeben. Benzothiazole wurden teilweise gualitativ, teilweise guantitativ in den unterschiedlichsten Matrices detektiert: industriellen und kommunalen Abwässern, Kläranlagenablauf, Straßenablauf, Klärschlamm, wässrigen Gummiextrakten, Deponiesickerwasser, Flusswasser, Seewasser, Packeis der Antarktis (!), Sediment, Gewebe von Süßwasseregeln und Fischen, Boden, Grundwasser, Trinkwasser, Lebensmitteln, Abgaskondensat, Atmosphäre, Hausstaub, Blut (BUA 1991; Schmegel 1995; Krumwiede 2001). Teilweise sind die Befunde zu hinterfragen und es ist nicht immer klar, wie es, z. B. im Packeis der Antarktis, zu positiven Befunden kommen kann. Auch wird nicht immer deutlich, ob es sich um natürliche Vorkommen handelt oder die positiven Befunde auf anthropogene Einflüsse zurückzuführen sind. Gerade bei älteren Befunden, die auf GC-Analysen beruhen, ist aufgrund des Einsatzes großer Mengen Lösungsmittel und der Allgegenwärtigkeit von Gummiprodukten im und am Laborinstrumentarium die Gefahr der Kontamination der Probe groß. Selbst die fertigen, zu analysierenden Lösungen sind der Gefahr der Kontamination ausgesetzt, da BT beispielsweise aus den Septen von GC-Vials herausgelöst werden kann (Pattinson & Wilkins 1989).

Allgemein kann gesagt werden, dass sich der überwiegende Teil der publizierten Arbeiten nicht speziell mit dem Auftreten von Benzothiazolen beschäftigt, sondern Benzothiazole innerhalb von *screening*-Untersuchungen detektiert wurden. Systematische Untersuchungen des Auftretens von Benzothiazolen, von der Emissionsquelle bis zum letztendlichem Verbleib bzw. Untersuchungen eines Umweltkompartimentes über einen längeren Zeitraum, sind rar. *Screening*-Untersuchungen bzw. Stichproben liefern oft neue, wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Belastung der Umwelt mit organischen Spurenstoffen, obgleich die erzielten Resultate oft semiquantitative bis qualitativen Charakter haben. Und gleichwohl die Messung von isolierten, einzelnen Proben weniger verlässliche Ergebnisse liefert als umfangreiche Probenserien, sind die erzielten Ergebnisse wichtige Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen.

Im Folgenden werden einige hinsichtlich des Auftretens von Benzothiazolen in der Umwelt bedeutende Arbeiten aufgeführt und vorgestellt. Daraus wird ersichtlich, dass neben punktuellen Eintragspfaden in die Umwelt durch Abwässer (industriell und kommunal) auch diffuse Eintragspfade (Straßenablauf, Reifenabrieb) eine bedeutende Rolle spielen. Benzothiazole können ubiquitär in der Umwelt im unteren bis mittleren µg/L-Bereich nachgewiesen werden. Hierbei sind es nicht vorwiegend

die industriell eingesetzten Stoffe wie MBT, die nachweisbar sind, sondern Transformationsprodukte und stabile benzothiazolische Verunreinigungen von Sulfenamidbeschleunigern.

## 3.5.1 Industrielle Emissionen

Aufgrund unvollständigen Abbaus von Benzothiazolen bei der Behandlung von industriellen Prozess- und Abwässern werden diese Stoffe emittiert. Neben Unternehmen, welche Benzothiazolderivate produzieren, sind es in erster Linie Gerbereien, die Gummiindustrie und die Papierindustrie, die Benzothiazole freisetzen (Jungclaus et al. 1976; Fiehn et al. 1994; Reemtsma et al. 1995; Reemtsma 2000; Lacorte et al. 2003). Die Emission kann ins kommunale Abwassernetz oder direkt in Vorfluter erfolgen. Von den industriell eingesetzten Benzothiazolen ist lediglich MBT in der Umwelt detektierbar. Andere in der Umwelt nachgewiesene Benzothiazole sind Transformationsprodukte industriell eingesetzter Benzothiazolen. Während in den 1970er- und 1980er-Jahren vorwiegend die Transformationsprodukte BT und MTBT detektiert wurden, rückte mit der Anwendung von HPLC in Kombination mit ESI-MS (Reemtsma 2000) zusätzlich BTSA in den Fokus von Untersuchungen.

Die beobachteten Konzentrationen von Benzothiazolen in behandelten Abwässern der Lederindustrie lagen bei bis zu 36 µg/L für MBT, 24 µg/L für MTBT und 5,5 µg/L für BT (Fiehn et al. 1994). Aktuellere Untersuchungen von behandeltem Abwasser einer Gerberei schlossen auch BTSA (77 µg/L) und weitere Benzothiazole (BT: 7,5 µg/L, OHBT: 3,9 µg/L, MTBT: 3,5 µg/L, MBT: 1,1 µg/L und ABT: 0,4 µg/L) mit ein (Reemtsma 2000). TCMTB wurde nicht detektiert. In die Umwelt eingetragene Abwässern aus der Reifenproduktion enthielten bis zu 60 µg/L BT und 30 µg/L MBT (Jungclaus et al. 1976). Diese Stoffe waren noch einige Kilometer flussabwärts in dem als Vorfluter dienenden Gewässer zu detektieren.

#### 3.5.2 Kommunale Kläranlagen

Zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalen Kläranlagen liegen keine systematischen Arbeiten vor, die über einen längeren Zeitraum Proben aus Zulauf, Ablauf und Zwischenstufen untersuchten. Die detektierten Benzothiazolgehalte wurden zumeist innerhalb von *screening*-Untersuchungen beobachtet (Ellis et al. 1982; Paxeus 1996; Paxeus & Schroeder 1996; Grohmann et al. 1998) und sind oft nur qualitativ bis semiquantitativ. Positive Befunde sind in den meisten Fällen auf Einleitung industrieller Abwässer ins kommunale Abwassernetz zurückzuführen. Oft ist dabei nicht klar, wie groß der industrielle Anteil im Abwasser ist. Rein kommunales Abwasser ohne industrielle Anteile wurde nur in einer Arbeit erwähnt (Ellis et al. 1982). Erfolgt die Ableitung kommunalen Abwassers über eine Mischkanalisation, kann Straßenablauf (s. u.) eine weitere Quelle für das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser sein. Auf diese Thematik gehen Zeng et al. (Zeng et al. 2004) ein.

Bei den im Ablauf von kommunalen Kläranlagen untersuchten Benzothiazolen handelt es sich nahezu ausschließlich um BT und MTBT. Untersuchungen auf andere Benzothiazole (MBT, MeBT oder MBTS) sind die Ausnahme (Krumwiede 2001). Quantifizierte Konzentrationen von BT und MTBT lagen unterhalb 1,5 µg/L (Paxeus 1996; Zeng et al. 2004). Ellis et al. (Ellis et al. 1982) findet in 5 von 10 Abläufen kommunaler Kläranlagen BT und MTBT, macht jedoch keine Aussage über deren Konzentration. Zu erwähnen ist, dass eine der untersuchten Kläranlagen mit rein kommunalem Abwasser gespeist wurde. Im Ablauf dieser Anlage konnten BT und MTBT nicht detektiert werden. Ob

dies auf zu hohe Bestimmungsgrenzen der verwendeten Analysenmethode zurückzuführen ist, wird nicht diskutiert. Bis dato bleibt unklar, ob rein häusliches Abwasser bzw. kommunales, von industriellen Einträgen freies Abwasser Benzothiazole enthält.

#### 3.5.3 Eintrag in die Umwelt durch Reifenabrieb bzw. Straßenablauf

Nicht nur direkte, punktuelle Emission durch industrielle oder kommunale Abwässer wurde beobachtet, sondern auch indirekter, diffuser Eintrag von Benzothiazolen in die Umwelt. Insbesondere sind dies Einträge aus der Nutzung von Gummiprodukten, besonders Autoreifen. Aus Reifenabrieb werden Benzothiazole bei Regenereignissen ausgewaschen und gelangen mit dem Straßenablauf ins kommunale Abwassersystem oder direkt in die Umwelt. Wiederum sind es nicht die ursprünglichen, während der Gummiherstellung verwendeten Substanzen, die detektiert werden, sondern Transformationsprodukte (BT, OHBT, MTBT) und stabile benzothiazolische Verunreinigungen (24MoBT, NCBA; Strukturformeln siehe Tabelle 3-1 auf S. 7) der Vulkanisationsbeschleuniger MoTBT und CBS (Spies et al. 1987; Reddy & Quinn 1997; Kumata et al. 2000; Krumwiede 2001; Kumata et al. 2002). Die Konzentration der Transformationsprodukte lag in Straßenablauf bei 0,1-1,2 µg/L BT, bis zu 0,16 µg/L MTBT, 0,7-6,9 µg/L OHBT und 0,1-0,3 µg/L 24MoBT (Reddy & Quinn 1997; Zeng et al. 2004). Bereits Spies et al. (Spies et al. 1987) fanden BT und MTBT in Straßenablauf, konnten diese Stoffe jedoch nur qualitativ bestimmen. Der Fokus ihrer Studie lag auf 24MoBT, ein Nebenprodukt der Synthese von MoTBT. 24MoBT ist stabiler als das Sulfenamid MoTBT und konnte dadurch in mit Straßenablauf kontaminierten Sedimenten und Böden nachgewiesen werden (bis zu 360 µg/kg Trockengewicht). Bodenproben, die direkt neben einem Highway entnommen wurden, wiesen 24MoBT-Konzentrationen bis zu 273 µg/kg auf.

Eine weitere Verunreinigung von Vulkanisationsbeschleunigern ist NCBA (Tabelle 3-1), das bei der Produktion des Sulfenamids CBS entsteht. Wie auch 24MoBT ist NCBA stabiler als das Sulfenamid. Kumata et al. (Kumata et al. 1997; Kumata et al. 2000; Kumata et al. 2002) untersuchte speziell 24MoBT und NCBA und konnte diese Stoffe in verschiedenen, mit Reifenabrieb kontaminierten Proben nachweisen (Reifenabrieb, Straßenstaub, partikuläre Fracht von Straßenablauf, Straßenablauf). Die Konzentrationen von 24MoBT und NCBA in Reifenabrieb und Straßenstaub reichten bis 2300  $\mu$ g/kg 24MoBT in Reifenabrieb (NCBA nicht bestimmt) und 10-490  $\mu$ g/kg 24MoBT und 15-1230  $\mu$ g/kg NCBA in Straßenstaub, wobei die Maximalkonzentrationen in Straßenstaub aus Tunneln gemessen wurden (Kumata et al. 1997; Kumata et al. 2000; Kumata et al. 2002). Die in Wasser gelöste Konzentration der beiden Stoffe ist gegenüber deren Konzentration in der partikulären Phase recht hoch, was aufgrund der log  $K_{OW}$ -Werte von 24MoBT (2,42) und NCBA (4,24) (Kumata et al. 2002) nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre. Die Konzentration von gelöstem 24MoBT in Straßenablauf betrug bis zu 0,42  $\mu$ g/L, die von NCBA betrug bis zu 0,51  $\mu$ g/L. Während der Anteil von partikulär gebundenem NCBA stärker und betrug zwischen 25 und 80 %. (Kumata et al. 2002).

### 3.5.4 Auftreten von Benzothiazolen in Oberflächengewässern

Oft sind die in Oberflächengewässern nachgewiesenen Benzothiazole auf den Eintrag aus industriellen Anlagen (Benzothiazolproduktion, Gummiindustrie, Gerbereien) oder auf Straßenablauf zurückzuführen. Jungclaus et al. (Jungclaus et al. 1976) erkannten schon in den 1970er-Jahren die

Problematik der Belastung von Oberflächengewässern mit Benzothiazolen. Im Zuge ihrer Arbeit über Abwässer aus der Gummiindustrie wurden auch die als Vorfluter dienenden Oberflächengewässer untersucht. Die Autoren fanden in industriellen Abläufen BT (60 µg/L) und MBT (30 µg/L) und konnten selbst einige Kilometer flussabwärts im Vorfluter noch 60-90 % dieser Konzentrationen detektieren.

Aufgrund deren unvollständiger Elimination während der Abwasserbehandlung detektierten auch Brownlee et al. (Brownlee et al. 1992) BT und MTBT im Vorfluter einer Kläranlage, die Abwasser aus der Produktion von Benzothiazolen erhält. Zwar nennen die Autoren keine absoluten Werte, berichten jedoch von deutlich sinkenden BT-Konzentrationen in Proben, die entlang des Vorfluters (ein kleiner Fluss) genommen wurden. MTBT zeigte keine Änderung der Konzentration.

In kleinen Fließgewässern und Gräben, in welche Straßenablauf eingeleitet wird, waren Benzothiazole präsent, aber deren Konzentration war relativ gering: BT bis 0,09  $\mu$ g/L; OHBT unter 0,05  $\mu$ g/L; 24MoBT unter 0,02  $\mu$ g/L (Reddy & Quinn 1997; Zeng et al. 2004).

Innerhalb einer umfangreichen *screening*-Studie an der Elbe (Fooken et al. 2000) wurde auch das Auftreten von MTBT untersucht. Im Vergleich zu den oben erwähnten Oberflächengewässern ist die Elbe ein sehr viel größerer Strom und es ist davon auszugehen, dass es nicht eine, sondern mehrere Emissionsquellen gibt. In allen Proben von 5 Beprobungspunkten entlang der Elbe und an den Mündungen der Zuflüsse Saale und Mulde wurde MTBT detektiert. Die Konzentrationen in den Proben von Elbe und Saale lagen zwischen 0,02 und 0,06 µg/L, die Konzentrationen in den Proben der Mulde betrugen 0,05 bis 380 µg/L (Mittelwert: 0,14 µg/L) betrugen. Die geringe Konzentrationsvariabilität entlang der Elbe spiegelt die ubiquitäre Verbreitung von MTBT wider. Der Fluss Mulde scheint eine zusätzliche Emissionsquellen aufzuweisen, worauf in der Studie jedoch nicht weiter eingegangen wird.

## 3.6 Biotransformationen

## Allgemeines zur Biotransformation organischer Stoffe

Der Antrieb zur Transformation organischer Stoffe durch Mikroorganismen hat prinzipiell zwei Gründe:

- Energiegewinnung (Bildung von ATP) und Deckung des f
  ür den Zellaufbau notwendigen Kohlenstoffbedarfs (Abbildung 3-4) und
- o Detoxifizierung von für den Organismus schädlichen Stoffen.

Zur Energiegewinnung und zum Zellaufbau haben Mikroorganismen Werkzeuge (Enzyme) entwickelt, die in erster Linie der Nutzbarmachung von Nährstoffen (Fette, Kohlenhydrate, Proteine) dienen. Unter den zahlreichen Enzymen gibt es auch weniger spezifische, die nicht nur die Reaktion ganz bestimmter Edukte katalysieren, sondern auch für strukturell ähnliche Stoffe zugänglich sind. Dies ermöglicht die Transformation von nicht natürlichen, so genannten xenobiotischen Stoffen in solche, wie sie im Metabolismus von Organismen natürlich vorkommen oder ihnen ähnlich sind. Im Idealfall werden xenobiotische Stoffe vollständig abgebaut (mineralisiert). Transformationsprodukte, die nicht weiter abgebaut werden, heißen *dead-end*-Metabolite (Schwarzenbach et al. 1993; Van Agteren et al. 1998). Neben Enzymen, die der Metabolisierung von Nährstoffen dienen, können Organismen auch

ein Spektrum von unspezifischen Enzymen besitzen, die der Detoxifizierung unerwünschter oder schädlicher Stoffe dienen (Schwarzenbach et al. 1993).

In ersten, initiierenden Schritten wird komplexes organisches Material in kleinere Einheiten gespalten. Eine bedeutende Rolle spielen hier Hydrolasen, die beispielsweise Etherbindungen oder Ester hydrolysieren und so neben einer Zerstückelung großer Moleküle unter Bildung von Carbonsäuren und Alkoholen eine Vereinheitlichung des organischen Stoffgemisches bewirken. Der weitere Abbau organischer Stoffe verläuft vorwiegend über Oxidationsreaktionen. Hierdurch bereits gewinnen Mikroorganismen Energie und die Substrate werden gleichzeitig zu polareren Transformationsprodukten aktiviert. Der Einbau von Sauerstoff und die Folgeschritte haben das Ziel, Substrate so zu transformieren, dass sie dem Metabolismus zugeführt werden können. Entsteht trotzdem ein *deadend*-Metabolit, kann dieser durch die erhöhte Polarität einfacher in den wässrigen extrazellulären Raum überführt und ausgeschieden werden (Schwarzenbach et al. 1993).

Beim biologischen Abbau organischer Materie werden in Abhängigkeit der Milieubedingungen drei grundlegende Abbauprinzipien unterschieden:

- o aerober Abbau,
- o anoxischer Abbau,
- o anaerober Abbau.

Beim **aeroben** Abbau fungiert molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) als Elektronen-Akzeptor. Das RedOx-Paar  $O_2/H_2O$  hat ein hohes RedOx-Potential von 0,82 V (25 °C; pH 7) (Lehninger 1987; Van Agteren et al. 1998) wodurch der Energiegewinn höher ist als bei Verwendung anderer Elektronen-Akzeptoren. Den Einbau von  $O_2$  in ein Substrat katalysieren Oxygenasen (Monooxygenasen, Dioxygenasen).

Beim **anoxischen** Abbau (teilweise auch als anaerobe Atmung bezeichnet) wird zur Oxidation eines organischen Substrats chemisch gebundener Sauerstoff in das Substrat übertragen. Die Verbindung, aus welcher der Sauerstoff stammt, dient als Elektronen-Akzeptor und wird demnach reduziert. Hierzu zählen:

- NO<sub>3</sub> Denitrifikation; Nitrat wird zu molekularem Stickstoff reduziert
- SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Sulfat wird zu molekularem Schwefel oder Wasserstoffdisulfid reduziert
- Mn<sup>4+</sup> oder Fe<sup>3+</sup> Reduktion der Metalle zu Mn<sup>2+</sup> bzw. Fe<sup>2+</sup>
- CO<sub>2</sub> Kohlendioxid wird zu Methan oder Essigsäure reduziert

Unter den **anaeroben** Abbau fallen die Gärprozesse. Bei der Gärung dienen Spaltprodukte des organischen Substrats als Elektronen-Donatoren und als Elektronen-Akzeptoren. Voraussetzung für die Vergärbarkeit organischer Substrate ist die Möglichkeit, das Substrat durch intramolekulare Spaltung in einer exergonen Reaktion teilweise zu oxidieren (Schlegel 1992). Vergärbar sind beispielsweise Polysaccharide, organische Säuren u. a. Nicht anaerob abbaubar sind hingegen aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Steroide, Carotinoide und Terpene (Stoffe, die vorwiegend aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen). Im Naturhaushalt sorgen zur Gärung befähigte Mikroorganismen für den einleitenden Abbau von Biopolymeren (z. B. Cellulose). Einige typische Gärungsprodukte sind kurzkettige Alkohole, kurzkettige Carbonsäuren, Kohlendioxid und Methan.



Abbildung 3-4: Schema zum biologischen Abbau organischer Stoffe.

Da Benzothiazole aromatische Verbindungen sind, wird an dieser Stelle der biologische Abbau von Aromaten kurz dargestellt.

### 3.6.1 Abbau von Aromaten

Nach Glykosylgruppen sind Benzolringe (Hauptstrukturbestandteil von Lignin) die zweithäufigste strukturelle Einheit, die in der Natur anzutreffen ist (Bosma et al. 2001). Es verwundert daher nicht, dass aromatenabbauende Mikroorganismen weit verbreitet sind. Der Abbau kann unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen ablaufen. In beiden Fällen müssen aromatische Ringsysteme zunächst aktiviert werden.

Beim aeroben Abbau von Aromaten fungiert O2 nicht nur als Reaktand zur Aktivierung des aromatischen Ringes, sondern ist auch an der Ringspaltung beteiligt. Die Aktivierung geschieht überwiegend durch Bildung eines Catechols. Diese Strategie erscheint sehr ökonomisch, da sie viele aromatische Substrate einem zentralen, katabolischen Weg zuführt. Dieser ist in Abbildung 3-4 am Beispiel von Benzol dargestellt. Nach Schwarzenbach et al. (Schwarzenbach et al. 1993) induzieren Dioxygenasen in einem Sauerstoffmolekül einen Dipol. Der dadurch elektrophile Sauerstoff kann mit dem  $\pi$ -Elektronensystem der aromatischen Verbindung in Wechselwirkung treten und eine Doppelbindung im aromatischen System aufbrechen. Sauerstoff wird vom Aromaten addiert, wodurch ein peroxidisches Intermediat entsteht. Dieses wird zu einem cis-Dihydrodiol reduziert und weiter, unter dem Einfluss von Dehydrogenasen, zum Catechol rearomatisiert (Van Agteren et al. 1998). Prokaryoten erreichen die Bildung des Catechols zumeist mittels Dioxygenasen. Bei Eukaryoten sind es Monooxygenasen, die als Zwischenstufe ein Epoxid generieren, aus welchem durch Hydrolyse ein trans-Dihydrodiol entsteht (Bosma et al. 2001). Der aktivierte Ring (das Catechol in Abbildung 3-4) kann auf zwei Arten gespalten werden: ortho-Spaltung (intradiol) bzw. meta-Spaltung (extradiol). Von der Art der Bakterienstämme und der Struktur des Substrates ist abhängig, an welcher Position die Spaltung erfolgt. Produzieren die Mikroorganismen das Enzym Catechol-1,2-Dioxygenase (C12D), so erfolgt ortho-Spaltung. Wenn dagegen Catechol-2,3-Dioxygenase (C23D) gebildet wird, so kommt es zur meta-Spaltung. Auch die gleichzeitige Bildung beider Enzyme durch einen Mikroorganismus wurde beobachtet, wodurch beide Spaltvarianten parallel ablaufen (Haroune et al. 2002). Die **ortho-Spaltung** (Abbildung 3-4) führt über eine cis,cis-Muconsäure zu einer 3-Ketoadipinsäure. Diese übernimmt CoA (Co-Enzym A) von Succinyl-CoA unter Bildung des Esters 3-Ketoadipinsäure-S-CoA. Durch Spaltung entstehen hieraus Acetyl-CoA und Succinat, die dem Citratcyclus zugeführt werden können (Van Agteren et al. 1998). Die **meta-Spaltung** verläuft über Hydroxymuconsäure-Semialdehyd zur 4-Hydroxy-2-oxovaleriansäure. Durch deren Spaltung entstehen Acetaldehyd und Pyruvat. Interessanterweise wird für die Folgereaktionen der ortho- und der meta-Spaltung kein zusätzlicher Sauerstoff benötigt (Bosma et al. 2001).



Abbildung 3-5: Mikrobielle Metabolisierung von Benzol unter aeroben Bedingungen. Abbildung in Anlehnung an (Van Agteren et al. 1998; Bosma et al. 2001).
Der Abbau von Aromaten unter anoxischen und anaeroben Bedingungen ist, obgleich facettenreicher, weniger häufig. (Van Agteren et al. 1998; Bosma et al. 2001). Im Gegensatz zum aeroben Abbau sind die Abbauwege bei anoxischem und anaerobem Abbau weniger konvergent. Dennoch ist Cyclohexanon in einigen Abbauwegen ein zentraler Metabolit.

#### 3.6.2 Biotransformation von Benzothiazolen

Verglichen mit dem Informationsangebot in Fachliteratur bezüglich des biologischen Abbaus aromatischer Verbindungen, ist über das Verhalten von Benzothiazolen beim mikrobiellen Abbau vergleichsweise wenig bekannt, obgleich erste Untersuchungen hierzu bereits Mitte der 1970er-Jahre durchgeführt wurden (Mainprize et al. 1976; Chudoba et al. 1977).

Grundsätzlich lassen sich wissenschaftliche Arbeiten hinsichtlich der Biotransformationen von Benzothiazolen in drei Teilbereiche untergliedern:

- o Transformationen bei Inkubation mit Mischkulturen,
- Transformationen bei Inkubation mit isolierten Stämmen und
- Transformationen in der Umwelt.

Neben der Unterscheidung der Bedingungen, unter welchen Benzothiazole biotransformiert werden, muss auch immer zwischen Transformation, Abbau und Elimination unterschieden werden. Dies ist wichtig, da **Transformation** lediglich die Überführung eines Substrates in eine andere chemische Verbindung bedeutet. Eine Transformation kann gleichwohl mehrere Schritte umfassen, wobei nicht notwendigerweise alle bekannt bzw. ersichtlich sein müssen. Der Begriff **Elimination** beschreibt das Verschwinden eines Substrates, wobei das Substrat nicht zwangsläufig mineralisiert werden muss, sondern unter Umständen nur transformiert wird. Der **Abbau** eines Substrates hingegen meint die vollständige Mineralisierung eines Substrates zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O und stellt damit einen Sonderfall der Elimination und Transformation dar.

#### 3.6.3 Biotransformation bei Inkubation mit Mischkulturen

In Tabelle 3-3 sind wissenschaftliche Publikationen danach sortiert, ob Benzothiazole als persistent, als transformierbar oder als mineralisierbar eingestuft wurden. Wie unterschiedlich die Transformationsreaktionen bei Inkubation mit gemischten Kulturen interpretiert wurden, zeigt Abbildung 3-6, woraus deutlich wird, dass nur wenige Transformationen allgemeingültig sind. Im Folgenden sind die wichtigsten Erkenntnisse geschildert.

Erste Untersuchungen zur Biotransformation von Benzothiazolen (darunter OHBT, ABT, MBT, MTBT und BTSA) mit Belebtschlamm ergaben, dass lediglich **OHBT** biologisch abbaubar ist (Chudoba et al. 1977). **ABT** unterlag moderater chemischer Oxidation, die anderen untersuchten Stoffe erschienen den Autoren als persistent. Diese Ergebnisse resultieren aus Bestimmungen des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) von Proben aus der Inkubation von Benzothiazolen (100 mg/L) mit adaptiertem Belebtschlamm. In weiteren Studien mit ähnlich hohen Benzothiazolkonzentrationen konnte neben OHBT auch die Mineralisierung weiterer Benzothiazole gezeigt werden (Mainprize et al. 1976; Gaja & Knapp 1997). In diesen Studien wurde auch die Mineralisierung von **BTSA** und **BT** beobachtet. Gaja und Knapp (Gaja & Knapp 1997) stellten weiterhin die Mineralisierung von **ABT** fest. Für **MBT** fanden sie lediglich geringe Transformation, wohingegen MBT in den Versuchen von

Mainprize et al. (Mainprize et al. 1976) mineralisiert wurde. Auch in Experimenten von Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) zeigt MBT nur geringe Transformationsneigung (10 %), wobei MBT zu **MTBT** transformiert wurde. BT und **TCMTB** wurden ebenfalls biologisch transformiert. BT wurde vollständig abgebaut, TCMTB wurde zu MBT (95 %) und MTBT (5 %) transformiert. In Übereinstimmung mit Chudoba et al. (Chudoba et al. 1977) stellt MTBT in den Versuchen von Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) einen *dead-end*-Metaboliten dar, was von dritter Seite bestätigt wurde (Hutchins et al. 1984; Brownlee et al. 1992). Lediglich eine Publikation ist benannt, in welcher Transformation von MTBT beobachtet wurde (Liu et al. 1983 zitiert in (De Wever et al. 2001)).

	Persistenz	Transformation	Mineralisierung
MBT	(Chudoba et al. 1977)	(Gaja & Knapp 1997) (Reemtsma et al. 1995) (De Wever & Verachtert 1994)	(Mainprize et al. 1976)
ОНВТ			(Chudoba et al. 1977) (Mainprize et al. 1976) (Gaja & Knapp 1997)
ABT	(Chudoba et al. 1977)	(Chudoba et al. 1977)	(Gaja & Knapp 1997)
вт		(Reemtsma et al. 1995)	(Mainprize et al. 1976) (Gaja & Knapp 1997) (Reemtsma et al. 1995) (De Wever & Verachtert 1994)
BTSA	(Chudoba et al. 1977)		(Mainprize et al. 1976) (Gaja & Knapp 1997) Dissertation von De Wever 1995 zitiert in (De Wever et al. 2001)
МТВТ	(Chudoba et al. 1977) (Reemtsma et al. 1995) (Brownlee et al. 1992) (Hutchins et al. 1984)	Liu et al. 1983 zitiert in (De Wever et al. 2001)	
ТСМТВ		(Reemtsma et al. 1995)	

Tabelle 3-3: Einteilung der Befunde über die Abbaubarkeit von Benzothiazolen bei Inkubation mit Mischkulturen.

Zur Biotransformation von **MBT** gibt es sehr unterschiedliche Beobachtungen. Bei der Elimination von MBT zeigten sich positive Effekte, wenn gleichzeitig BT vorhanden war. Selbst bei MBT-Konzentrationen von 150 mg/L erfolgte noch Elimination der Benzothiazole (De Wever & Verachtert 1994). Hingegen hemmte MBT den Abbau von BTSA (De Wever et al. 2001). Bei anderen Inkubationen von MBT wiederum wurde die Bildung von MBTS, von BTSA oder anderer nicht identifizierter, persistenter Metabolite beobachtet (De Wever et al. 2001).

Hinsichtlich der Biotransformation von **BTSA** führt De Wever aus (De Wever et al. 2001), dass BTSA bei Inkubation mit adaptiertem Belebtschlamm als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle fungiert und die Eliminationsraten bei steigenden BTSA-Konzentrationen ebenfalls ansteigen. Diese Beobachtung wird unterstützt von Mainprize et al. (Mainprize et al. 1976), der sogar den vollständigen Abbau von BTSA beobachtete. Dem stehen Untersuchungen gegenüber, in welchen BTSA als nicht oder nur schwer abbaubar erscheint (Chudoba et al. 1977; Reemtsma 2000).



#### 3.6.4 Biotransformationen in der Umwelt

Der Biotransformation von Benzothiazolen in der Umwelt oder unter simulierten Umweltbedingungen wurde bislang wenig Beachtung geschenkt. Eine Zusammenfassung lieferten De Wever et al. (De Wever et al. 2001). Die Resultate bisheriger Untersuchungen sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

#### Straßenablauf

Um natürliche Prozesse zu simulieren, dotierten Reddy et al. (Reddy & Quinn 1997) Wasser aus einem Absetzbecken für Straßenablauf mit **BT** und **OHBT** bis zu einer Konzentration von 15 µg/L. Nach 8 Tagen waren 60 % des eingesetzten BT zu OHBT transformiert. Zunächst hielten die Autoren OHBT in dem von ihnen untersuchten System für ein Endprodukt im Abbau von BT. In Wiederholversuchen mit weiteren Wasserproben trat dieser Befund so jedoch nicht wieder auf. Von OHBT konnten lediglich Spuren detektiert werden und nach 30 Tagen waren BT und OHBT nicht mehr detektierbar (Abbildung 3-7). Reddy et al. (Reddy & Quinn 1997) führten dies auf die jahreszeitliche Abhängigkeit der Bakterienpopulation und den unterschiedlichen Salzgehalt in den Wasserproben zurück. Andere Gründe, warum im ersten Versuch die Transformation von BT zu OHBT hoch war und warum OHBT nur schlecht abgebaut wurde, waren den Autoren nicht ersichtlich. Die Autoren bestimmten bei ihren Untersuchungen das Konzentrationsverhältnis von BT/OHBT. In wässrigen Auslaugungen von Reifengummi war dieses Verhältnis größer als in Proben aus Straßenablauf-Absetzbecken. Hieraus schlossen die Autoren auf einen schnelleren Abbau von BT gegenüber OHBT und/oder auf Transformation von BT zu OHBT.



Abbildung 3-7: Biotransformation von Benzothiazolen in der Umwelt.

(1) (Reddy & Quinn 1997) (2) (Brownlee et al. 1992) (3)(Reemtsma et al. 1995)

(4)(Hutchins et al. 1984)

\* : TCMTB ist unter Einfluss von UV-Strahlung leicht abiotisch zu hydrolysieren, was unter Umweltbedingungen miteinbezogen werden muss; außerdem rasche Transformation zu MBT unter aeroben Bedingungen (batch-Versuche mit Belebtschlamm als Inokolum)

Darstellung in Anlehnung an eine Abbildung von De Wever et al. (De Wever et al. 2001).

#### Bodensäulen

Den Abbau von Benzothiazolen in Bodensäulen untersuchten Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) und beschickten Säulen mit Benzothiazol-Lösungen zwischen 15 und 30  $\mu$ g/L. Abbau von **MTBT** wurde nicht beobachtet, auch nicht mit adaptierten Bodensäulen. Lediglich in der Anfangsphase des Experimentes lag die Ablaufkonzentration deutlich niedriger als die Konzentration der aufgegebenen Lösung, was wohl auf die Adsorption von MTBT an die Sedimente oder den ausgebildeten Biofilm zurückzuführen ist. Diese Resultate decken sich mit Bodensäulenversuchen von Hutchins et al. (Hutchins et al. 1984), die ebenfalls den Abbau von MTBT in Bodensäulen untersuchten. Dazu wurden Bodensäulen mit Lösungen, die MTBT im  $\mu$ g/L- bis mg/L-Bereich enthielten, beschickt. Abbau von MTBT, eingesetzt als Primärsubstrat oder als Co-Substrat, konnte nicht beobachtet werden.

Anders als bei dem Abbauversuch mit MTBT beobachteten Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) eine rasche Adaption der Bakterienpopulation der Bodensäulen an **MBT**. Anfängliche Gehalte von MBT im Ablauf der Bodensäulen nahmen während der Adaptionsphase ab und nach ca. 10 Tagen enthielt der Ablauf der Bodensäulen kein MBT mehr. Jedoch stieg die Konzentration von MTBT im Ablauf an, nachdem in den ersten Tagen nur sehr geringe Konzentrationen von MTBT (Adaptionsphase, Adsorption) im Ablauf detektiert wurden. Die MTBT-Konzentration im Ablauf stieg zwischenzeitlich sogar auf die stöchiometrisch doppelte Zulaufkonzentration, was die Autoren auf eine Verdrängung von MTBT von den Sorptionsplätzen durch organisches Material zurückführten. Hier spielt möglicherweise auch der Bewuchs der Oberfläche mit Biofilm eine Rolle. Die MTBT-Konzentration im Ablauf pendelte sich schließlich in Höhe der molaren Zulaufkonzentration von MBT ein, was auf eine vollständige Methylierung von MBT hindeutet. S-Methylierung speziell von MBT wurde auch von Brownlee et al. (Brownlee et al. 1992) (s. u.) und von Thiolen im Allgemeinen von Drotar et al. (Drotar & Fall 1985; Drotar et al. 1987) beschrieben.

Im Ablauf der mit **BT** beschickten Bodensäulen wurde weder BT noch ein anderes Benzothiazol detektiert und auch die Überprüfung des Sedimentes der Bodensäule ergab keinen Hinweis auf sorbierte Benzothiazole, woraus auf vollständigen Abbau von BT geschlossen wurde (Reemtsma et al. 1995).

#### Oberflächengewässer

Die Resultate von Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) (s. o.) sind in Übereinstimmung mit durchgeführten Feldversuchen an einem kleinen Wasserlauf in Kanada, in welchen indirekt Abläufe chemischer Industrie eingeleitet wurden (Brownlee et al. 1992) (Angaben über Stoffkonzentrationen im Fließgewässer wurden nicht gemacht, diese sind in einer uns nicht zugänglichen Veröffentlichung aufgeführt). Die **BT**-Konzentrationen im Wasserlauf reduzierten sich innerhalb weniger Stunden um Größenordnungen, während die Konzentration von **MTBT** nur sehr langsam zurückging. Für das Vorhandensein von MTBT im industriellen Abwasser hatte der Autor keine Hinweise, wohl aber für das Vorhandensein von **MBT**, als Hydrolyseprodukt von TCMTB. Zwar gelang die Bestätigung der Genese von MTBT aus MBT durch Inkubation von MBT mit Sediment des untersuchten Fließgewässers, allerdings war der Umsatz der Bio-Methylierung gering. Ob eine etwaige direkte Umsetzung (biotisch oder abiotisch) von TCMTB zu MTBT erfolgt, konnten die Autoren nicht klären.

## 3.6.5 Biotransformation bei Inkubation mit Reinkulturen

Untersuchungen zum Abbau organischer Stoffe mit Reinkulturen liefern grundlegende Erkenntnisse in zweierlei Hinsicht. Zum einen werden Mikroorganismen identifiziert, welche die für den Abbau eines bestimmten Substrates erforderlichen Enzyme produzieren bzw. sich adaptieren können. Zum anderen lässt sich mit diesen Mikroorganismen der Abbauweg detaillierter untersuchen.

#### Benzothiazolabbauende Mikroorganismen

Einen Überblick über bisher gezüchtete Reinkulturen, die Benzothiazole abbauen, geben De Wever et al. (De Wever et al. 2001). Die grundlegenden Erkenntnisse sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Bei den benzothiazolabbauenden Mikroorganismen handelt es sich überwiegend um Rhodococcus Subspezies. Die ersten Reinkulturen wurden für die Benzothiazole OHBT, BT und ABT isoliert (De Wever et al. 1997; Gaja & Knapp 1997; De Wever et al. 1998). Das Auffinden bzw. Züchten von Reinkulturen, die BTSA, MBT und MTBT als Primärsubstrat akzeptieren, gestaltete sich schwieriger. De Wever et al. (De Wever et al. 1998) gelang schließlich die Isolierung eines BTSAabbauenden Stammes. Die Suche nach MBT-abbauenden Reinkulturen in Inkubationen von Mischkulturen mit MBT als alleinigem Substrat blieb lange Zeit erfolglos. Darüber hinaus inhibierte MBT teilweise den Abbau anderer Benzothiazole, wenn es als Co-Substrat eingesetzt wurde (De Wever et al. 1998). Zwar zeigte Drotar bereits 1987 (Drotar et al. 1987) mögliche Transformationen von MBT mit Hilfe von Isolaten von Pseudomonas sp. und Escherichia coli sp., jedoch war das Transformationsprodukt MTBT ebenfalls schlecht biologisch abbaubar. Haroune et al. (Haroune et al. 2004) gelang schließlich die Adaption des Stammes OBT18 (isoliert von (De Wever et al. 1997)) an MBT. Über MTBT-abbauende Stämme liegen keine Ergebnisse vor. Ähnliches gilt für den Abbau von MBTS mit Reinkulturen. Hier kommt erschwerend hinzu, dass das hydrophobe MBTS vorwiegend an partikuläres Material sorbiert, was die Verfügbarkeit dieses Stoffes für Mikroorganismen erschwert.

Analyt	Stamm / Isolat	Autoren	Bemerkung
BTSA	(n. i.) Rhodococcus erythropolis / BTS0₃1	(De Vos, De Wever, Bryon et al. 1993) (De Wever et al. 1998)	Kombination zweier Isolate
ОНВТ	Rhodococcus erythropolis / BTS0 <sub>3</sub> 1 Rhodococcus rhodochrous / OBT18 Rhodococcus rhodochrous / PA	(De Wever et al. 1998) (De Wever et al. 1997) (Gaja & Knapp 1997)	
вт	Rhodococcus erythropolis / BTS0₃1 (n. i.) Rhodococcus rhodochrous / PA	(De Wever et al. 1998) (De Wever et al. 1997) (Gaja & Knapp 1997)	
ABT	Rhodococcus rhodochrous / TA Rhodococcus rhodochrous / OBT18	(Gaja & Knapp 1997) (Haroune et al. 2001)	
МТВТ	(n. i.)	(De Wever et al. 2001)	Liu et al. 1983 in De Wevers Publikation
MBTS	Sulfobacillus disulfidooxidans	(De Wever et al. 2001)	Dufresne 1996 in De Wevers Publikation
МВТ	Rhodococcus rhodochrous / OBT18	(Haroune et al. 2004)	

(n. i.) Mikroorganismus wurde nicht identifiziert

#### Untersuchungen zum Abbauweg

Der Abbauweg von Benzothiazolen bei Inkubation mit Reinkulturen wurde bislang kaum untersucht. Die derzeit vorliegenden gesicherten Informationen fasst Abbildung 3-8 zusammen. Für BT wurde mit verschiedenen Stämmen eine Umsetzung zu OHBT gezeigt (De Wever et al. 1997; De Wever et al. 1998). Besse et al. (Besse et al. 2001) beobachteten vollständige Umsetzung bei Inkubation von BT mit *R. erythropolis*. Bei der Inkubation mit *R. rhodochrous* hingegen schien kein OHBT gebildet zu werden, vielmehr erfolgte eine direkte Umsetzung zu 2,6-Dihydroxybenzothiazol (2,6-diOHBT). Die Bildung von 2,6-diOHBT wurde auch bei der Inkubation von OHBT beobachtet (De Wever et al. 1997; De Wever et al. 1998).

Auch der Abbauweg von BTSA mit dem Isolat *BTSO*<sub>3</sub>1 mündet, nach anaerober Transformation zu OHBT, schließlich in den Abbauweg von BT und OHBT. Da der erste Schritt unter anaeroben Bedingungen abläuft, ist anzunehmen, dass Desulfonierung und Hydroxylierung parallel bzw. in einem Schritt erfolgen, da sich ansonsten BT akkumulieren würde (De Wever et al. 1998).

Bei Inkubation von BT und OHBT mit *R. rhodochrous PA* fanden Gaja und Knapp (Gaja & Knapp 1997) keine Aktivität des für die ortho-Spaltung katalysierenden Enzyms C12D (Catechol-1,2-dioxygenase). Hingegen stellten die Autoren ausgeprägte Aktivität des Enzyms C23D (Catechol-2,3-dioxygenase) fest, welches die meta-Spaltung katalysiert. Für den Abbau von BT und OHBT schlossen die Autoren auf eine Ringspaltung in meta-Stellung und den sukzessiven Abbauweg.



Abbildung 3-8: Konvergierender Metabolisierungspfad dreier Benzothiazole.

Die Erkenntnisse zum Abbau von Benzothiazolen sind im Einklang mit allgemeingültigen Beobachtungen, den Abbau von Heterocyclen betreffend. Gewöhnlich verläuft die Metabolisierung von Heterocyclen über eine Ringspaltung nach vorheriger Hydroxylierung (De Wever et al. 1998). Sind 5-Ringe and 6-Ringe gekoppelt, so werden in aller Regel zuerst die 5-Ringe gespalten. Offensichtlich ist es für einige Mikroorganismen günstiger, beim Abbau von Benzothiazolen nicht den Thiazolring zu spalten, sondern nach Hydroxylierung des 5-Ringes auch noch den 6-Ring zu aktivieren. Möglicherweise wirkt die Konstellation der Heteroatome in Benzothiazolen einer einfachen Spaltung des heterocyclischen Teiles entgegen. Der weitere Verlauf der Metabolisierung von Benzothiazolen, insbesondere die Spaltung des aromatischen Systems, ist bislang ungeklärt.

## 3.7 Elimination von Benzothiazolen in der Abwasserbehandlung

Trotz der weiten Verbreitung von Benzothiazolen in industriellen Prozessen und bei der Produktion von Konsumgütern (vorwiegend Gummiprodukten) und trotz der Detektion von Benzothiazolen in Zulauf sowie in Ablauf selbst von kommunalen Kläranlagen (s. o.) gibt es keine umfassende Studie über deren Elimination während der Abwasserbehandlung. Dies war in erster Linie auf das Fehlen geeigneter Analysenmethoden, die es erlaubten auch polare Transformationsprodukte zu detektieren, zurückzuführen. Erst nach der Entwicklung einer Analysenmethode auf Basis von LC-ESI-MS/MS (Reemtsma 2000) war dies möglich.

Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995; Reemtsma et al. 2002) untersuchten industrielle Kläranlagen von Gerbereien und ermittelten die Konzentrationen einer ganzen Reihe von Benzothiazolen in Zu- und Ablauf und konnten dadurch auf Eliminationsraten schließen. Das Spektrum der Analyte reicht von Benzothiazolen mit stark ionischem Charakter (BTSA und ABT) über polare (MBT, BT, OHBT) bis zu unpolaren Benzothiazolen (MTBT). Die untersuchten Gerbereiabwässer enthielten aufgrund der Verwendung von TCMTB hohe Konzentrationen an MBT (bis 1 200 µg/L (Reemtsma et al. 1995)), das über 90 % der Benzothiazolfracht (bezogen auf die erfassten Benzothiazole) ausmacht. Die Gesamteliminationsraten lagen nur zwischen 60 und 90 %, was aufgrund der hohen Zulaufkonzentration eine beträchtliche Freisetzung von Benzothiazolen in die aquatische Umwelt bedeutet.

Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 1995) untersuchten ferner die Behandlung von Abwasser zweier Gerbereien mittels konventioneller Belebtschlammbehandlung. Die Elimination von MBT betrug 85 bzw. 93 %, was bei einer Zulaufkonzentration von 551 bzw. 1152 µg/L als gut angesehen werden kann. Innerhalb dieser Studie wurden neben MBT die Benzothiazole BT und MTBT erfasst. Diese

verhielten sich sehr unterschiedlich. In einer der beiden Kläranlagen wurde eine höhere Konzentration von BT im Ablauf (ca. 130  $\mu$ g/L) als im Zulauf (ca. 65  $\mu$ g/L) detektiert, während gleichzeitig die MTBT-Konzentration von ca. 90  $\mu$ g/L im Zulauf um ca. 70 % abnahm. Die andere untersuchte Anlage enthielt im Ablauf eine höhere MTBT-Konzentration (ca. 180  $\mu$ g/L) als im Zulauf (kleiner 10  $\mu$ g/L). BT war hier weder im Zu- noch im Ablauf in signifikanter Konzentration zu detektieren.

Die jüngere Studie von Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 2002) untersucht die Behandlung von Gerbereiabwasser mittels eines Membranbioreaktors. Hier war die Elimination von MBT nahezu vollständig (99,9 %; Zulaufkonzentration 590 µg/L). Die Entfernung von BT war dagegen unvollständig (37 %; Ablaufkonzentrationen zwischen 0-5 µg/L). Die Konzentration in Zu- und Ablauf der in dieser Studie miterfassten Benzothiazole MTBT, OHBT und ABT lagen unter 10 µg/L, die Konzentrations-änderungen dieser Stoffe während der Abwasserbehandlung waren nicht signifikant. BTSA, das in dieser Studie ebenfalls erfasst wurde, zeigte eine Konzentrationszunahme auf das Dreifache, von 29 µg/L im Zulauf auf 85 µg/L im Permeat des Membranbioreaktors.

Offensichtlich ist die Elimination von Benzothiazolen nicht einheitlich. Während die reaktiveren Verbindungen MBT, ABT und OHBT entfernt werden bzw. bezogen auf deren Konzentration eine untergeordnete Rolle spielen, sind es die weniger reaktiven Benzothiazole MTBT und BTSA und in geringerem Maße auch BT, deren Konzentration während der Abwasserbehandlung zunimmt. Dabei liegt nahe, dass insbesondere die Art der Abwasserbehandlung eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt.

Wird industrielles Abwasser dem kommunalen Abwassersystem zugeführt, werden die Benzothiazole mutmaßlich verdünnt. Bei kommunalen Anlagen muss von einer weniger gut an Benzothiazole adaptierten Biozönose ausgegangen werden, was, zusammen mit dem hohen Nährstoffangebot leicht abbaubarer Stoffe in kommunalem Abwasser, zu einer Verschlechterung des Abbaus von Benzothiazolen führen kann. Andererseits ist auch eine Verbesserung des Abbaus denkbar, wenn co-metabolische Prozesse aufgrund des hohen Nährstoffangebotes unterstützt werden oder wenn eine geringere Hemmung benzothiazolabbauender Mikroorganismen erfolgt.

Eine Ausweitung der Untersuchungen zum Auftreten von Benzothiazolen in Abwässern ist nicht nur bezogen auf ein umfassenderes Analytspektrum (polare Analyte, Transformationsprodukte usw.) geboten. Auch sollten kommunale Kläranlagen in zukünftigen Studien größere Beachtung finden. Dies bedarf jedoch der Entwicklung leistungsfähiger Analysenmethoden und der Erforschung weiterer, möglicherweise stabiler Transformationsprodukte.

# 4 Material und Methoden

## 4.1 Chemikalien

Reinstwasser wurden hergestellt mittels einer Aufbereitungsanlage des Typs *ELGA Maxima HPLC Ultra Pure Water* der Firma *Elga* (Ubstadt-Weiher, Deutschland).

Benzothiazol (BT; 96 %), 2-Hydroxybenzothiazole (OHBT; 98 %), Glutathion (GSH; 98 %) in reduzierter Form und Benzothiazol-6-carbonsäure (BTCA; 96 %) wurden von *Sigma-Aldrich Chemie* (Steinheim, Deutschland) bezogen und 2-Mercaptobenzothiazol (MBT; p.a.) von *Merck* (Darmstadt, Deutschland). 2-Aminobenzothiazol (ABT; 98 %) wurde bei *Fluka Chemie* (Buchs, Schweiz) gekauft und 2-Methylthiobenzothiazol (MTBT; pure) von *Ferak* (Berlin, Deuschland). Benzthiazolsulfonsäure (BTSA) wurde freundlicherweise von Frau Helen De Wever (Mol, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Lösungsmittel (Methanol; Aceton, Ameisensäure u.ä.) und weitere Reagenzien (Ammoniumacetat, Tributylamin u.ä.) waren generell von höchster kommerziell erhältlicher Reinheit.

## 4.2 Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer HPLC-Anlage des Typs *HP 1100* (*Agilent*, Waldbronn, Deutschland) und bestand aus einem Vakuumentgaser, einer binären Hochdruckgradientenpumpe, einem automatischen Probengeber, einem Säulenofen und einem Diodenarray-Detektor mit Halbmikrodurchflussküvette. Abhängig von den Experimenten wurde bei den Analysen zusätzlich zum MS-Signal teilweise auch das Signal des Diodenarray-Detekorts aufgezeichnet.

#### 4.2.1 Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC)

Die Trennung von BTSA, MBT, OHBT und ABT, BT, MTBT erfolgte in zwei getrennten Läufen. Von den im Folgenden aufgelisteten Parametern wurden lediglich die Gradienten entsprechend des Probenmaterials leicht verändert. Äußerst starke Matrixbelastung der Probe bzw. des Extraktes erforderte gelegentlich Gradienten mit höherem Organik-Anteil. Die Parameter der chromatographische Trennung sind ferner an anderer Stelle wiedergegeben (Kloepfer, Jekel et al. 2004).

Die im negativen ESI-Modus detektierten Analyte BTSA, MBT und OHBT wurden getrennt mittels einer *Super-Sphere 100 C18e* Säule (3 mm x 125 mm; 4 µm Partikelgröße) von *Knauer* (Berlin, Deutschland). Die Eluenten bestanden aus H<sub>2</sub>O/Methanol 85:15 (A) und 10:90 (B). Beide Eluenten enthielten Ammoniumacetat in einer Konzentration von 10 mM. Das Gradientenprgramm war: 0 min 15 % B; 9 min 75 % B, 9,5 min 15 B 14 min 15 % B. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 0,5 mL/min und einer Temperatur von 40 °C. Das injizierte Probenvolumen betrug 60 µL.

Bei ABT, BT und MTBT, die im positiven ESI-Modus detektiert werden, erfolgte die Trennung über eine *Euro-Sphere C18* Säule (3 mm x 125 mm; 5  $\mu$ m Partikelgröße) von *Knauer* (Berlin, Deutschland). Die Eluenten waren H<sub>2</sub>O/Methanol 80:20 (A) und 10:90 (B) und enthielten jeweils 0,1 % Ameisensäure. Der Verlauf des Gradienten war 0 min 30 % B, 2 min 65 % B, 4,5 min 85 % B, 8,5 min 85 % B und 14 min 85 % B.

#### 4.2.2 Ionenpaarchromatographie (IP-HPLC)

Als lonenpaarreagenz wurde den Eluenten (A: Methanol/H<sub>2</sub>O 20:80; B: Methanol/H<sub>2</sub>O 70:30) Tributylamin (0,5 mM) zugesetzt. Die Trennung erfolgte über eine *Phenylhexyl*-Säule (2 mm x 150 mm; 3  $\mu$ m Partikelgröße) von *Phenomenex*. Der Gradient war: 0 min 20 % B, 13 min 85 % B, 14 min 85 % B und 24 min 85 % B (Haroune et al. 2002).

## 4.3 Massenspektrometrie

Die Detektion der Analyte erfolgte im *multiple-reaction-monitoring*-Modus (MRM) mittels *electrospray-ionization*-Massenspektrometrie mit einem *Quattro LC triple*-Quadrupole Massenspektrometer der Firma *Micromass* (Manchester; Großbritannien).

Generell wurden folgende Parameter, die regelmäßig geprüft und ggf. optimiert wurden, angelegt: die Quellentemperatur betrug 120 °C und die Desolvatationstemperatru 220 °C; Gasflüsse von N<sub>2</sub> betrugen 90 L/h (nebulizer gas) bzw. ca. 850 L/h (desolvation gas). Im negativen Ionisations-Modus lag an der ESI-Kapillare eine Spannung von ca. 3,3 kV an, im positiven Modus ca. 3,6 kV; der Druck des Kollisionsgases Argon in der Kollisionszelle betrug 1,3 x 10<sup>-3</sup> mbar. Die instrumentellen Einstellungen und MRM-Übergänge der einzelnen Analyte enthält Tabelle 5-1 (s. S. 42).

## 4.4 Festphasenextraktion

#### 4.4.1 Eingesetzte Festphasen

Die getesteten Festphasen umfassten C18-Materialien (*RP18* von *Merck, ENV*+ von *IST, Envi 18* von *Supelco*) und Styrol-Divinylbenzol (SDB)-Copolymere (*LiChrolut EN* von *Merck, Envi Chrom P* von *Supelco*). Um sowohl die stark polaren (BTSA, ABT, MBT, OHBT) wie auch die weniger polaren Analyten (MTBT, BT) möglichst effektiv zu extrahieren, wurde auch die Verwendung von Mischungen vorgenannter Phasen untersucht. Ferner wurden neuentwickelte Copolymere von Divinylbenzol und N-vinylpyrrolidon (*Oasis HLB* von *Waters*) und oberflächenmodifizierte SDB-Copolymere (*StrataX* von *Phenomenex*) getestet.

Innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Extraktionen aquatischer Proben erfolgten unter Verwendung der Festphase *Oasis HLB* der Firma *Waters*.

### 4.4.2 Geräte zur Extraktion

Eine automatisierte SPE-Anlage des Typs *AutoTrace SPE-Workstation (Zymark*, Hopkinton, USA) wurde zur Durchführung der Extraktion eingesetzt. Die Aufgabe von Lösungsmittel, das Lösungsmittelvolumen, das Probevolumen und die Fließgeschwindigkeiten werden bei diesem Gerät in einem Programm zusammengestellt, das dann abgearbeitet wird. Im Unterschied zu manuellen SPE-Anlage arbeitet dieses Gerät nicht mit angelegtem Vakuum, sondern fördert Lösungsmittel und Probe über Pumpen auf die SPE-Kartuschen.

#### 4.4.3 Extraktionsprogramm

Für die Extraktion von Benzothiazolen aus 50 bis 100 mL Probe mit der Festphasenkartusche *Oasis HLB* 200 mg wurde die in Tabelle 4-1 aufgeführte Methode entwickelt und angewandt. Für spezielle Anforderungen wie beispielsweise während der Methodenentwicklung und Validierung wurde das Extraktionsprogramm entsprechend abgeändert.

Arbeitsschritt	Volumen [mL]	Lösungsmittel	Fluss [mL/min]
	3,5	MeOH/Aceton 6/4	4,0
Konditionierung	1,0	MeOH/Aceton 6/4	4,0
Renationierung	1,0	MeOH/Aceton 6/4	4,0
	5,0	Reinstwasser	4,0
Probenaufgabe	50 - 100		4,0
Waschen der Kartusche	0,5	Reinstwasser	20,0
	3,5	MeOH/Aceton 6/4	2,0
Elution/Einwirken	1,0	MeOH/Aceton 6/4	2,0
	1,0	MeOH/Aceton 6/4	2,0
	0,5	MeOH/Aceton 6/4	2,0
Elution	0,5	Reinstwasser	2,0

Tabelle 4-1: Extraktionsprogramm für die Extraktion von Benzothiazolen mit *Oasis HLB* (200 mg) aus Probenvolumina von 50-100 mL.

## 4.4.4 Durchbruchversuche

Leitungswasser und Kläranlagenablauf wurden mit sechs Benzothiazolen so dotiert, dass die Konzentration je Analyt 200 µg/L betrug. Die dotierten Lösungen wurden über *Oasis HLB* (3 mL, 60 mg) und *Strata X* (3 mL, 60 mg) extrahiert. Während der Extraktion wurden Proben des Kartuschenablaufes genommen und direkt zur Analyse eingesetzt.

#### 4.4.5 Einengung von SPE-Extrakten

Das Abziehen des Lösungsmittels erfolgte in einer *SpeedVac* Vakuumzentrifuge (*Savant,* Farmingdale, USA) bei maximal möglichem Vakuum und einer Temperatur von 45 °C. Allen Extrakten wurde vor der Einengung mindestens 0,5 mL Wasser als "Keeper" zugegeben (generell geschah dies bereits durch den letzten Schritt im Extraktionsprogramm; s. o.). Dies sollte den Verlust der mäßig flüchtigen Stoffe BT und MTBT verhindern.

Eingeengt wurde auf ein Volumen von ca. 0,7 mL. Danach wurde Wasser zugegeben, um einen höheren Wasseranteil im eingeengten Extrakt zu erreichen, da es ansonsten zur Peakverbreiterung früh eluierender Stoffe kommt.

Zwei unterschiedliche Varianten bezüglich des Endvolumens nach dem Einengen wurden angewandt:

- (i) Wenn vor dem Einengen Interner Standard (Benzothiazol-6-carbonsäure, BTCA) zugegeben wurde, so genügte es, auf ein Volumen von ca. 0,7 mL einzuengen und Wasser bis ca. 1,5 ml Gesamtvolumen zuzugeben. Die unterschiedlichen Volumina wurden bei der Auswertung über den Internen Standard korrigiert.
- Wenn nach dem Einengen auf ein definiertes Volumen (kalibrierte Zentrifugengläser, 2 ml) aufgefüllt wurde, war kein Einsatz von Internem Standard notwendig.

# 4.5 Schutz der Thiolgruppe von MBT mit Glutathion (GSH)

Zur Verdeutlichung der Wirkung von Glutathion (GSH) wurden zwei Experimente durchgeführt:

(i) Reinstwasser wurde mit MBT bis zu einer Konzentration von 2 µg/L dotiert. Vier Ansätze von je 100 mL wurden extrahiert (*Oasis HLB*, 200 mg, 6 mL) wovon zwei Ansätze zuvor mit je 500 µL GSH-Lösung (0,1 mol/L in Wasser) versetzt wurden. Die SPE-Eluate wurden eingeengt und per LC-ESI-MS/MS analysiert. Als Referenzwert zur Berechnung der Wiederfindung wurde eine MBT-Standardlösung mit 200 µg/L (theoretische MBT-Konzentration in den SPE-Extrakten) herangezogen.

(ii) Fünf Zuläufe und fünf Abläufe einer Kläranlage wurden jeweils einmal mit und einmal ohne Zugabe von GSH extrahiert (*Oasis HLB*, 200 mg, 6 mL) und per LC-MS vermessen. Die Dosierung von GSH erfolgte so, dass zu 100 mL Kläranlagenablauf oder zu 50 mL Kläranlagenzulauf (Rohabwasser) 1 mL 0,1 M GSH-Lösung zugegeben wurde.

# 4.6 Unterscheidung zwischen Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung

Zur Unterscheidung von Matrixeffekten und möglichen Wiederfindungsverlusten während der SPE wurden drei Standard-Additions-Reihen miteinander verglichen (Abbildung 4-1):

• Std-Add-Reihe *Std-Lsg*:

Standardlösungen, die keinen Matrixeffekten unterworfen sind, wurden mittels LC-ESI-MS/MS analysiert.

o Std-Add-Reihe Matrix:

Ein Volumen von 100 mL Reinstwasser wurde mit GSH-Lösung (1 mL 0,1 M) versetzt, extrahiert und die SPE-Extrakte auf 2 mL eingeengt. Die eingeengten Extrakte wurden auf geteilt und mit Dotierlösung so versetzt, dass die Konzentration 50 µL Dotierlösung auf 1 mL Extrakt entsprach.

• Std-Add-Reihe SPE+Matrix:

Volumen von 100 mL Reinstwasser wurden mit GSH-Lösung (1 mL 0,1 M) und mit 100  $\mu$ L Dotierlösung versetzt und extrahiert. Die SPE-Extrakte wurden auf 2 mL eingeengt und analysiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ L Dotierlösung und Einengen der Extrakte auf 2 mL entsprechen auch in diesem Ansatz 50  $\mu$ L Dotierlösung 1 mL Gesamtvolumen im Vial.

Aus diesen drei Ansätzen werden drei Standard-Additions-Geraden erzeugt, über deren unterschiedliche Steigungen der Einfluss von Matrixeffekten und Wiederfindungsverluste separat beurteilt werden können.



Abbildung 4-1: Dotierschema zur differenzierten Untersuchung von SPE-Wiederfindung und Matrixeffekten.

# 4.7 Volumenstromreduzierung durch *post-column splitting* (PCS)

Der von der HPLC-Säule kommende Volumenstrom wurde unmittelbar vor der ESI-Kapillare mit einem T-Stück mit geringem Totvolumen gesplittet. Auf eine möglichst nahe Positionierung der Split-Vorrichtung an der ESI-Kapillare wurde geachtet, um eine Peakverbreiterung der Analytpeaks und eine starke Erhöhung der Durchströmungszeit der Kapillare zu vermeiden.

Die Einstellung des Split-Verhältnisses wurde erreicht durch die Verwendung von Kapillaren unterschiedlicher Länge und mit unterschiedlichem Innendurchmesser (ID) auf der *waste*-Seite und der MS-Seite (kurze Kapillare mit großem ID  $\rightarrow$  geringer Gegendruck, großer Volumenstrom; lange Kapillare mit geringem ID  $\rightarrow$  hoher Gegendruck, geringer Volumenstrom). Das Splitverhältnis wurde ermittelt durch Bestimmung des Gesamtvolumenstromes und des *waste*-Volumenstromes.

Zur Untersuchung des Einflusses des Volumenstromes auf den Analyt-Response wurden verschiedene Splitverhältnisse getestet und der der ESI-Quelle zugeführte Volumenstrom so von 500 L/min über 155  $\mu$ L/min und 90  $\mu$ L/min auf 20  $\mu$ L/min verringert. Die Analytkonzentration bei diesen Versuchen lag bei 20  $\mu$ g/L. Die Analyten waren dabei in einem Gemisch aus Reinstwasser und Methanol gelöst.

Für die Untersuchung des Einflusses der Volumenstromreduktion bei der Untersuchung von Realproben mit hohem Matrixgehalt wurde der von der HPLC kommende Volumenstrom von 500 μL/min so gesplittet, dass der ESI-Quelle im negativen Ionisationsmodus 90 μL/min zugeführt wurden und bei positivem Ionisationsmodus 20 μL/min.

## 4.8 Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung erfolgte innerhalb dieser Arbeit generell durch *externe Kalibration in Probenmatrix*. Von einer Serie mit Proben gleicher Matrix wird eine begrenzte Anzahl Proben über das Standard-Additions-Verfahren bestimmt. Die Zugabe von Dotierlösung erfolgt dabei zu Beginn des Analysenprozesses, also vor der SPE. Dadurch werden Matrixeffekte und Wiederfindungsverluste während der SPE berücksichtig. Als Indikator, ob dieses Quantifizierungsverfahren angewandt werden kann, dient die Variation der Steigungen der Standard-Additions-Geraden aus den Standard-Additions-Reihen. Hohe Variabilität bedeutet eine sehr inhomogene Matrix und resultiert in einer großen Unsicherheit der errechneten Konzentrationen. Ist die Variabilität hingegen gering, liegt innerhalb der Probenserie eine recht homogene Matrix vor und die ermittelte Konzentration ist mit einem tolerablen Fehler behaftet.

Dieses Verfahren ist anhand zweier Probenserien beispielhaft beschrieben (Kapitel 5.7). Als Probenmatrix diente Kläranlagenzulauf und -ablauf. Je vier Proben aus zwei Probeserien mit je 20 Exemplaren wurden über 0,45 µm Membranfilter filtriert und entsprechend des Standard-Additions-Verfahrens dotiert. Die Anreicherung mittels SPE und die Analyse der Extrakte per LC-MS/MS erfolgte wie oben beschrieben und unter Volumenstromreduktion (negativer ESI-Modus: 90 µL/min; positiver ESI-Modus 20 µL/min) mittels *post-column splitting*. Die Steigungen der Standard-Additions-Geraden wurden ermittelt und miteinander Verglichen.

Eine detaillierte Aufstellung der Steigung ist im Anhang (Kapitel 13.4) gegeben, die Diskussion der Resultate erfolgt in Kapitel 5.7.

## 4.9 Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenzen wurden über das Verhältnis von Analyt-Signal zu Grundrauschen (signal-to-noise-ratio; *S/N*) festgelegt. Ermittelt wurden das *Instrumentelle Detektionslimit* (IDL; *S/N*  $\geq$  3) und die methodischen Bestimmungsgrenzen *Detektionslimit* (LOD; *S/N*  $\geq$  3) und *Quantifizierungslimit* (LOQ; *S/N*  $\geq$  10).

## 4.9.1 IDL

Die Ermittlung des IDL erfolgte durch Analyse von niedrig konzentrierten (wässrigen) Standardlösungen mittels HPLC-ESI-MS/MS. Die Konzentrationen der Standardlösungen zur Bestimmung der IDL lagen für die einzelnen Benzothiazole in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen, diese sind in Tabelle 4-2 aufgelistet. Von den resultierenden Benzothiazol-Peaks wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis über die Peakhöhe und die Höhe des Grundrauschens nahe des Peaks bestimmt. Standardlösungen (stets frisch angesetzt) zur Bestimmung des IDL wurden über Monate hinweg wiederholt gemessen.

Tabelle 4-2:	Stan	dard	llösungen zur Bestimmu	ng de	er IDL.		
Angegeben	sind	die	Konzentrationsbereiche	e der	eingesetzten	Standardlösunger	
sowie die zur IDL-Bestimmung injizierten Menge Analyt.							

	Konzentrationsbereich [µg/L]		Injizierte Menge Analyt [pg]		
	von	bis	von	bis	
ABT	0,2	2,0	12	120	
BT	0,2	16,7	12	720	
MTBT	0,2	16,7	12	600	
BTSA	0,2	41,7	12	1920	
MBT	0,6	20,0	36	1200	
OHBT	0,6	60,0	36	3600	

## 4.9.2 LOD und LOQ

Proben von Zu- und Ablauf eines Klärwerkes wurden analysiert und über Standard-Addition quantifiziert. Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der Analytpeaks in diesen Proben wurden ermittelt. Ausgehend von diesen *S/N*-Verhältnissen wurde die Konzentration errechnet, bei welcher *S/N* = 3 und *S/N* = 10 wären. Über den Grubbs-Test (s. Anhang Kapitel 13.5) wurden Ausreißer ermittelt und aus den Datenreihen entfernt. Der Mittelwert der ausreißerbereinigten Konzentrationen für *S/N* = 3 eines Analyten ist dessen Detektionslimit, der Mittelwert der Konzentrationen von *S/N* = 10 stellen das Quantifizierungslimit dar.

# 4.10 Untersuchungen zu Metabolisierung, Abbau, Transformation

Der Metabolisierungspfad von BT/OHBT und MBT wurde in Zusammenarbeit mit einer französischen Arbeitsgruppe um Anne-Marie Delort und Nicolas Haroune (Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, Frankreich) näher untersucht (Haroune et al. 2002; Haroune et al. 2004). Unser Kooperationspartner führte Inkubationen von BT/OHBT und MBT mit den Stämmen (BT/OHBT: *Rhodococcus pyridinovorans PA N-120-8*; MBT: *Rhodococcus rhodochrous OBT18*) durch, entnahm Proben aus den Inkubationsansätzen und analysierte diese mittels verschiedener NMR-Techniken. Zusammensetzung der Inkubationsansätze und Durchführung der NMR-Untersuchungen sind an anderer Stelle wiedergegeben (Haroune et al. 2002; Haroune et al. 2004).

Volumen von ca. 1-2 mL der entnommenen Proben wurden tiefgefroren und in unser Labor nach Berlin gesandt. Nach dem Eintreffen der Proben wurden diese stets in Eisschrank (ca. -18 °C) gelagert und nur zum Ansetzten von Verdünnungen für die LC-MS/MS-Bestimmung aufgetaut. Für LC-MS/MS-Messungen wurden Verdünnungen von 1/5 bis 1/50 angesetzt und analysiert.

Aus der Inkubation von OHBT mit *Rhodococcus pyridinovorans PA N-120-8* erhielten wir eine Probenserie von 5 Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten (123 h, 127 h, 151 h, 157 h, 199 h) aus der Inkubation entnommen wurden. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie (s. o.). Die Geräteeinstellungen am ESI-MS-Detektor wurden generell wie oben aufgeführt gewählt. Zur Aufzeichnung von Tochterionenespektren wurden mehrere Analysen bei unterschiedlichen Kollisionsbedingungen durchgeführt.

Aus der Inkubation von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18* wurden uns 11 Proben, die innerhalb einer Inkubationszeit von 0,5 h bis 28,5 h entnommen wurden, und zusätzlich Inkubationsblindwerte der Inkubationszeiten 0 h und 29 h zugesandt. Zur Analyse dieser Proben wurden Umkehr-

phasen- und Ionenpaarchromatographie eingesetzt. Am MS-Gerät wurden hier ebenfalls die oben aufgeführten Parameter eingestellt. Lediglich zur Aufnahme von Tochterionenspektren wurden mehrere Analysen bei unterschiedlichen Kollisionsbedingungen durchgeführt.

Bei den Analysen zeigte sich, dass der Gradient der chromatographischen Trennung, der für die Bestimmung von Umweltproben optimiert war, zu einem höheren bzw. längeren Organikanteil hin verändert werden musste. Die HPLC-Säule wurde mit zunehmender Analysenzahl mit organischer Matrix kontaminiert, da organische Substanzen während eines chromatographischen Laufes nicht vollständig von der Säule eluiert wurden. Als Folge war eine Verschlechterung der chromatographischen Trennung zu erkennen und das permanente "Herunterschmieren" organischer Stoffe erhöhte aufgrund des chemischen Rauschens die Basislinie des MS-Signals enorm.

# 4.11 Beprobungsorte und Probenahme zur Untersuchung des Auftretens von Benzothiazolen in aquatischen Systemen

#### 4.11.1 Beprobung Klärwerk Ruhleben (Berlin)

Auf dem Klärwerk in Ruhleben wurden zwei Beprobungsserien durchgeführt:

- Ruhl1: März bis Juni 2002; 20 Beprobungen; mittlere Wassertemperatur 15-21 °C
- o Ruhl2: Oktober bis November 2003; 9 Beprobungen; mittlere Wassertemperatur 19-15 °C.

Beprobt wurden:

- o raw: Zulauf zur Kläranlage (raw: raw wastewater; Beprobung nach dem Sandfang)
- CAS: Ablauf der Kläranlage (CAS: conventional activated sludge; Beprobung des Ablaufs der Nachklärung)
- *MBR1* und *MBR2* : Permeate zweier Membranbioreaktoren (*MBR*: membrane bioreactor).

Alle Proben waren 24-h-Mischproben und wurden unter Berücksichtigung der hydraulischen Aufenthaltszeit entnommen. Die Beprobung während der beiden Untersuchungszeiträume wurde von den *Berliner Wasserbetrieben* durchgeführt. Die Proben wurden innerhalb weniger Stunden über 0,45 µm Membranfilter filtriert und im Eisschrank (-18 °C) bis zur Analyse mittels SPE LC-MS/MS (wie oben beschrieben) oder bis zur DOC-Bestimmung gelagert.

#### Konventionelle Behandlung mit Belebtschlamm (CAS)

Das Klärwerk in Berlin-Ruhleben betreibt mechanische (Rechen, Sandfang, Vorklärung) und biologische Abwasserreinigung mit Belebtschlammbehandlung (CAS; conventional activated sludge) mit biologischer Phosphateliminierung in Kombination mit Nitrifikation und Denitrifikation. Die biologische Stufe wird mit einem konstanten Schlammalter von 15 Tagen und einer Schlamm-konzentration von 4 g/L gefahren. Die hydraulische Aufenthaltszeit in der Biologie beträgt ca. 18 h. Die Trockenwetterkapazität des Werkes liegt bei 240 000 m<sup>3</sup>/d. Städtisches Abwasser bildet den Hauptanteil im Zulauf, industrielle Einträge können bis zu 30 % betragen (Angaben des Betreibers).

#### Behandlung mittels Membranbioreaktoren (MBR)

In einer Kooperation zwischen den *Berliner Wasserbetrieben* und dem *Kompetenz-Zentrum Wasser Berlin* wurden auf dem Gelände des Klärwerkes Ruhleben während der Erstellung dieser Arbeit zwei Membranbioreaktoren betrieben.

MBR1 (V = 2,1 m<sup>3</sup>) wurde wie die CAS-Anlage im Pre-Denitrifikations-Modus betrieben. MBR2 (V = 1,9 m<sup>3</sup>) wurde im Post-Denitrifikations-Modus betrieben. Die ansonsten baugleichen MBRs wurden im September 2001 mit Belebtschlamm der CAS-Anlage beimpft und kontinuierlich mit dem gleichen Rohabwasser wie die konventionelle Abwasserbehandlung beschickt und arbeiteten unter gleichen Bedingungen hinsichtlich hydraulischer Aufenthaltszeit und Schlammalter. An Stelle des Sandfangs der CAS-Anlage wurde bei den MBRs der Zulauf über ein Lochsieb (1 mm) filtriert. Im April 2002 wurde das Schlammalter angehoben und die mittlere hydraulische Aufenthaltszeit auf 18 h verlängert. Im Mai/Juni betrug das Schlammalter 20 Tage (Ziel war eigentlich 26 Tage), ein Gleichgewicht konnte jedoch nicht eingestellt werden. Die Schlammkonzentration betrug 13 g/L (MBR2) bzw. 12,5 g/L (MBR2). Detaillierte Informationen zu Aufbau, Betrieb und allgemeiner Reinigungsleistung der MBR-Anlagen sind an anderer Stelle wiedergegeben (Gnirss et al. 2003).

#### 4.11.2 Beprobung Klärwerk GaoBeiDian (Beijing, China)

Die Kläranlage GaoBeiDian (*Beij*) in Beijing, China ist mit einer Kapazität von 1 000 000 m<sup>3</sup>/d die größte Kläranlage Chinas. Die Anlage wurde 1993 mit der Hälfte der Kapazität in Betrieb genommen und bis 1999 auf die heutige Größe erweitert (Yuwen et al. 2003). Der Zulauf zur Kläranlage in GaoBeiDian enthält ca. 50 % häusliches Abwasser (Yuwen et al. 2003). Die Abwasserklärung beinhaltet mechanische und biologische Reinigung (Rechen, Sandfang, Vorklärung, Biologie ohne Denitrifikation, Nachklärung).

Ein Teil des Klarlaufes (300 000 m<sup>3</sup>/d) der Abwasserbehandlung in GaoBeiDian wird mittels Flockung Polyaluminiumchlorid (PACI) und Sandfiltration weiter aufgearbeitet und als Brauchwasser benutzt. Innerhalb eines chinesisch-deutschen Kooperationsprojektes wurde auf dem Gelände von GaoBeiDian eine Pilotanlage zur künstlichen Grundwasseranreicherung errichtet, mit welcher Brauchwasser einer weiteren Aufbereitung unterzogen und in den Aquifer infiltriert wird. Bei der weiteren Aufbereitung handelt es sich um Adsorption an granulierte Aktivkohle (granulated activated carbon; GAC) und Filtration über einen biologisch aktiven Sandfilter.

Folgende Prozessstufen der Abwasserbehandlung von GaoBeiDian (Beij) wurden beprobt:

- raw (raw wastewater): Entnahme von Rohabwasser aus dem Zulauf zur Kläranlage vor dem Rechen; Mischproben wurden hergestellt, indem 4-mal im Abstand von 1 h jeweils 250 ml Probe gezogen und die einzelnen Fraktionen vereinigt wurden.
- CAS (conventional activated sludge): Aus 4 Nachklärbecken wurden jeweils 250 ml Probe entnommen und vereinigt.
- GAC (granulated activated carbon): Proben wurden dem Ablauf des GAC-Reaktors entnommen.

Eine zeitbezogene Probenahme war nicht möglich. Mischproben wurden erstellt, indem in Intervallen Probenmaterial entnommen und die einzelnen Fraktionen vereinigt wurden. Die Proben wurden sofort über 0,45 µm Membranfilter filtriert und bis zur Extraktion mittels SPE bei ca. 4 °C gelagert (maximal 24 h lang). Die Extraktion der Proben bis einschließlich der Probenaufgabe und

dem Waschschritt mit 0,5 mL Wasser erfolgte vor Ort in den Laboratorien der Kläranlage GaoBeiDian. Die Kartuschen wurden **nicht** trocken gesaugt, sondern mit einem geringen Überstand and Wasser luftdicht verschlossen und nach Berlin transportiert. Die Elution der Proben und die weiteren Analysenschritte incl. der Messung mittels LC-MS/MS (wie oben beschrieben) erfolgten in den Laboratorien des Fachgebietes Wasserreinhaltung in Berlin. Zwischen der Probenaufgabe auf die Kartuschen und der Elution lagen ca. 7 Tage.

#### 4.11.3 Beprobung Klärwerk Schönerlinde (Berlin)

Das Klärwerk in Schönerlinde (*Schö*) bei Berlin betreibt Abwasserbehandlung mit Belebtschlamm (*CAS*). Dies umfasst auch die biologische Phosphorentfernung und Nitrifikation/Denitrifikation. Der tägliche Durchsatz liegt bei 100 000 m<sup>3</sup>, der Zulauf entstammt einer Trennkanalisation. Innerhalb der Beprobung des Nordgrabens (s. u.) wurde eine Stichprobe des Ablaufes (*CAS*) der Kläranlage genommen (Oktober 2003).

#### 4.11.4 Nordgraben

Das Klärwerk Schönerlinde (*Schö*) leitet Klarlauf über den Blankenfelder Graben in den Nordgraben, der wiederum in den Tegeler See, einen Seitenarm der Havel, mündet. Die Gesamtfließdauer vom Austritt des Klarlaufes aus dem Klärwerk Schönerlinde bis zur Mündung in den Tegeler See beträgt ca. 18 h bei einer Fließdistanz von ca. 19 km. In diesem Kanalsystem wurde das Verhalten von Benzothiazolen nach deren Freisetzung in die Umwelt untersucht. Hierzu wurden fünf Proben entlang des Grabensystems entnommen, wobei die Fließzeit berücksichtigt wurde. Ziel war es, eine "stehende Welle" zu beproben. Die Probenahmen erfolgten am 09. Oktober 2003 zwischen 2:00 h und 17:00 h. Klimatisch war dies ein trockener Tag mit einer mittleren Sonnenscheindauer von 3,8 h bei einer Lufttemperatur zwischen 6,4 und 13,0 °C. Die Wassertemperatur betrug 14-16 °C und der mittlere Abfluss lag bei 1,2 m<sup>3</sup>/s. Während des Untersuchungszeitraumes war der Ablauf des Klärwerks Schönerlinde der einzige Zufluss zum Nordgraben. Es existieren noch 3-5 kleinere Seitenzuflüsse aus Kleingartenanlagen und dem Tegeler Fließ, die jedoch bezogen auf den Volumenstrom keine nennenswerte Rolle spielen. Angelegt wurde der Nordgraben als Flutgraben für die Panke. Von hier erfolgte während des Untersuchungszeitraumes jedoch keine Speisung des Nordgrabens.

Nach Eintreffen ins Labor wurden die Proben sofort über 0,45 µm Membranfilter filtriert und wie oben beschreben mittels SPE LC-MS/MS bestimmt.

#### 4.11.5 Beprobung von Straßenablauf

Straßenablauf wurde einem Sammelrohr entnommen, welches den Ablauf eines 63 000 m<sup>2</sup> großen Straßenabschnittes der Berliner Stadtautobahn (tägliches Verkehrsaufkommen ca. 200 000 Fahrzeuge) einzieht. Der Straßenablauf dieses Straßenabschnittes wird in einen nahe gelegenen See einleitet. Straßenablauf wurde beprobt infolge eines Regenereignisses am 29. August 2003, welches 3,5 h dauerte und 8,2 mm Regen (8,2 L/m<sup>2</sup>) erbrachte. Das Regenereignis folgte einer Trockenperiode von einigen Tagen, die zu einer entsprechenden Staub- und Abriebmenge auf der Fahrbahn führte.

Proben wurden in Intervallen von 10 Minuten während der ersten beiden Stunden entnommen, in den darauf folgenden 2,5 Stunden in Intervallen von 20 Minuten.

Die Proben wurden zunächst über 0,45 µm Membranfilter filtriert und bis zur weiteren Analyse mittels SPE LC-MS/MS (wie oben beschrieben) im Eisschrank (-18 °C) gelagert.

Die Proben des Straßenablaufes wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Thomas Ludwig und Dr. Markus Stüber, die die Beprobung innerhalb der BMBF-finanzierten chinesisch-deutschen Kooperation "Neue Konzepte der Regenwasserbewirtschaftung in Stadtgebieten", Teilprojekt 6: "Entfernung von Kolloiden und gelösten Stoffen bei der Versickerung von Regenwasser" (Fkz. 02 WA 0050) durchführten.

#### 4.11.6 Beprobung von häuslichem/sanitärem Abwasser

Proben rein häuslichen Abwassers wurden in einem Pumpwerk im Süden Berlins entnommen. Das Pumpwerk, das in einem mit Wohnhäusern bebauten Gebiet ohne nennenswerte Industrie liegt, erhält Abwasser aus Trennkanalisation. Die Beprobung wurde morgens gegen 7:00 h durchgeführt. Drei Stichproben wurden innerhalb 30 Minuten im Januar 2004 und fünf weitere Stichproben im August 2004 innerhalb 60 Minuten bei trockenem Wetter (keine Querkontamination mit Straßenablauf) entnommen.

Sofort nach Eintreffen im Labor wurden die Proben über 0,45 µm Membranfilter filtriert. Zur Anfertigung einer *Externen Kalibration in Probenmatrix* wurde ein Teil der Proben entsprechend des Standard-Additions-Verfahrens aufgestockt, per SPE extrahiert und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert (Beschreibung des Analysenprozesses s. o.)

#### 4.11.7 Beprobung und Untersuchung verschiedener Klärschlämme

Bei den beprobten Schlämmen handelt es sich um Mischschlamm der konventionellen Abwasserbehandlung (eine Probe; TS. 35,7 g/L; Probenahme im Februar 2004) und Belebtschlamm aus einer MBR-Versuchsanlage (vier Proben; TS: 17,1–19,9 g/L, Probenahme im Juli 2004) in Berlin-Ruhleben (Abbildung 4-2).

Mischschlamm setzt sich aus Primärschlamm (Schlamm aus der Vorklärung) und Sekundärschlamm (Schlamm aus dem Absetzbecken der Nachklärung) zusammen.

Belebtschlamm wird in der biologischen Stufe gebildet und durch Sedimentation in der Nachklärung entfernt. Bei MBR-Anlagen wird der Belebtschlamm durch die Membran zurückgehalten.



Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Schlämme, die in einer Kläranlage anfallen. Beprobungspunkte grau unterlegt.

#### Extrahierbare Benzothiazole

Mischschlamm (eine Probe) und Belebtschlamm (vier Proben) wurden über Glasfaserfilter filtriert und der Filterkuchen mit wenig Wasser gewaschen. Die Glasfaserfilter wurden mit MeOH und Aceton im Ultraschallbad mehrmals extrahiert. Nach Zusammenführen der Extrakte wurde auf ein definiertes Volumen eingeengt und mit Dotierlösungen für das Standard-Additions-Verfahren versetzt. Die Bestimmung der Benzothiazole erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS. Blindwerte wurden parallel angesetzt, indem Glasfaserfilter ohne vorherige Schlammaufgabe extrahiert wurden (detaillierte Beschreibung der Durchführung im Anhang Kapitel 13.13).

#### Rücklösung von Benzothiazolen

Zur Überprüfung, ob durch die aerobe oder anaerobe Abwasserbehandlung schlammadsorbierte Benzothiazole in die wässrige Phase über gehen, wurde Mischschlamm inkubiert. Nach Zentrifugation des Mischschlammes und zweimaligem Waschen mit Nährmedium (Zusammensetzung s. Anhang Kapitel 13.13) wurden 3 x 250 mL einer Suspension des gereinigten Schlammes in Medium mit einer Schlammkonzentration von ca. 4 g/L angesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Rühren im Dunkeln über mehrere Wochen hinweg wie folgt:

- Simulation der aeroben Zone: Belüftung der Schlamminkubation über eine feinporige Fritte mit Luft.
- Simulation der anaeroben Zone: das Inkubationsbehältnis wurde mit einem Stopfen locker (Vermeidung von zu großem Überdruck durch Gasentwicklung bei Gärung) verschlossen, um regen Gasaustausch zu vermeiden.
- Kontroll-Inkubation: Inhibierung der biologischen Aktivität im Schlamm durch Zugabe von HgCl<sub>2</sub> (c = 10 mg/L); Gefäß nicht luftdicht verschlossen.

Über 10 Wochen hinweg wurden je 8 Proben aus den Inkubationen entnommen, indem einige mL in eine Spritze aufgezogen und über 0,45 µm Spritzenfilter (*Minisart SRP 15* von *Sartorius*) direkt in HPLC-Vials filtriert wurden. Die filtrierten Proben wurden eingefroren bis alle Beprobungen durchgeführt waren.

Zur Quantifizierung wurde das Standard-Additions-Verfahren auf die letzte Probe der anaeroben und der inhibierten Inkubation angewandt.

# 4.12 Berechnung der statistischen Signifikanz

Berechnungen der statistischen Signifikanz wurden durchgeführt mir dem Software-Programm *SPSS* Version 10.0 von *SPSS Inc.* Chicago, Illinois USA.

# 5 Entwicklung einer Analysenmethode

Das Auftreten von sechs polaren Benzothiazolen in kommunalem Abwasser, Klarlauf, Straßenablauf, Oberflächenwasser u. a. Umweltkompartimenten sollte untersucht werden. Eine bestehende LC-MS/MS-Methode (Reemtsma 2000) war nicht empfindlich genug, um Konzentrationen im ng/L-Bereich zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde die bestehende Analysenmethode mit einer geeigneten Festphasenextraktion (SPE) zur Anreicherung der Analyte erweitert. Die gleichzeitige Anreicherung von organischer Matrix wirkte sich negativ auf die Quantifizierung aus und wirkte einer konstanten, empfindlichen Detektion entgegen. Diese beeinträchtigenden Effekte konnten durch Anwendung einer Variante des Standard-Additions-Verfahrens, der Kalibration in Probenmatrix und durch Reduktion des Volumenstromes, welcher der ESI-Quelle zugeführt wird, weitgehend kompensiert werden.

## 5.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Detektion wurde grundsätzlich nach der von Reemtsma (Reemtsma 2000) publizierten Methode durchgeführt. Dabei wurde in beiden Ionisationsmodi (positive und negative ESI), entsprechend der besseren Ionisierbarkeit der Analyte, gemessen. Die Messparameter wurden vor jeder Messsequenz überprüft und ggf. justiert. Tabelle 5-1 enthält die grundlegenden Parameter, von denen ausgehend das Messgerät den täglichen Bedingungen angepasst wurde.

	m/z Molekülion	CV [V]	MRM Produktionen 1. lon / 2. lon	CE [eV]	Verhältnis der Produktionen
Positive Ionisier	ung (M+H)+				
ABT	151	41	109 / 65	26 / 35	2,4
BT	136	46	109 / 65	26 / 37	2,2
MTBT	182	35	109 / 65	22 / 34	6,5
Negative Ionisie	rung (M-H)-				
BTSA	214	34	134 / 58	24 / 34	4,6
MBT	166	42	134 / 58	20 / 32	3,0
OHBT	150	36	42 / 107	31 / 24	2,4

Tabelle 5-1: MS-Parameter für die Detektion von sechs Benzothiazolen. Positive und negative Electrospray-Ionisierung und Detektion im MRM Modus.

# 5.2 Chromatographie

Die chromatographische Trennung der sechs Analyte über C-18 Säulen erfolgte in zwei separaten HPLC-Läufen. Dadurch konnte eine bessere Trennung erreicht werden, und zusätzlich konnten die HPLC-Eluenten so mit Modifier versetzt werden, dass diese die Electrospray-Ionisierung (ESI) der Analyte unterstützten (Reemtsma 2000). Die Eluenten für die HPLC-Trennung von ABT, BT und MTBT, die im positiven ESI-Modus gemessen werden, wurden mit Ameisensäure versetzt, was zu einer verstärkten Protonierung des Stickstoffs im Thiazolring bzw. der Aminogruppe von ABT führt. Für die Benzothiazole, die im negativen Modus, nach Deprotonierung in der ESI-Quelle, analysiert werden (BTSA, MBT; OHBT) wäre eine hohe Protonenkonzentration restriktiv. Den Eluenten für die

Trennung dieser drei Benzothiazole wurde ein Modifier zugesetzt, der weniger die Ionisierung als vielmehr die Retention während der HPLC-Trennung beeinflusst. Damit die Sulfonsäure BTSA, die bei moderatem pH-Wert vorwiegend dissoziiert vorliegt, nicht in der Totzeit eluiert, wurde den Eluenten Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>OAc) zugegeben. Hiermit bildet BTSA eine schwache Ionenpaarbindung aus. Die Retentionszeit dieses Ionenpaares ist deutlich höher als die der dissoziierten Sulfonsäure.

## 5.3 Festphasenextraktion - SPE

## 5.3.1 Allgemeines

Wechselwirkungen, Sorption und Desorption gelöster Stoffe mit festen Phasen wurden bereits vor 1900 untersucht. Einer der ersten war Mikail Semenowitsch Tswett, der bei der Aufreinigung von Chlorophyll über eine mit Calciumcarbonat gefüllte Glassäule feststellte, dass einzelne Farbkomponenten, aus welchen sich der grüne Blattfarbstoff zusammensetzt, unterschiedlich schnell durch die Säule wandern (Tswett 1906 a; Tswett 1906 b). Die Auftrennung dieser Farbkomponenten war namensgebend (*chroma (lat.)* "Farbe"). Tswett benannte diese Methode *"Chromatografie"* (Tswett 1906). Die unterschiedliche Affinität von verschiedenen gelösten Stoffen zu Feststoffoberflächen resultiert in der Trennung der gelösten Stoffe. Bei sehr hoher Affinität des gelösten Stoffes zur Oberfläche kann dieser dauerhaft adsorbiert werden. Diese Technik war schon sehr populär bei der Aufbereitung von Wasser, wo Filter mit granulierter Aktivkohle (GAC) eingesetzt wurden, um organische Stoffe aus Wasser zu entfernen, als Braus et al. (Braus et al. 1951) Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Extraktion organischer Stoffe aus Wasser leistete. Sein Ziel war, im Wasser enthaltene organische Stoffe zu gewinnen und durch weitere Analysen zu charakterisieren. In ihren Untersuchungen verwendeten die Autoren Stahlzylinder, füllten diese mit GAC unterschiedlicher Hersteller, teilweise mit bis zu 1900 g, und extrahierten damit bis zu 150 m<sup>3</sup> (!) Wasser.

Die Festphasenextraktion (solid-phase extraktion: SPE) zum Zwecke der Probenvorbereitung, wie man sie heute kennt, hat sich besonders in den vergangenen 20 Jahren entwickelt, nachdem die Qualität der Festphasen sowie die Reproduzierbarkeit und das Handling beim Arbeiten mit Festphasen hoch genug waren, um die Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction: LLE) zu ersetzen (Liska 2000). Beschleunigende Faktoren für die Entwicklungen im Bereich der SPE waren ferner die Aufnahme dieser Technik in standardisierte Analysenmethoden (DIN, EPA, ...), die Notwendigkeit polare organische Stoffe in wässrigen Proben zu untersuchen und das Bestreben von Laboratorien den Verbrauch chlororganischer Lösungsmittel zu senken (Hennion 1999).

Mittlerweile beherrschen hoch entwickelte Festphasen den Markt, die, verglichen mit Aktivkohle, organische Stoffe nicht nur gut adsorbieren, sondern auch eine vollständige, einfache Desorption der adsorbierten Stoffe im Elutionsschritt gewährleisten. Die gängigsten Arten von Festphasen sind Alkyl-Silica-Phasen (Silanol-Grundgerüst mit aliphatischen Seitenketten) und Polymerphasen, basierend auf dem Co-Polymer Styrol-Divinylbenzol (SDB).

Sollen wie in unserem Fall polare Substanzen extrahiert werden, so gibt es heute eine breite Palette an Polymerphasen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Polymerphasen eignen sich prinzipiell besser zur Extraktion polarer Organika aus Wasser als die ansonsten weit verbreiteten C-18 Alkyl-Silica-Phasen. Besonders die große Oberfläche von Polymerphasen (bis zu 1200 m<sup>2</sup>/g (Hennion

1999)), deren polare Eigenschaften sowie die Modifizierung einiger Polymerphasen mit polaren Gruppen (Acetyl-, Hydroxymethyl-, Benzoyl- oder o-Carboxybenzoyl-Gruppen) sind für die Extraktion von polaren Stoffen von Bedeutung. Die ersten SDB-Phasen unterschieden sich in erster Linie durch den Vernetzungs- bzw. Polymerisationsgrad (bei gleichen Monomeren) voneinander. Weiterentwicklungen der SDB-Phasen enthielten modifizierte Endgruppen im SDB-Polymer oder bestanden neben Styrol und Divinylbenzol aus zusätzlichen Monomeren. Die Festphase *Oasis HLB* der Firma *Waters*, beispielsweise, enthält als drittes Monomer N-vinylpyrrolidon.

#### 5.3.2 Untersuchte Festphasen

Folgende Festphasen wurden zur Extraktion von Benzothiazolen getestet:

- C18-Phasen: RP-18 (Merck), Envi 18 (Supelco)
- SDB-Phasen: LiChrolut EN (Merck), ENV+ (IST), EnviChromP (Supelco)
- Mischphasen: 2:1 Gemisch aus *RP18* und *LichrolutEN* (beides *Merck*)
- o neuartige Polymerphasen: Oasis HLB (Waters), StrataX (Phenomenex)

Bei Versuchen mit C-18-Festphasen sowie mit neuartigen und konventionellen Polymerphasen zeigten die neuartigen Co-Polymere *Oasis HLB* und *StrataX* deutliche Vorteile. Mittels Durchbruchexperimenten wurde unter diesen beiden Festphasen die geeignetere ermittelt.

#### 5.3.3 Vergleich Oasis HLB mit StrataX

Bei der Extraktion von stark matrixbelasteten Proben (Rohabwasser, Klarlauf, Oberflächenablauf u. a.) brechen die Zielanalyte schneller durch die SPE-Cartridge, als bei der Extraktion von Proben mit geringem Matrixgehalt (Reinstwasser, Leitungswasser, Grundwasser u. a.). Polare Zielanalyte zeigen eine geringere Sorptionsneigung als unpolare und sind daher als erstes im Säuleneluat detektierbar. Zur Auswahl der Festphase wurde in Durchbruchversuchen ermittelt, welche der beiden Festphasen (*Oasis HLB, StrataX*) eine geringere Durchbruchsneigung bei der Extraktion von BTSA aus komplexer Matrix zeigt. BTSA wurde aus Klarlauf einer Kläranlage und aus Leitungswasser extrahiert. Das Säuleneluat der Extraktion wurde beprobt und auf BTSA untersucht.

In Abbildung 5-1 ist der Verlauf der BTSA-Konzentration im Säuleneluat graphisch dargestellt. BTSA kann bereits nach 50 mL im Kartuschenablauf detektiert werden (sowohl bei Leitungswasser als auch bei Klarlauf). Die Eluate der *StrataX*-Cartridges weisen deutlich höhere BTSA-Konzentrationen auf als die der *Oasis HLB*-Cartridges. Während bei Extraktion über *Oasis HLB* zwischen 5 und 10 % der Ausgangskonzentration gefunden wurden, waren es bei Verwendung von *StrataX* zwischen 15 und 30 %. Ein vollständiger Durchbruch von BTSA ist bei beiden Festphasen zwar bei ungefähr gleichem Extraktionsvolumen zu erkennen, doch ist dem besseren Rückhalt am Anfang der Extraktion mehr Bedeutung zuzuschreiben. Dieser Vorteil von *Oasis HLB* gegenüber *StrataX* kann entscheidend sein, weshalb für folgende SPE-Anreicherungen *Oasis HLB* verwendet wurde.



Abbildung 5-1: Durchbruch von BTSA bei der Extraktion aus Leitungswasser und Klarlauf über die Festphasen *Oasis HLB* und *StrataX*.

Dargestellt ist die normierte Konzentration c/c<sub>0</sub> (Quotient aus detektierter Konzentration im Kartuschenablauf geteilt durch die Ausgangskonzentration) über dem extrahierten Volumen.

## 5.3.4 Durchbruch von sechs Benzothiazolen bei Extraktion über Oasis HLB

Die Polarität der sechs zu untersuchenden Benzothiazole (ABT, BT; MTBT, BTSA, OHBT, MBT) erstreckt sich über einen weiten Bereich. Während MTBT (log  $K_{OW}$  = 3,1 (Brownlee et al. 1992)) hydrophoben Charakter hat, liegen die Stoffe ABT und BTSA bei neutralem pH-Wert weitgehend ionisiert vor (s. Kapitel 3.2.2). Bei der Festphasenextraktion mit Umkehrphasen, zu denen auch *Oasis HLB* gehört, ist zu erwarten, dass ionische Stoffe und stark polare Stoffe als erstes durchbrechen und somit im Eluat der Extraktionskartuschen als erstes detektiert werden können. Um das mit *Oasis HLB* maximal mögliche Extraktionsvolumen bezüglich der zu untersuchenden Benzothiazole zu überprüfen, wurden Durchbruchsversuche mit dotiertem Leitungswasser und Klarlauf durchgeführt (Details s. Kapitel 4.4.4). Der Ablauf der SPE-Kartuschen wurde in Intervallen von 50 mL beprobt und mittels LC-MS/MS auf Benzothiazole untersucht.

Abbildung 5-2 zeigt die normierte Benzothiazolkonzentration ( $c/c_0$  mit c = Konzentration im Säuleneluat;  $c_0$  = Ausgangskonzentration) über dem extrahierten Volumen. Der polarste Analyt, BTSA, wurde als erstes der sechs Benzothiazole bereits nach einem Extraktionsvolumen von 50 mL im Kartuschenablauf detektiert (in Klarlauf als auch in Leitungswasser). Der ebenfalls sehr polare Analyt ABT konnte erst bei Extraktionsvolumen von mehr als 300 mL dotiertem Klarlauf detektiert werden, wohingegen ABT bei der Extraktion aus Leitungswasser nicht durchbrach. Die Durchbruchsneigung von BT und OHBT ist sehr gering und die Benzothiazole MBT und MTBT konnten im Kartuschenablauf bis 500 mL extrahierten Volumens nicht detektiert werden.

Der steilere Anstieg in der BTSA-Durchbruchskurve bei der Extraktion von Kläranlagenablauf veranschaulicht den Einfluss des höheren DOC bzw. des stärkeren Matrixgehaltes von Klarlauf gegenüber Leitungswasser auf das Rückhaltevermögen der Festphase hinsichtlich der Zielanalyte. Weniger ausgeprägt ist dieser Effekt auch bei ABT, BT und OHBT zu beobachten.



Abbildung 5-2: Durchbruchskurven von sechs Benzothiazolen bei Extraktion über Oasis HLB.

Für die hier durchgeführten Durchbruchsversuche wurden *Oasis HLB*-Kartuschen mit 60 mg Sorbensmenge eingesetzt. Bei der Untersuchung von Realproben (s. u.) wurden Volumen bis zu 100 mL (z. B. Oberflächenwasser, Kläranlagenablauf) bzw. 50 mL (z. B. Kläranlagenzulauf) extrahiert. Um hierfür eine ausreichende Kapazität zu gewährleisten, wurden *Oasis HLB*-Kartuschen mit 200 mg Sorbensmenge eingesetzt.

## 5.3.5 Elution

Der stärkere Rückhalt der Analyte und die hohe Kapazität der Festphase *Oasis HLB* (im Vergleich zu anderen Festphasen) sind bei der Sorption der Analyte an der Festphase von Vorteil. Bei der Desorption der Analyte von der Festphase muss allerdings beachtet werden, dass, verglichen mit anderen Festphasen, ein größeres Volumen Lösungsmittel benötigt wird oder Lösungsmittel mit höherer Elutionskraft eingesetzt werden müssen. Auf vollständige Desorption ist insbesondere bei unpolaren, hydrophoben Analyten zu achten, da diese langsamer von der Festphase desorbieren als polare Analyte. Im Falle der untersuchten Benzothiazole ist MTBT der unpolarste Analyte.

Hinsichtlich der eingesetzten Lösungsmittelmengen bzw. Art des Lösungsmittels zur Desorption muss jedoch auch beachtet werden, dass der von der Festphase eluierte Anteil hydrophober Matrix größer wird, je größer das Elutionsvolumen und je höher die Elutionskraft des Elutionsmittels ist. Unnötig große Volumina oder unnötig starke Elutionsmittel sind deshalb zu vermeiden.

In Elutionsversuchen wurden Elutionskraft und Volumen von verschiedenen Lösungsmitteln untersucht und der Desorptionsschritt optimiert. Damit der fertige Extrakt eine Zusammensetzung hat, die dem Fließmittel der später folgenden HPLC-Trennung ähnlich ist, wurde Methanol (MeOH) als Ausgangslösungsmittel gewählt. Um die Elutionskraft von MeOH zu steigern, wurde diesem Aceton zugegeben. Mit Benzothiazolen beladene SPE-Kartuschen wurden mit folgenden Elutionsmitteln eluiert, die Elution erfolgte dabei sequentiell in 1 mL Schritten:

- o MeOH
- MeOH/Aceton 8:2
- MeOH/Aceton 6:4

In Abbildung 5-3 sind die unterschiedlichen Elutionsprofile für MTBT abgebildet. Aufgetragen ist die normierte Peakfläche A/A<sub>max</sub> der MTBT-Peaks aus der LC-ESI-MS Bestimmung der einzelnen Eluatfraktionen.



Abbildung 5-3: Elutionsprofile von MTBT bei Extraktion über *Oasis HLB* und Elution mit MeOH bzw. Gemischen von MeOH/Aceton. Dargestellt ist die normierte Peakfläche A/A<sub>max</sub> über den einzelnen Elutionsfraktionen.

Während bei der Elution mit purem Methanol der Hauptanteil MTBT in der 5. Fraktion (nach 5 mL) enthalten ist, eluiert der Hauptanteil MTBT bei beiden acetonhaltigen Elutionsmitteln in der 2. Fraktion. Wie sich ein hoher Acetongehalt (MeOH/Aceton 6:4) gegenüber einem geringen Acetongehalt (MeOH/Aceton 8:2) auswirkt, ist in Abbildung 5-3 gut zu erkennen: bei MeOH/Aceton 6:4 eluiert schon in der ersten Fraktion eine größere Menge MTBT und die Elution ist bereits nach 4 mL Lösungsmittel vollständig. Beim Einsatz von MeOH/Aceton 8:2 müssen für eine vollständige Elution mindestens 6 mL Lösungsmittel eingesetzt werden.

Für den folgenden Schritt in der Probenvorbereitung, der Einengung des Extraktes, war wichtig, das Ausgangsvolumen des Extraktes gering zu halten. Daher wurde in weiteren Analysen die Elution bei der SPE mit MeOH/Aceton 6:4 durchgeführt.

## 5.4 Prävention von MBT-Verlusten

#### 5.4.1 MBT-Verluste während der Festphasenextraktion

Thiole können leicht zu Disulfiden oxidieren (Streitwieser et al. 1994). Das korrespondierende Disulfid von MBT ist bis-Benzothiazolyldisulfid (MBTS) (Abbildung 5-4).



Abbildung 5-4: Oxidation von MBT zum Disulfid MBTS.

Durch seinen hohen log  $K_{OW}$  (log  $K_{OW}$  = 4,5 (Vermont SIRI Inc. 2004)) hebt sich MBTS von den untersuchten Benzothiazolen ab. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit kann angenommen werden, dass die Konzentration von MBTS in der wässrigen Phase von Proben gering ist. MBTS wurde bisher nicht in wässrigen Umweltproben nachgewiesen (Reemtsma 2000). Weil MBTS nicht

mittels ESI-MS detektierbar ist, wurde MBTS **nicht** in die ausgearbeitete analytische Methode aufgenommen.

Damit aber MBT korrekt nachgewiesen wird, muss sichergestellt werden, dass MBT während der Probenaufarbeitung keinen oxidativen Prozessen unterliegt und zu MBTS dimerisiert. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die Konzentration von MBT in wässriger Lösung schon nach wenigen Tagen abnimmt. Inkubationen von MBT bei verschiedenen pH-Werten und bei unterschiedlichen Temperaturen (Abbildung 5-5) zeigten nach dreitägiger Inkubation im Vergleich zur Ausgangslösung deutlich verringerte Konzentrationen. Dem pH-Wert scheint dabei eine signifikante Bedeutung zuzukommen. Abbildung 5-5 zeigt Peakflächen von MBT-Peaks aus inkubierten Lösungen normiert auf die Peakfläche einer frisch angesetzten MBT-Lösung der gleichen Ausgangskonzentration. Wie zu erkennen, kommt es bei den untersuchten pH-Werten 7 und 9 zu geringeren Konzentrationsverlusten (10–55 %), verglichen mit den Inkubationen bei pH 4, 5, 6 und 8, bei welchen die Konzentrationsverluste in allen Fällen größer als 60 % sind. Bezogen auf die unterschiedlichen Inkubationstemperaturen verwundert, dass die Konzentrationsverluste bei -18 °C sehr groß und fast durchweg höher als bei Raumtemperatur und 40 °C sind. Auffällig sind weiterhin die ähnlichen Verluste bei Raumtemperatur und 40 °C innerhalb der pH-Bereiche 6, 7 und 9.



Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten. Dargestellt sind die normierten Peakflächen, wobei auf die Peakfläche einer frisch angesetzten MBT-Lösung gleicher Konzentration (200 µg/L) normiert wurde.

Für deutlich höhere MBT-Konzentrationen (83 mg/L) machten Hansson et al. (Hansson & Agrup 1993) ähnliche Beobachtungen. In einer Pufferlösung bei pH 6,5 konnten bereits nach zweistündiger Inkubation lediglich 40 % des eingesetzten MBT wiedergefunden werden. 60 % des eingesetzten MBT waren zu MBTS oxidiert.

Verglichen mit MBT-Verlusten während der Lagerung, waren die Verluste während der Festphasenextraktion deutlich höher. Ein Zusammenhang mit der großen Oberfläche von Festphasen, auf welcher adsorbierte Stoffe theoretisch eine monomolekulare Schicht bilden, ist zu vermuten. Oxidative Prozesse können durch die große Oberfläche begünstigt sein, insbesondere wenn Luft

durch die SPE-Kartuschen gesaugt wird, z. B. um die Kartuschen zu trocknen bzw. Wasser möglichst vollständig zu entfernen.

#### 5.4.2 Präventive Maßnahmen gegen MBT-Verluste

Als Maßnahme gegen den Verlust von MBT wurde versucht, die Thiolgruppe durch geeignete Reduktionsmittel zu schützen. Hierfür wurden folgende Reduktionsmittel, wie sie üblicherweise bei biochemischen Analysen zum Schutz proteinogener Thiolgruppen eingesetzt werden (Dawson et al. 1986), getestet:

- Glutathion (GSH)
- o 1,4-Dimercapto-2-propanol

Mercaptoessigsäure

Cystin

- 0
- 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol

- Mercaptoethanol (SH-CH2CH2-OH)
- o Mercaptoessigsäure-Natriumsalz

Von den getesteten Reduktionsmitteln erwies sich Glutathion (GSH) als am besten geeignet. Bei den anderen war die schützende Wirkung zu gering oder es wurden hohe MBT Blindwertgehalte beobachtet. Bereits Hansson et al. (Hansson & Agrup 1993) wandten GSH zur Prävention der MBT-Oxidation an und konnten innerhalb des Versuchszeitraumes von 2 Stunden keine Abnahme der MBT-Konzentration bzw. Bildung von MBTS feststellen. Hansson et al. arbeiteten in höheren Konzentrationsbereichen (100 µmol GSH + 1 µmol MBT auf 2 mL Lösung) als in den hier durchgeführten Experimenten, doch war bei Hansson et al. das Verhältnis von GSH zu MBT (100 mol GSH pro mol MBT) deutlich geringer als in dem im Folgenden beschriebenen Versuch (i), indem das Verhältnis von GSH zu MBT bei ca. 40 000 mol GSH pro mol MBT lag.

Der Vorteil der Zugabe von GSH soll an zwei Beispielen dargestellt werden:

(i) 100 mL Reinstwasser wurde mit MBT bis zu einer Konzentration von  $c_{MBT} = 2 \mu g/L$  dotiert. Mittels SPE erfolgte eine Anreicherung auf das 100-fache. Von insgesamt vier Versuchsansätzen wurden zwei mit GSH versetzt (500 µL; 0,1 mol/L). Verglichen mit einer Standardlösung mit  $c_{MBT} = 200 \mu g/L$  (theoretische Konzentration in den Extrakten) zeigten die ohne GSH extrahierten MBT-Lösungen eine Wiederfindung von 9 % (+/- 2 %). Die mit GSH versetzten Ansätze hingegen ergaben eine Wiederfindung von 62 % (+/- 6 %). Demnach kann durch den Einsatz von GSH die Wiederfindung nicht bis nahe 100 % angehoben werden, aber der Verlust von MBT während der Festphasenextraktion wird signifikant verringert. Offensichtlich ist das oxidierende Potential, dass während der SPE die Oxidation von MBT verursacht sehr stark, sodass selbst ein sehr großer GSH Überschuss bezogen auf MBT eine teilweise Oxidation nicht unterbinden kann. Die positiven Auswirkungen dieser verbesserten Wiederfindung werden auch im zweiten Beispiel deutlich.

(ii) Je fünf Proben von Zu- und Ablauf einer Kläranlage standen zur Verfügung. Von jeder Probe wurden zwei Ansätze per SPE extrahiert: ein Ansatz nach vorheriger Zugabe von GSH, ein Ansatz ohne GSH-Zugabe. Die Extrakte wurden mittels LC-MS/MS analysiert (keine Berechnung der Konzentration; lediglich Ermittlung der Peakfläche). In allen fünf Extrakten jener Zulaufproben, deren Extraktion nach vorheriger Zugabe on GSH erfolgte, wurden deutliche MBT-Gehalte (600-1600 AU; Abbildung 5-6) detektiert. Bei den mit GSH extrahierten Ablaufproben wurden in zwei von fünf Extrakten (Ablauf 3 und 4) signifikante MBT-Peaks beobachtet (400-900 Flächeneinheiten). Die MBT-Peaks der anderen drei mit GSH extrahierten Ablaufproben (Ablauf 1, 2, und 4 in Abbildung 5-6) sind

weniger signifikant (unter 50 Flächeneinheiten) und liegen im Bereich der Detektionsgrenze. Wurde vor der Extraktion kein GSH zugesetzt, so war die MBT-Konzentration in den Extrakten deutlich geringer als in den Extrakten, die unter Verwendung von GSH hergestellt wurden. Die Flächen der MBT-Peaks "ohne GSH" betrugen weniger als 10 % der MBT-Peakfläche "mit GSH".

Wie weiter unten in dieser Arbeit aufgeführt, ergab eine umfangreiche Studie (*Ruhl1* in Abbildung 7-2), die u. a. MBT im Zulauf einer kommunalen Kläranlage erfasste, dass dessen Konzentration bei ca. 0,2 µg/L liegt. Wäre die Bestimmung dabei ohne GSH erfolgt, hätte dieser systematische Fehler zu einer Verringerung der Konzentration um mehr als 90 % der tatsächlichen Konzentration geführt und das Auftreten von MBT wäre dadurch wohl nicht signifikant gewesen.

Bezüglich der Ablaufproben (Abbildung 5-6) konnte in keinem der fünf Extrakte, die ohne GSH extrahiert wurden, MBT nachgewiesen werden. Ohne den Einsatz von GSH wären hier für die Ablaufproben 3 und 5 falsch-negative Ergebnisse erzielt worden.





Diese Resultate zeigen auch, dass die Verluste von MBT während der Festphasenextraktion nicht notwendigerweise matrixbedingt sind, da MBT-Verluste sowohl bei der Extraktion von MBT aus Kläranlagenzulauf wie auch aus Reinstwasser auftreten. Zugabe von GSH kann den Verlust von MBT während der Festphasenextraktion nicht vollständig verhindern, aber die Detektionsgrenzen werden erheblich verringert, was der Ermittlung falsch-negativer Resultate entgegenwirkt.

# 5.5 Unterscheidung zwischen Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung

Bei der Analytik mittels SPE LC-ESI-MS hängt die Wiederfindung der Analyte vorwiegend von zwei Faktoren ab: (i) vollständige Extraktion bei der Festphasenextraktion und (ii) unbeeinflusste lonisierung bei der Electrospray-Ionisierung (Reemtsma 2001; Stueber & Reemtsma 2004). Während es durch SPE (sofern keine Kontamination erfolgt) nur zu Wiederfindungsverlusten kommen kann, besteht bei der ES-Ionisierung die Möglichkeit, dass sich Matrix ionisierungshemmend (Verringerung der Signalintensität) oder ionisierungsfördernd (Verstärkung der Signalintensität) auf die Analyten auswirken kann. Für die Optimierung einer SPE LC-ESI-MS-Methode ist die Unterscheidung dieser

beiden Faktoren wichtig. Zur getrennten Untersuchung dieser beiden Faktoren wurden Experimente mit Standard-Additions-Reihen (Std-Add-Reihen) durchgeführt. Ausgehend von drei Dotierlösungen unterschiedlicher Konzentration mit jeweils sechs Benzothiazolen wurden folgende Ansätze hergestellt (siehe auch: Abbildung 4-1 in Kapitel 4.6):

• Std-Add-Reihe Std-Lsg

Standardlösungen wurden direkt per LC-ESI-MS/MS analysiert.

o Std-Add-Reihe Matrix

100 mL Reinstwasser wurde per SPE extrahiert und auf 2 mL eingeengt; der Extrakt wurde aufgeteilt und so mit Dotierlösung versetzt, dass 1 mL Gesamtvolumen 50 µL Dotierlösung entsprachen. Die so hergestellte, "dotierte" Matrixlösung wurde per ESI-MS/MS analysiert;

• Std-Add-Reihe SPE+Matrix

100 mL Reinstwasser wurden mit 100  $\mu$ L Dotierlösung versetzt, per SPE extrahiert, auf 2 mL eingeengt und per ESI-MS/MS analysiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ L Dotierlösung und Einengen der Extrakte auf 2 mL entsprechen auch in diesem Ansatz 50  $\mu$ L Dotierlösung 1 mL Gesamtvolumen.

Reinstwasser wurde innerhalb dieser Versuche lediglich zur Illustration des Vorgehens und möglicher Effekte als "Matrix" gewählt, aus welcher die Analyte extrahiert wurden. Wie sich zeigt (s. u.), kommt es trotz der Verwendung von Reinstwasser zum Auftreten von Matrixeffekten. Es wird vermutet, dass die SPE-Extrakte Organika enthalten, die durch die Elution mit Aceton/MeOH aus den SPE-Kartuschen (Kartuschenmaterial, Fritten, Festphase) ausgewaschen wurden. Möglicherweise hat auch das zum Schutz von MBT zugegebene GSH einen Einfluss, denn durch die Verwendung der Festphase *Oasis HLB* (sehr hohe Kapazität vor allem auch bei polaren Analyten) wird GSH bei der Festphasenextraktion in gleicher Weise wie die Analyte aufkonzentriert und liegt im Extrakt in vergleichsweise hoher Konzentration vor (Zugabe in die zu extrahierenden Lösungen: Benzothiazole: 2 bis 800 ng bei *SPE+Matrix*; Zugabe von GSH: 30,7 mg bei *Matrix* und *SPE+Matrix*).

Die Responsefaktoren (**R**) der Regressionsgeraden aus den Standard-Additions-Reihen *Std-Lsg*, *Matrix* und *SPE+Matrix* (Daten und Diagramme s. Anhang Kapitel 13.2) wurden verglichen. Unterschiede zwischen den Responsefaktoren **R**(*Std-Lsg*) und **R**(*Matrix*) weisen dabei auf Matrixeinflüsse bei der ES-Ionisierung hin. Differenzen zwischen den Responsefaktoren **R**(*Matrix*) und **R**(*SPE+Matrix*) sind hingegen auf Verluste während der Extraktion zurückzuführen.

Der Quotient der Responsefaktoren **R**(*Matrix*) / **R**(*Std-Lsg*) spiegelt das Ausmaß des Matrixeinflusses wider. In Abbildung 5-7 (links) sind diese Quotienten für die sechs untersuchten Benzothiazole dargestellt. Die Ionisierung von BT, MBT und OHBT wird demnach nur wenig (< 10 %) durch Matrix beeinflusst. Im Falle von MBT führen Matrixeffekte zu einer leichten Signalverstärkung. Im Unterschied hierzu sind bei ABT, MTBT und BTSA Matrixeffekte deutlicher ausgeprägt und führen zu einer Signalunterdrückung von bis zu 30 % (MTBT) bzw. 40 % (ABT, BTSA).



Abbildung 5-7: Differenzierte Betrachtung von Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung. Responsefaktoren sowie Std-Add-Diagramme sind im Anhang Kapitel 13.2 dargestellt.

Abbildung 5-7 zeigt die durch SPE beeinflusste Wiederfindung **R**(*SPE+Matrix*) / **R**(*Matrix*) (rechts). Diese liegt für ABT, BTSA und OHBT im Bereich von 82 bis 105 %. Die hohe Wiederfindung der beiden polarsten Analyte zeigt, dass diese bei der Extraktion nicht durchgebrochen sind. Die Wiederfindung von BT, MBT und MTBT lag bei lediglich 60 bis 70 %. Von den untersuchten Benzothiazolen weisen diese drei den höchsten Dampfdruck auf: BT: 0,13 mbar (20 °C); MBT: 0,62\*10e-3 mbar (25 °C); MTBT: 0,35\*10e-3 mbar (25 °C) (s. Anhang Kapitel 12). Auf die Volatilität von BT, MBT und MTBT weisen auch die GC-basierenden Analysenmethoden hin, mit welchen diese drei Stoffe in den 1970er- und 1980er-Jahren bestimmt wurden. Obgleich vor dem Einengen des SPE-Eluates 0,5 mL Wasser als "keeper" zugegeben wurde, besteht die Möglichkeit, dass Verluste von BT, MBT und MTBT beim Einengen (50 min; 45 °C; unter Vakuum) auftreten, was auch schon an anderer Stelle berichtet wurde (Reemtsma 1994). Für MBT kommt erschwerend hinzu, dass trotz des Einsatzes des Reduktionsmittels GSH eine teilweise Oxidation der Thiolgruppe nicht ausgeschlossen werden kann.

Die hier ermittelten Wiederfindungsverluste bei der Festphasenextraktion und Matrixeffekte wurden vor dem Hintergrund der Anwendung des Standard-Additions-Verfahrens bzw. der *Externen Kalibration in Probenmatrix* (s. u.) für zukünftige, quantitative Bestimmungen, als akzeptabel erachtet, da diese Verfahren sowohl Matrixeffekte als auch SPE-Wiederfindungsverluste berücksichtigen und bis zu einem gewissen Maße kompensieren.

# 5.6 Reduktion des ESI-Volumenstromes durch *post-column splitting* (PCS)

Wie in Kapitel 5.5 deutlich wurde, können schon geringe Mengen co-eluierender Matrix die Electrospray-Ionisierung (ESI) beeinflussen. Bei Proben mit hohem Matrixgehalt (z. B. Rohabwasser, Klarlauf, Oberflächenwasser, Straßenablauf), tritt dieser Effekt noch stärker zu Tage, insbesondere, wenn eine Anreicherung mittels SPE erfolgt, denn neben den Zielanalyten wird dabei auch Matrix angereichert. Besonders bei einem Analytspektrum wie dem der sechs Benzothiazole, die einen weiten pH- und Polaritätsbereich abdecken und die SPE-Methode recht unspezifisch gewählt werden muss, lässt sich eine ausgeprägte Anreicherung von Matrix nicht vermeiden. Bei der chromato-graphischen Trennung werden Matrixkomponenten gleich den Zielanalyten getrennt und können co-

eluieren. In der ESI-Quelle können diese co-eluierenden Stoffe die Ionisation der Zielanalyte verschlechtern oder, wenngleich weniger häufig, verstärken. Eine Technik wurde deshalb in die Analysenmethode integriert, die den Einfluss von co-eluierenden Stoffen begrenzt bzw. reduziert.

Publikationen beschreiben eine Reduzierung der Ionisations-Unterdrückung bei Electrospray-Ionisierung, durch Verringerung des Volumenstromes, welcher der ESI-Quelle zugeführt wird (Gangl et al. 2001). Eine Verringerung des Flusses kann auf einfachem Wege durch Aufteilen (splitting) des Säuleneluats der HPLC-Trennung erreicht werden (post-column splitting; PCS), sodass nur ein Teil des gesamten Volumenstromes, welcher die HPLC-Säule verlässt, der ESI-Quelle zugeführt wird. Durch die Verringerung des Volumenstromes mittels PCS wird zwar auch die Menge Analyt reduziert, die der ESI-Quelle zugeführt wird, aber das hat, bis zu einem gewissen Grad, keine Reduktion sondern teilweise sogar eine Verstärkung der Signalintensität zur Folge. Bei sehr kleinen Volumenströmen (unterhalb ca. 5 µL/min) arbeitet ein LC-MS-Detektor masseabhängig (Niessen 1999), wohingegen bei hohen Volumenströmen (über ca. 20 µL/min) ein ESI-MS-Detektor wie ein konzentrationsabhängiger Detektor arbeitet (Hopfgartner et al. 1993; Voyksner 1997). Der genaue Volumenstrom, bei welchem ein LC-MS-Detektor konzentrationsabhängig bzw. masseabhängig arbeitet, ist in erster Linie von der Bauart des Gerätes abhängig. Neben einem maximalen bzw. optimalen Volumenstrom gibt es auch eine maximal applizierbare Konzentration, bis zu welcher das Detektorsignal proportional zur Analytkonzentration ansteigt (linearer, dynamischer Bereich). Je nach Gerät, zu analysierendem Stoff und weiterer in der Lösung vorliegender Elektrolyte liegt diese Konzentration bei ca. 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-4</sup> mol/I. Oberhalb des linearen, dynamischen Bereiches stagniert die Signalstärke zunächst und nimmt bei weiterer Konzentrationszunahme wieder ab (Bruins 1997; Wang & Cole 1997).

Um den positive Effekt einer Reduzierung des Volumenstromes zur veranschaulichen, werden an dieser Stelle die Grundzüge des Mechanismus der Electrospray-Ionisierung kurz beschrieben.

#### 5.6.1 Kurze Theorie zur Electrospray-Ionisierung

Bei der Electrospray-Ionisierung (ESI) liegt der zu untersuchende Analyt in Lösung vor. Diese Lösung wird der "Ionenquelle" (ein abgeschlossener Raum unter Normaldruck) durch eine Kapillare, an deren Spitze eine hohe Spannung anliegt, zugeführt (Abbildung 5-8). Aufgrund der angelegten Spannung werden entgegengesetzt geladene, gelöste Elektrolyte angezogen und entladen. Dadurch bildet sich ein Ladungsgradient zwischen Lösung innerhalb der Kapillare und Lösung, die die Kapillare verlässt, aus (Kebarle & Ho 1997). Ein inertes *Nebulizer Gas* unterstützt die Bildung eines *spray*-förmigen Aerosols aus kleinen Tröpfchen. Die kleinen Tröpfchen besitzen aufgrund des vormaligen Ladungsgradienten einen Überschuss an Ladungen (Überschuss an positiven Ladungen bei positiver Kapillarenspannung wie dargestellt in Abbildung 5-8) und wandern entsprechend des elektrischen Feldes zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die Ladungen verteilen sich ähnlich wie in einem Faraday'schen Käfig unter Maximierung ihres Abstandes auf der Tröpfchenoberfläche.



Abbildung 5-8: Schematische Darstellung der Electrospray-Ionisierung. Bildung geladener Tröpfchen, Evaporation des Lösungsmittels und Coulomb'sche Explosion.

In der Ionisations-Quelle wird durch erhöhte Temperatur und das Durchströmen der Quelle mit *Desolvation Gas* eine Verflüchtigung des Lösungsmittels erreicht, wodurch die Tröpfchen schrumpfen. Durch die Verringerung der Tröpfchengröße steigt die Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche und gleichzeitig die Coulomb'sche Abstoßung der positiven Ladungen an, bis es zu "Coulomb'schen Explosionen" kommt: das Tröpfchen hoher Ladungsdichte zerfällt in viele kleinere, die Ladungen werden dabei auf die entstandenen Tröpfchen verteilt (Abbildung 5-8). Bei Beobachtung der Spaltung von Tröpfchen mit einem Radius r > 1  $\mu$ m entstanden durch Coulomb'sche Explosion mehr als 20 Folgetröpfchen. Durch weitere Zyklen von Evaporation und Coulomb'scher Explosion entstanden Tröpfchen mit Radien von ca. 10 nm. Zeitlich gesehen, läuft die Bildung solch kleiner Tröpfchen unter 500  $\mu$ s ab (Kebarle & Ho 1997).

Für den letztendlichen Übergang der gelösten Ionen aus den kleinen geladenen Tröpfchen in die Gasphase gibt es derzeit zwei Theorien. Iribarne und Thomsons (Iribarne & Thomson 1976; Thomson & Iribarne 1979) Theorie der Ionenverflüchtigung (*ion evaporation*) besagt, dass der Übergang von geladenen Teilchen aus den Tröpfchen heraus erfolgt, wohingegen nach der Theorie von Dole et al. (Dole et al. 1968) Evaporation und Coulomb'sche Explosion solange erfolgen, bis ein Tröpfchen übrig bleibt, das nur ein Ion enthält. Bisherige Untersuchungen lieferten Bestätigungen für beide Theorien. Eine Unterscheidung der beiden Theorien ist lediglich im Bereich von Tröpfchengrößen von 1 nm < r < 10 nm möglich. Bei Tröpfchengrößen von r < 1 nm werden die den beiden Theorien zu Grunde liegenden Vorgänge ununterscheidbar (Kebarle & Ho 1997). Gemeinsam besagen beide Theorien, dass Moleküle, die eine geringe Affinität zum Lösungsmittel und eine hohe Oberflächenaktivität haben, bevorzugt in die Gasphase abgegeben werden.

#### 5.6.2 Positive Effekte der Reduktion des ESI-Volumenstromes

ESI-MS-Detektoren sind prinzipiell masseabhängige Detektoren, denen ein sehr geringer Volumenstrom, im Bereich von 10 µL und kleiner, appliziert wird (Niessen 1999). In diesem Bereich wird die Signalintensität durch Vergrößerung des Volumenstromes ebenfalls größer, da die lonisationsausbeute bei der ESI-Ionisierung nicht der limitierende Faktor ist (bildlich gesehen: nahezu alle Analytteilchen werden ionisiert, da Ladungen im Überschuss vorhanden sind).

Durch die Kopplung mit HPLC-Trennverfahren wird dem ESI-MS-Detektor oft ein größerer Volumenstrom zugeführt (oft im Bereich von 100 bis 2000 µL/min). Bei solch hohen Volumenströmen steigt das Detektorsignal nicht mehr proportional mit der Erhöhung des Volumenstromes an und eine

strenge Masseabhängigkeit ist nicht mehr gegeben. Zur Erhöhung des Detektorsignals bedarf es einer Konzentrationserhöhung des Zielanalyten (Konzentrationsabhängigkeit). Folgende Effekte spielen hier eine Rolle: (i) durch den höheren Volumenstrom werden der ESI-Quelle pro Zeiteinheit mehr Elektrolytteilchen (Zielanalyte, Eluentmodifier, Puffersubstanzen, Matrixbestandteile) zugeführt. (ii) Für einen Volumenstrom ab ca. 2 µL/min zeigten Kebarle et al. (Kebarle & Tang 1993), dass der Strom I proportional zur Zunahme des Volumenstromes ansteigt. Bei etwa 20 µL/min jedoch ist das Verhältnis nicht mehr proportional, der Anstieg flacht ab und sinkt sogar jenseits von 100 µL/min. Möglicherweise hängt dies mit der Bildung größerer Aerosoltröpfchen aufgrund höherer Volumenströme (Niessen 1999) zusammen, denn für ein definiertes Flüssigkeitsvolumen nimmt die Oberfläche der Aerosoltröpfchen bei Bildung größerer Tröpfchen deutlich ab. Bildlich gesehen steht dadurch weniger Platz zur Aufnahme von Ladungen (die sich auf der Oberfläche verteilen) zur Verfügung. Dies führt zu einem geringeren Verhältnis von aufgenommener Ladung pro Lösungsmittelvolumen bzw. zu einem geringeren Verhältnis von aufgenommener Ladung zu ionisierenden Teilchen im Aerosoltröpfchen. (iii) Ferner wird durch die größeren Tröpfchen die Zeit erhöht, der es bedarf, um Lösungsmittel zu verdampfen, damit es zu Coulomb'schen Explosionen kommt und schließlich lonen in die Gasphase übergehen können (je kleiner die Tröpfchen, desto kürzer die Zyklen von Evaporation und Coulomb'scher Explosion) (Kebarle & Tang 1993).

Die Effekte (i) und (ii) kumulieren in einer ausgeprägten Konkurrenz der potentiellen Ladungsträger in den Aerosoltröpfchen (Zielanalyte, Puffersubstanzen, Matrix), um die auf der Oberfläche vorhandenen Ladungen. Schließlich werden jene Stoffe als Ionen in die Gasphase übergehen, die die höchste Affinität zu den Ladungen (geringste Affinität zum Lösungsmittel und die höchste Oberflächenaktivität) aufweisen. Zielanalyte, die verglichen mit Elektrolytteilchen oder Matrixbestandteilen, eine vergleichsweise geringe Affinität zu den vorhandenen Ladungen haben, werden dadurch stark diskriminiert.

Eine Reduktion des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes führt nicht nur zu geringeren Tröpfchengrößen der "Ausgangs"tröpfchen und damit zu schnellerer und vollständigerer Ionisation, sondern erhöht auch das Verhältnis von Ladungen zu potentiellen Ladungsträgern, wodurch die Zielanalyte weniger stark diskriminiert werden. Insgesamt hat eine Reduktion des ESI-Volumenstromes also eine höhere Ionisationsausbeute zur Folge.

Abgesehen von der besseren Ionisationsausbeute verringert sich durch die Reduktion des Volumenstromes bei der Analyse von Realproben auch die Menge flüchtiger und nichtflüchtiger Matrixkomponenten, die insgesamt in die ESI-Quelle gelangen. Das verringert das chemische Rauschen im Detektor und resultiert in einem höheren Verhältnis von Analytsignal zu Grundrauschen *S/N* und erhöht ferner die Leistungsfähigkeit und die Stabilität des ESI-MS Systems, besonders bei langen Probenserien (Kloepfer et al. 2005).

## 5.6.3 ESI-MS-Response von Benzothiazolen bei Reduktion des ESI-Volumenstromes

#### Benzothiazole in Reinstwasser/Methanol

Die Auswirkung einer Fluss-Reduzierung auf den ESI-MS-Response (R) von sechs Benzothiazolen in einem Wasser/MeOH-Gemisch (ca. 1 % MeOH) zeigt Abbildung 5-9 (Auflistung der Einzeldaten im Anhang Kapitel 13.3). Am deutlichsten ist die starke Zunahme des Response bei abnehmendem Volumenstrom für **BT** und **MTBT** zu erkennen (positive ESI). Während eine Verringerung des Flusses von 500 auf 155  $\mu$ L/min noch eine moderate Auswirkung auf die Responsesteigerung hat, steigt der Response bei weiterer Volumenstromverringerung stark an und erreicht bei 20  $\mu$ L/min fast das 8-fache (MTBT) bzw. fast das 10-fache (BT) des Wertes bei 500  $\mu$ L/min. Auf den Response des dritten Analyten, der im positiven Modus ionisiert wird, **ABT**, hat die Volumenstromverringerung einen geringen Einfluss. Durch Verringerung des Flusses ist hier ein leichter Rückgang des Response auf ca. 80 % (bei 20  $\mu$ L/min) zu erkennen. Offensichtlich ist bei ABT die Ionisationsausbeute selbst bei 500  $\mu$ L/min sehr hoch, was auf eine äußerst hohe Affinität von ABT zu den Ladungen auf den Aerosoltröpfchen bedeutet. Dies belegt auch der hohe absolute Response von ABT (Abbildung 5-11). Aus dem Anstieg (wenngleich nur geringer Anstieg) des Response von ABT bei ansteigenden Flussraten lässt sich ableiten, dass im Falle von ABT der ESI-MS-Detektor selbst bei Volumenströmen von 500  $\mu$ L/min noch bis zu einem gewissen Grad wie ein masseabhängiger Detektor arbeitet. Hingegen ist bei BT und MTBT eine Masseabhängigkeit selbst im Bereich von 20  $\mu$ L/min nicht mehr zu erkennen, da der Response bei Erhöhung der eingebrachten Masse Analyt abnimmt.

Die negativ ionisierten Benzothiazole (BTSA, MBT, OHBT) weisen bei Reduktion des ESI-Flusses ein ähnliches Verhalten auf (Abbildung 5-9). Bei Reduktion des Flusses von 500  $\mu$ L/min auf 90  $\mu$ L/min ist eine Steigerung des Response zu erkennen (ESI-MS arbeitet konzentrationsabhängig). Der Responseanstieg ist für **OHBT** am größten und erreicht bei 90  $\mu$ L/min etwa das 2,5-fache des Response bei 500  $\mu$ L/min. Für die Detektion von OHBT ist dies von besonderem Vorteil, da OHBT den geringsten absoluten Response unter den untersuchten Benzothiazolen aufweist (Abbildung 5-11). Der Response von **BTSA** und **MBT** ist durch Volumenstromverringerung von 500 auf 90  $\mu$ L/min lediglich um das 1,5-fache angestiegen. Den drei negativ ionisierten Benzothiazolen ist gemeinsam, dass eine weitere Volumenstromverringerung unter 90  $\mu$ L/min einen starken Abfall des Response zur Folge hat (Detektor arbeitet masseabhängig).



Abbildung 5-9: Änderung des Response von sechs Benzothiazolen bei Untersuchung von Standardlösungen und Reduzierung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes. Dargestellt ist der relative Response bei unterschiedlichen Flussraten, bezogen auf 500 µL/min.
#### Benzothiazole in Klarlauf und Rohabwasser

Werden die untersuchten Benzothiazole in Realproben mit hohem Matrixgehalt analysiert, so sind im Responseverhalten durch Volumenstromverringerung durch PCS keine gravierenden Veränderungen verglichen zum Responseverhalten bei der Analyse der Stoffe in Standardlösungen zu erkennen (Abbildung 5-10). BT und MTBT zeigen weiterhin den höchsten Response bei 20 µL/min und der Response von BTSA, OHBT und MBT verringert sich bei Flüssen kleiner 90 µL/min stark. Allerdings scheint bei sehr hohem Matrixgehalt eine Masseabhängigkeit des ESI-MS-Detektors bei der Detektion von ABT nicht mehr gegeben, da nun der Response bei Volumenstromverringerung ansteigt (Abbildung 5-10). Ferner ist der positive Effekt der Reduktion des Flusses auf OHBT nicht mehr so ausgeprägt wie bei der Untersuchung von OHBT in Standardlösungen.



Volumenstrom in die ESI-Quelle [µL/min]

Abbildung 5-10: Änderung des Response von sechs Benzothiazolen bei Untersuchung von Klarlauf und Rohabwasser und Reduzierung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes. Dargestellt ist der relative Response bei unterschiedlichen Flussraten, bezogen auf 500 µL/min.

Da eine Flussreduzierung bei der Analyse von Benzothiazolen im positiven bzw. negativen lonisationsmodus unterschiedliche Auswirkungen auf den Response der Analyte hat, wurde bei negativer lonisierung der ESI-Quelle ein Volumenstrom von 90 µL/min zugeführt, wohingegen bei positiver lonisierung auf ein Volumenstrom von 20 µL/min reduziert wurde.

#### Betrachtung des absoluten Response

Die Auswirkung der Volumenstromreduzierung durch Anwendung von *post-column splitting* (PCS) auf die absoluten Responsefaktoren von ABT, BT, MTBT, BTSA, MBT und OHBT wurden in weiteren Versuchen unter Anwendung des Standard-Additions-Verfahrens (Std-Add-Verfahren) untersucht und sind in Abbildung 5-11 dargestellt. Die Diagramme zeigen die absoluten Responsefaktoren bei nicht reduziertem Volumenstrom (500 µL/min "ohne PCS") und nach Reduktion des Volumenstromes ("mit PCS") auf 20 µL/min im positiven ESI-Modus bzw. auf 90 µL/min im negativen ESI-Modus. Die Responsefaktoren spiegeln die Steigungen der Ausgleichsgeraden in den Std-Add-Diagrammen wider. Std-Add der Analyte erfolgte in Reinstwasser (H<sub>2</sub>O), in Rohabwasser (Zulauf "Zu"

einer Kläranlage) und in Klarlauf (Ablauf "Ab" einer Kläranlage). Eine Auflistung der Einzeldaten ist im Anhang Kapitel 13.3 wiederzufinden.

Bei einem Volumenstrom von 500 µL/min ("ohne PCS") zeigt sich bei allen sechs Benzothiazolen eine Abnahme des Response bei zunehmendem Matrixgehalt (H<sub>2</sub>O < Ab < Zu) (Abbildung 5-11). Dies ist im weniger selektiven, positiven Ionisierungs-Modus (ABT, BT, MTBT) stärker ausgeprägt als bei negativer Ionisierung. Durch Reduktion des ESI-Flusses ("mit PCS") kann dieser Responseverlust verhindert werden (ABT) bzw. wird der Response deutlich erhöht (BT, MTBT). Für BT und MTBT spiegelt dieser Std-Add-Versuch die in Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10 ermittelten Ergebnisse sehr gut wider. Hingegen treten die positiven Effekte der Volumenstromreduktion von ABT in Abbildung 5-11 deutlicher hervor als in Abbildung 5-10 (geringe Responseunterschiede bei unterschiedlichen Flussraten). Da es sich um unterschiedliche Probelösungen handelt, ist dies vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Matrix zurückzuführen.

Bei den im negativen Modus ionisierten Stoffen BTSA, OHBT und MBT (Abbildung 5-11) ist der positive Effekt der Volumenstromverringerung weniger stark. Auf BTSA scheint weder ein hoher Matrixgehalt ("Ab", "Zu") noch eine Reduktion des ESI-Flusses einen signifikanten Effekt zu haben. Bei MBT und OHBT ist eine Abnahme des Response durch zunehmende Matrix deutlicher zu beobachten (bei MBT ca. 30 %; bei OHBT ca. 20 %). Die Responsefaktoren bei reduziertem ESI-Fluss liegen etwas tiefer als bei 500 µl/min. Bemerkenswert ist allerdings, dass der Response bei zunehmender Matrix nahezu gleich bleibt, tendenziell sogar ansteigt.



Abbildung 5-11: Einfluss von PCS auf den ESI-MS-Response. Sechs Benzothiazole wurden aus drei unterschiedlichen Matrices jeweils einmal mit und einmal ohne Verwendung von PCS untersucht.

Da sich eine Volumenstromverringerung durch die Anwendung von PCS besonders im positiven ESI-Modus response-verstärkend auswirkt und darüber hinaus im positiven wie auch im negativen ESI-Modus die Quellen- und Quadrupolkontamination reduziert, wurde *post-column splitting* standard-mäßig angewandt.

# 5.7 Quantifizierung durch externe Kalibration in Probenmatrix

Sofern keine <sup>13</sup>C-, <sup>2</sup>H- oder anders markierte Standardsubstanzen erhältlich oder diese zu teuer sind, ist bei der quantitativen Analyse von Proben mit hohem Matrixgehalt der Einsatz des Standard-Additions-Verfahrens geboten. Die Anwendung des Std-Add-Verfahrens im Routinebetrieb oder für die Analyse von umfangreichen Probenserien ist jedoch sehr aufwändig. Es wurde daher geprüft, wie groß die Response-Schwankung zwischen einigen Proben einer Probenart ist. Eine hohe Schwankung, deutet auf eine inhomogene Probenserie hin. Bei geringer Schwankung, wie sie bei homogenen Proben ähnlicher Matrix zu erwarten ist, kann hingegen durchaus in Erwägung gezogen werden, den mittleren Response einer Auswahl von Proben auf alle Exemplare einer Probenserie anzuwenden. Diese Art der Kalibration wird Externe Kalibration in Probenmatrix (external sample calibration) genannt (Stueber & Reemtsma 2004). Sie ist ungleich verlässlicher, als die Kalibration über eine Standard-Reihe in reinem Lösungsmittel oder Wasser (Externe Kalibration; external calibration), denn die Kalibration in Probenmatrix berücksichtigt Matrixeffekte und, wenn vor der Festphasenextraktion dotiert wird, auch mögliche Wiederfindungsverluste während der SPE (Matuszewski et al. 2003; Stueber & Reemtsma 2004). Darüber hinaus ist die Externe Kalibration in Probenmatrix weitaus weniger arbeits-, zeit- und kostenintensiv als ein vollständiges Standard-Additions-Verfahren mit allen Proben einer Serie.

Eine Evaluation der vollständigen Analysenmethode, bestehend aus

- SPE nach Zugabe von GSH,
- Trennung per HPLC,
- Volumenstromreduktion durch PCS und
- Detektion mittels ESI-MS im MRM-Modus (zwei Übergängen je Analyt)

wurde mittels Serien von Standard-Additions-Experimenten durchgeführt. Standard-Addition (ein undotierter Ansatz und drei Dotierungen) wurde auf 8 Proben angewandt (vier mal Klarlauf und viermal Rohabwasser einer Kläranlage). Für jedes der sechs untersuchten Benzothiazole wurden so 8 Responsefaktoren (Steigung der Std-Add-Geraden) erzeugt. In Abbildung 5-12 sind die Mittelwerte der Responsfaktoren dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Variabilität des Response für jeden Analyten in den beiden Matrices und weisen zwei Standardabweichungen (+sd; -sd) aus. Die Response-Variabilität ist für MTBT (in Rohabwasser !) am geringsten (rsd = +/- 1 %). BTSA hingegen zeigt die stärkste Variabilität sowohl in Rohabwasser (rsd = +/-25 %) als in Klarlauf (rsd = +/-21 %). Eine maximale Variabilität von 21 % in Klarlauf wird als noch tolerabel angesehen, wohingegen ein Wert von 25 % bezogen auf Rohabwasser gut vertreten werden kann. Besonders auch vor dem Hintergrund, dass neben matrixbeeinflussten Schwankungen auch die gesamte Probenaufarbeitung (SPE) berücksichtigt wird, ist eine maximale Variabilität von 25 % tolerabel. Vorausgesetzt, dass es sich bei der Response-Variabilität um einen statistischen Fehler handelt und nicht um einen systematischen Fehler, werden durch die *Externe Kalibration in Probenmatrix* innerhalb einer Probenserie Resultate erzielt, die trotz der Variabilität den wahren Wert widerspiegeln.



Abbildung 5-12: Mittelwert und Variabilität des Response von sechs Benzothiazolen in zwei unterschiedlichen Matrices. Roh.: Rohabwasser; Klar.: Klarlauf; Mittelwert aus n = 4; Fehlerbalken: +1sd und –1sd.

Für vier der Benzothiazole (BTSA, MBT, OHBT, ABT) unterscheiden sich die Responsefaktoren von Rohabwasser und Klarlauf erheblich, wobei die Responsefaktoren von MBT und OHBT bemerkenswerterweise in den Rohabwässern höher sind als in den vergleichsweise "sauberen" Klarläufen. MBT und OHBT (beide negative ESI) wurden in Rohabwasser mit nahezu doppelter Empfindlichkeit detektiert als in Klarlauf. Die Ursache hierfür könnte eine signalverstärkende Wirkung der Matrix sein oder aber die Matrix des Rohabwassers verursacht eine geringere Signalsuppression als die des Klarlaufes. Die beiden früh eluierenden Stoffe BTSA (neg. ESI) und ABT (pos. ESI) zeigen gegenüber deren Response in Klarlauf eine starke Ionisations-Unterdrückung in Rohabwasser (27 % BTSA; 53 % ABT). Für BT und MTBT (beide pos. ESI) liegen die mittleren Responsefaktoren aus Rohabwasser und Klarlauf im gleichen Bereich, was auch auf den Einsatz von PCS zurückzuführen ist (siehe voriges Kapitel: 5.6). In den Versuchen aus Kapitel 5.6 zur Volumenstromreduzierung wurden Rohabwasser und Klarlauf direkt (ohne SPE) analysiert. Unterschiede in den Ergebnissen (starke Responseunterschiede zwischen Rohabwasser und Klarlauf bei BTSA; kaum Responseunterschiede zwischen Rohabwasser und Klarlauf bei BT und MTBT) sind darauf zurückzuführen, dass die Responsefaktoren in Abbildung 5-12 aus SPE-Extrakten ermittelt wurden. Durch die Festphasenextraktion kann sich der Gehalt und Charakter einer Matrix im Extrakt stark von dem in der ursprünglichen Probe unterscheiden. Ferner muss erwähnt werden, dass die Untersuchungen von Rohabwasser und Klarlauf an unterschiedlichen Tagen erfolgten, sodass die Unterschiede in den Responsefaktoren zwischen den Probenmatrices auch auf die Tages-Variabilität des MS-Gerätes zurück zu führen sind.

Alle diese Versuche zeigen auch, dass sich die Vorhersage der Intensität und Auswirkungsrichtung von Matrixeffekten, ob Signalunterdrückung oder -verstärkung zu erwarten ist, sehr schwierig gestaltet.

### 5.8 Bestimmungsgrenzen

Bei den Bestimmungsgrenzen einer analytischen Methode ist wichtig zu beschreiben, wie diese ermittelt wurden, da es mehrere Verfahren gibt, die sich in der Begriffsdefinition unterscheiden.

#### 5.8.1 Hier gewählte Möglichkeit zur Ermittlung von Bestimmungsgrenzen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bestimmungsgrenzen über das Verhältnis von Analyt-Signal zu Grundrauschen (signal-to-noise-ratio; *S/N*) bestimmt. Folgende Bestimmungsgrenzen wurden ermittelt:

- Instrumentelles Detektionslimit (IDL),
- Detektionslimit der gesamten Methode (LOD)
- o Quantifizierungslimit der gesamten Methode (LOQ).

Die Festlegung der Bestimmungsgrenzen über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erfolgte aufgrund der Praktikabilität der Durchführung und weil die zu bestimmenden Proben keine einheitliche Matrix aufwiesen, sondern bezüglich der Matrix sehr variabel waren (Rohabwasser, Klarlauf, Membranpermeat, Oberflächenwasser, Straßenablauf u. a.). Darüber hinaus ist die Durchführung und die Art der Bestimmung nachvollziehbar darzustellen und gut wiederholbar. Werte aus Messungen über einen längeren Zeitraum oder später erzielte Werte können zu jeder Zeit in die Berechnungen zur Ermittlung mittlerer Detektionsgrenzen aufgenommen werden. Außerdem ist ein eventueller Trend in der Leistungsfähigkeit/Empfindlichkeit des Analysensystems sofort erkennbar. In der vorliegenden Arbeit resultiert das IDL für einen Stoff aus Wiederholungsmessungen (zwischen 18 und 30 Messungen, über mehrere Monate hinweg) und beruht daher auf einer breiten Datenbasis.

#### 5.8.2 Instrumentelles Detektionslimit (IDL)

Dem IDL entspricht die Menge Analyt, welche zur HPLC-ESI-MS/MS-Bestimmung auf die HPLC-Säule aufgegeben werden muss (on column; o.c.), um eine Signalhöhe gegenüber dem mittleren Grundrauschen von *S/N* ≥ 3 zu erreichen. Das IDL ist vom Analysensystem abhängig. Änderungen am Messgerät (Abnutzung, Schmutz, Defekte o.ä.), oder Änderungen der Messparameter sind beeinflussende Faktoren. Weiterhin ist das IDL einer gewissen Schwankung ausgesetzt, da selbst bei Optimierung der Messparameter vor jeder Messsequenz nicht immer die gleiche Empfindlichkeit erreicht werden kann (day-to-day-Variabilität des MS-Detektors). Darüber hinaus verändert sich die Empfindlichkeit des Analysensystems auch im Verlauf einer Messsequenz aufgrund von Verunreinigungen oder Ablagerungen auf der HPLC-Säule und/oder im ESI-MS-System.

Für die Bestimmung des IDL wurden Standardlösungen wie unter Kapitel 4.9 beschrieben analysiert. Die Berechnung erfolgte, indem vom *S/N*-Verhältnis bei der eingesetzten Menge Analyt auf *S/N* = 3 extrapoliert wurde. Von den so ermittelten Werten wurden über den Grubbs-Test Ausreißer festgestellt und von der weiteren Berechnung ausgeschlossen (s. Anhang Kapitel 13.5). Der Mittelwert der ausreißerbereinigten Datenreihe stellt das IDL dar. Die IDLs für sechs Benzothiazole sind in Tabelle 5-2 aufgeführt. ABT und auch MTBT können sehr empfindlich (3 pg bzw. 7 pg) detektiert werden. Das Detektionslimit der Analyte BTSA, BT und MBT liegt zwischen 25 pg und 80 pg und damit in einem für ESI-MS/MS-Detektion mittleren Bereich. Lediglich OHBT zeigt bei ESI-MS/MS-Detektion einen vergleichsweise geringen Response, was sich in einem hohen IDL von 310 pg widerspiegelt.

Tabelle 5-2 Mittlere Bestimmungsgrenzen der Analyse von Benzothiazolen mittels SPE LC-ESI-MS/MS. Instrumentelles Detektionslimit (IDL) in pg "on column" und Detektion im MRM Modus; Detektions- (LOD; S/N > 3) und Quantifizierungsgrenze (LOQ; S/N > 10) als Konzentration der Probelösung (vor SPE). Gerundete Werte; detaillierte Übersicht im Anhang: Kapitel 13.5 und 13.6.

	וחו	Abl einer Klä	lauf äranlage		Zulauf einer Kläranlage		
Substanz	[pg]	LOD [ng/L]	LOQ [ng/L]	L [n	OD g/L]	LOQ [ng/L]	
ABT	3	5	15		20	60	
BT	70	15	40		45	150	
MTBT	7	15	45	:	20	60	
BTSA	25	30	100	:	50	170	
MBT	80	10	35		45	140	
OHBT	310	40	135	2	95	980	

Von Bedeutung ist auch die Variabilität des IDL. Durch wiederholte Bestimmung des IDL kann dargestellt werden, in welchem Schwankungsbereich sich das IDL bewegt. So wird ersichtlich, welche Werte einzigartige Tageswerte darstellen und in welchem Bereich das IDL im Routinebetrieb gewöhnlich liegt. In den Box-Plot-Diagrammen in Abbildung 5-13 ist gut zu erkennen, dass lediglich bei ABT und BTSA die Variabilität des IDL klein bis mäßig ist. Bei den Stoffen MTBT, BT, MBT und OHBT ist die Variabilität des IDL hoch. Die Ursachen hierfür sind *day-to-day*-Schwankungen des gesamten Analysensystems aufgrund von veränderten Messparametern, Verunreinigung des MS-Detektors und der ESI-Quelle, Abweichungen des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes usw. Hohe *day-to-day*-Schwankungen und eine relativ geringe Robustheit werden bei ESI-MS-Analysen oft festgestellt.

Im Falle von MTBT muss zusätzlich vermerkt werden, dass der MTBT-Peak auf einer leichten Erhebung der Basislinie des Chromatogramms liegt. Dies wurde selbst bei der Analyse von Standardlösungen von MTBT beobachtet. Ursache hierfür könnte der hohe Organikanteil im Eluenten bei der Retentionszeit von MTBT sein, durch den hydrophobe organische Stoffe von der HPLC-Säule eluieren und so ein verstärktes Rauschen verursachen. Die Signalintensität dieser Erhebung ist tolerabel, jedoch verschlechtert sich dadurch die Genauigkeit der Integration des MTBT-Peaks und die Bestimmung der Signalhöhe, was zur großen Variabilität des IDL von MTBT beiträgt.



Abbildung 5-13: Box-Plot-Diagramme zur Darstellung der Variabilität des Instrumentellen Detektionslimits (IDL).

# 5.8.3 Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) der gesamten Analysenmethode

Die Bestimmungsgrenzen LOD und LOQ dienen der Beurteilung der gesamten analytischen Methode. Neben dem Analysensystem haben zusätzlich jeder Schritt der Probenvorbereitung (SPE; Einengen des Extraktes, Austausch des Lösungsmittels u. a.) und die Probenmatrix (auf Chromatographie, auf ES-Ionisierung usw.) Einfluss. LOD ist die Analyt-Konzentration in der Originalprobe, welche nach Durchführung der gesamten Analysenmethode ein Verhältnis von Analytsignal zu Grundrauschen von  $S/N \ge 3$  verursacht. Für die Quantifizierung (LOQ) gilt ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von  $S/N \ge 10$ .

Da die Matrix von Umweltproben stark variiert, müssten die methodischen Bestimmungsgrenzen streng genommen für jede Matrix individuell und in der jeweiligen Matrix ermittelt werden, was einen enormen Arbeits- und Zeitaufwand bedeutet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Bestimmungsgrenzen für sechs Benzothiazole in Proben mit sehr hoher organischer Belastung (Zulauf einer Kläranlage; DOC ca. 60 mg/L) und in Proben mit mäßiger organischer Belastung (Ablauf einer Kläranlage; DOC ca. 14 mg/L) bestimmt.

Jeweils 10 Zu- und Abläufe eines Klärwerkes wurden aufgearbeitet, analysiert und über Standard-Addition quantifiziert. Ausgehend vom *S/N*-Verhältnis des Analytpeaks wurden diejenigen Konzentrationen errechnet, aus welchen ein *S/N* = 3 bzw. *S/N* = 10 resultieren würde. Von den errechneten Konzentrationswerten für *S/N* = 3 bzw. *S/N* = 10 wurden über den Grubbs-Test Ausreißer ermittelt und aus der Datenreihe eliminiert. LOD und LOQ sind die Mittelwerte aus den ausreißerbereinigten, errechneten Konzentrationen der jeweiligen Analyte (Daten und Berechnungen sind im Anhang Kapitel 13.6 aufgeführt).

Die Variabilität von LOD und LOQ ist nicht nur abhängig von einer sorgfältigen Probenvorbereitung und von möglichen Matrixeffekten während Probenvorbereitung und LC-ESI-MS-Analyse, sondern unterliegt auch, wie das IDL, Schwankungen die auf Änderung des Messgerätes oder der Messparameter zurückzuführen sind. Werte für LOD und LOQ müssen demnach mindestens so stark schwanken wie die IDL.

LOD und LOQ von sechs Benzothiazolen sind in Tabelle 5-2 aufgelistet. Generell liegen die LOD-Werte aller sechs Benzothiazole im Bereich von 5 bis 50 ng/L in Kläranlagenablauf wie auch in -zulauf. Die LOQ-Werte von ABT, BT, MTBT, BTSA und MBT reichen von 15 ng/L (ABT in Klarlauf) bis 170 ng/L (BTSA im Rohabwasser). Lediglich OHBT zeigt sehr hohe Detektionsgrenzen in Rohabwasser (LOD = 295 ng/L; LOQ = 980 ng/L). Für die Bestimmung von Benzothiazolen in Abwasserproben sind diese Werte für LOD und LOQ hinreichend und erlauben Studien zum Auftreten und zur Eliminierbarkeit von Benzothiazolen bei der kommunalen Abwasserbehandlung und in anderen aquatischen Bereichen (s. u.).

In der Literatur werden lediglich zwei Methoden beschrieben, deren Analytik sich ebenfalls auf ein ganzes Spektrum von Benzothiazolen erstreckt. Dies ist zum einen eine Methode basierend auf Flüssig-Flüssig-Extraktion und Analyse mittels HPLC-UV, welche Quantifizierungsgrenzen von 4-13 µg/L erreicht (Fiehn et al. 1994). Eine weitere Methode, die ebenfalls auf LC-ESI-MS/MS beruht, wird beschrieben, die jedoch keine Extraktion als Probenvorbereitung vorsieht (Reemtsma 2000), wodurch der quantifizierbare Bereich um wenigstens eine Größenordnung höher liegt als in der hier vorgestellten Methode.

# 6 Metabolisierung, Abbau, Transformation

Hinsichtlich des Abbaus von Benzothiazolen ist wenig bekannt (Kapitel 3.6.2, 3.6.3, 3.6.4). Zur Klärung des Metabolisierungspfades beim mikrobiellen Abbau von Benzothiazolen wurden in Zusammenarbeit mit einer französischen Arbeitsgruppe um Anne-Marie Delort (Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, Frankreich) (Haroune et al. 2002), die auf dem Gebiet der Isolierung und Aufzucht von Reinkulturen für den Abbau organischer Verbindungen und auf dem Gebiet der Strukturaufklärung mittels verschiedener NMR-Techniken arbeitet, einige Experimente unternommen. Die Untersuchung der Metabolisierung sollte einen detaillierteren Einblick in den Abbau verschiedener Benzothiazole und die Bildung von Transformationsprodukten liefern. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Überprüfung des Auftretens weiterer Transformationsprodukte neben den bisher bekannten, die bei der Untersuchung von Umweltproben zu berücksichtigen wären. Hier sind besonders solche Transformationsprodukte von Interesse, die in hoher Konzentration gebildet werden und/oder deren weiterer Abbau nur langsam oder gar nicht stattfindet.

#### Allgemeines

Die analytische Schwierigkeit bei der Entschlüsselung des Metabolisierungspfades mikrobieller Abbauprozesse besteht in der Suche nach Stoffen, von welchen weder Struktur noch Konzentration bekannt ist, und von welchen zunächst nicht gewiss ist, ob sie überhaupt gebildet werden. Die Konzentration eines Intermediates hängt von der Geschwindigkeit der Bildung und der Geschwindigkeit des weiteren Abbaus ab. Eine hohe Metabolitkonzentration deutet auf eine Bildungsreaktion hin, die deutlich schneller abläuft, als die Weiterreaktion. Im Extremfall, wenn es sich bei dem gebildeten Metaboliten um einen *dead-end*-Metaboliten handelt, findet keine weitere Transformation statt. Verläuft die Bildung eines Intermediates jedoch nur wenig schneller oder gar langsamer als dessen weiterer Abbau, bleibt die Konzentration des Intermediates gering. Für unspezifische *screening*-Detektoren (z. B. UV-Detektor) liegt die Konzentration des unbekannten Intermediates in solch einem Fall oft unterhalb der Detektionsgrenzen und das Intermediat wird nicht registriert. Handelte es sich hingegen um ein bekanntes Intermediat, so können spezifische Detektionsmethoden, die in der Regel sehr empfindlich sind, eingesetzt werden und die (auch quantitative) Bestimmung wäre möglich.

Der Einsatz von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern bietet einige Vorteile bei der Detektion unbekannter Intermediate. Vom unspezifischen scan-Modus, der alle ionisierbaren Stoffe erfasst, bis hin zum sehr selektiven und empfindlichen MRM-Modus werden verschiedene Betriebsweisen abgedeckt. Besondere Stärken ergeben sich durch die Möglichkeit der Erstellung von Tochterionenspektren. Aus der Abspaltung charakteristischer Fragmente kann auf funktionelle Gruppen und andere Bestandteile des analysierten Stoffes geschlossen werden. Quadrupol-Massenspektrometer erreichen zwar nicht die Massengenauigkeit von TOF-Massenspektrometern (*time-of-flight*) oder FT-ICR-Massenspektrometern, sind im Gegenzug jedoch bei der Detektion von Stoffen im *single-ionmonitoring-* (SIM) oder im *multiple-reaction-monitoring*-Modus (MRM-Modus) deutlich konzentrationsempfindlicher.

### 6.1 Abbauweg von OHBT und BT

Mittels <sup>1</sup>H-NMR wurde 2,6-diOHBT (Abbildung 6-5) als ein zentraler Metabolit im Abbau von OHBT und BT identifiziert (Besse et al. 2001). Der Abbau von BT kann dabei über OHBT als Zwischenstufe verlaufen. Die Bildung von 2,6-diOHBT zeigt, dass der Abbau von BT und OHBT nicht ausschließlich über einen Angriff am heteroaromatischen Ringsystem mit sukzessiver Spaltung des Thiazol-Ringes verläuft, sondern es zu weiteren Oxidationen kommt, bevor das aromatische System des 6-Ringes oder des Thiazol-Ringes gespalten wird. Der weitere Abbau von BT und OHBT und somit auch die Frage, an welchem der beiden aromatischen Ringsysteme ein weiterer Abbau in Form einer Ringspaltung stattfindet, blieben zunächst unbeachtet. Ausgehend von OHBT wurden hierzu in Kooperation mit einer französischen Arbeitsgruppe Untersuchungen durchgeführt.

#### 6.1.1 Ein Muconsäure-Derivat als Produkt der Ringspaltung

Unser Kooperationspartner beobachtete beim Abbau von BT mit *Rhodococcus pyridinovorans PA* die Bildung von OHBT. In weiteren Versuchen, bei welchen OHBT als Substrat diente, wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR schwache Signale für einen Metaboliten detektiert, der nach einer Inkubationszeit zwischen 12 und 46,5 h auftrat und bei welchem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Folgeprodukt von 2,6-diOHBT handelte (Haroune et al. 2002). Zwar waren die Signale zu schwach, um eine genaue Aussage treffen zu können, aber Kopplungskonstante und chemische Verschiebung der Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum entsprachen einer Ethylen-Bindung, wonach das Intermediat ein Ringöffnungsprodukt sein könnte. Vom abbauenden Stamm *R. pyridinovorans PA* wurden daraufhin Mutanten gezüchtet, aus denen der Stamm *N-120-8* isoliert wurde, bei welchem die Konzentration des mutmaßlichen Ringöffnungsproduktes größer war (ca. 2,5-fache Signalintensität bei <sup>1</sup>H-NMR-Messungen) als beim Abbau mit dem originären Stamm (Haroune et al. 2002). Die höhere Konzentration des Intermediates ermöglichte weitere strukturanalytische Untersuchungen mittels MS und NMR.

Unser Kooperationspartner fand mittels in-situ-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-NMR weitere Hinweise für das Auftreten eines Transformationsproduktes von 2,6-diOHBT mit geöffnetem 6-Ring (Haroune et al. 2002): <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HSQC-Spektren (engl.: *heteronuclear single quantum coherence*) zeigten das Vorhandensein von Protonen, die an C-Atome einer Ethylengruppe gebunden sind. In weiteren Untersuchungen mittels <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMBC (engl.: *heteronuclear multiple bond correlation*) konnte die Stellung der ethylengebundenen Protonen bezogen auf benachbarte, quartäre Kohlenstoffatome bestimmt werden. Demnach befindet sich ein Proton in der Nähe einer Carboxylgruppe, während das zweite Proton zwei Bindungen von einem quartären Kohlenstoff entfernt ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die in Abbildung 6-1 dargestellte Struktur einer Dicarbonsäure postuliert (der von Haroune et al. aufgeklärte Strukturteil ist hervorgehoben). Di-Carbonsäuren sind aus dem mikrobiellen Abbau von Aromaten bekannt, wo Muconsäurederivate durch ortho-Spaltung (intradiol-Spaltung) aus Catecholen gebildet werden (Schwarzenbach et al. 1993; Van Agteren et al. 1998; Bosma et al. 2001). Eine Aussage darüber, wie der gespaltene Ring im Übrigen aussieht (Vorhandensein weiterer funktioneller Gruppen) und ob der Thiazol-Ring der postulierten Struktur noch intakt war, konnten mittels NMR nicht getroffen werden. Hierzu lieferten Untersuchungen mittels LC-MS/MS notwendige Informationen.



Abbildung 6-1: Struktur des Ringöffnungsproduktes im Abbau von OHBT. Die unterlegten Strukturteile wurden mittels NMR bestimmt, die nicht-unterlegten Strukturteile wurden mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert.

Aus Inkubationen, angesetzt von unserem Kooperationspartner, wurden fünf Proben innerhalb einer Inkubationszeit von 123-199 h entnommen. Diese enthielten den unbekannten Metaboliten und wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels HPLC-MS/MS untersucht. Da die Konzentration des gesuchten Metaboliten in der Probe nach 123 h Inkubation am höchsten war (in der Probe nach einer Inkubationszeit von 199 h lag die Konzentration bei ca. 70 % derer in der Probe nach 123 h), beziehen sich die folgenden Untersuchungen auf diese Probe.



Abbildung 6-2: Scan-Chromatorgramm einer Probe nach 123 h Inkubation aus dem Abbau von OHBT mit *N-120-8* (Ionenpaarchromatographie).

Bei der chromatographischen Trennung mit der "generell" eingesetzten RP-HPLC-Methode (RP: reversed phase) eluiert die zu untersuchende Substanz in der Totzeit (Rt = 1,46 min). Diese kurze Retentionszeit bei RP-HPLC weist auf einen sehr polaren Metaboliten hin und steht damit in Einklang mit der postulierten Struktur. Für weitere Untersuchungen wurde die chromatographische Trennung mittels Ionenpaarchromatographie (IPC) betrieben, was die Retentionszeit auf Rt = 7,12 min. erhöht (Abbildung 6-2). Das Molekülion im scan-Spektrum des Peaks bei Rt = 7,12 in Abbildung 6-2 ist m/z 214 (Abbildung 6-3). Da bereits im scan-Spektrum Fragmente des Molekülions vorhanden sind, kann auf einfache Fragmentation bzw. gute Abgangsgruppen geschlossen werden. Bei den Fragmentationen handelt es sich um die Abstraktion von zwei Neutralteilchen mit 44 Da (z. B. CO<sub>2</sub>), was das Vorhandensein von zwei Carboxyl-Gruppen im Molekülion m/z 214 sehr wahrscheinlich macht. 44 Da könnte auch von CS stammen, aber die Isotopenverhältnisse M/M+2 von m/z 214 (6,69), m/z 170 (5,38) und m/z 126 (4,26) weisen auf ein Schwefelatom im Molekül hin und die Abnahme des Verhältnisse spiegelt den Verlust von Sauerstoff durch CO<sub>2</sub>-Abspaltung wider.



Weiterhin könnte 44 Da auch N<sub>2</sub>O entsprechen, aber da das Molekül keine zwei N-Atome enthält, die zudem zusammen abgespalten werden müssten, ist diese Möglichkeit auszuschließen.

Abbildung 6-3: **Scan**-Spektrum des Peaks bei Rt = 7,12 min aus Abbildung 6-2. Fragmente im scan-Spektrum weisen auf einfache Fragmentation und gute Abgangsgruppen hin. Erkennbar sind das Molekülion mit m/z 214, sowie die Fragmente m/z 170 und m/z 126.

In Tochterionen-Spektren von m/z 214 konnten weitere diagnostisch bedeutende Fragmentationen erkannt werden. Während unter milden Bedingungen (collision energy: CE = 10 V) noch die lonen aus den CO<sub>2</sub>-Abspaltungen (m/z 170 und m/z 126) dominieren, treten bei drastischeren Bedingungen (collision energy: CE = 20 V) weitere kleinere Fragmente hervor (m/z 98 und m/z 42) (Abbildung 6-4). Die Massendifferenz von 28 Da (m/z 126 zu m/z 98) scheint die Abstraktion eines Ethen-Moleküls unter Verbleib des hydroxylierten Thiazol-Rings zu sein. Für die folgende Abspaltung von 56 Da (m/z 98 zu m/z 42; Abspaltung von 1xC und 1xS) wird die Bildung von m/z 42 (Summenformel NCO<sup>-</sup>) und die gute Ladungsstabilisierung durch das kleine Fragment als treibende Kraft angesehen. Dieses Ion wurde bereits in früheren Untersuchungen zur Fragmentation von OHBT beobachtet (Reemtsma 2000).

Insbesondere die beiden kleinen Fragmentionen (m/z 98 und m/z 42) belegen, dass das Thiazol-Ringsystem im zu identifizierenden Metaboliten noch intakt war und beim mikrobiellen Abbau nicht zerstört wurde.



Abbildung 6-4: Fragmentionen im Tochterionenspektrum von m/z 214 bei hoher Kollisionsenergie (20 V).

Die Vereinigung der Erkenntnisse aus den LC-MS/MS- und NMR-Untersuchungen bestätigen die in Abbildung 6-1 postulierte Struktur. Das Vorhandensein von zwei Carboxylgruppen und des intakten Thiazol-Ringes, sowie eines Ethylenprotons nahe einer Carboxylgruppe und eines weiteren Ethylenprotons zwei Bindungen von einem quartären Kohlenstoff entfernt, lässt keine andere Struktur zu, die aus dem Abbau des zunächst an Position 6 hydroxylierten Benzolringes hervorgeht. Die Vorstufe des Muconats im Aromatenabbau ist das entsprechende Catechol. In unserem Fall handelt es sich demnach um 2,6,7-tri-OHBT. Abbildung 6-5 zeigt den Abbauweg von BT und OHBT mit *Rhodococcus pyridinovorans PA*, wie er sich aus den geschilderten Untersuchungen ergibt.



Abbildung 6-5: Intermediate in der Metabolisierung von BT und OHBT mit Rhodococcus pyridinovorans PA.

Das Catecholderivat 2,6,7-tri-OHBT konnte in den Inkubationsproben nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine schnelle Weiterreaktion gegenüber einer langsamen Bildungsreaktion zurückzuführen ist.

Die hier postulierte ortho-Spaltung von 2,6,7-tri-OHBT steht im Widerspruch zu Beobachtungen von Gaja & Knapp (Gaja & Knapp 1997). In ihren Untersuchungen mit *R. pyridinovorans PA* hatten sie die Aktivität von C23D (Catechol-2,3-dioxygenase) festgestellt, das die meta-Spaltung des Catechols katalysiert, woraus im Abbau von BT und OHBT keine Dicarbonsäure, sondern das 2-Hydroxy-muconsäure-semialdehyd-Derivat gebildet würde. Zur Beurteilung, welche Enzyme in der von uns

untersuchten Abbaustudie aktiviert waren, wurde von unserem Kooperationspartner zusätzlich der Abbau von BT mittels *R. pyridinovorans PA* nach Zugabe von 3-Fluorcatechol (3FC) zum Inkubationsansatz untersucht. 3FC ist ein für das Enzym C12D (Catechol-1,2-dioxygenase) spezifischer Inhibitor. In Anwesenheit von 3FC wurde ein deutlich langsamerer Abbau von BT beobachtet als in dessen Abwesenheit. Dies wurde auf die Inhibierung von vorhandenem C12D durch 3FC zurückgeführt. Nicht auszuschließen war allerdings die gleichzeitige Aktivität von C23D neben C12D beim Abbau von BT mit *R. pyridinovorans PA*. Die gleichzeitige Aktivität beider Enzyme erscheint als wahrscheinlich und wurde für Rhodococcus-Arten bereits gezeigt (Zitate 11, 33, 34, 35 in (Haroune et al. 2002))

### 6.1.2 Weitere Beobachtungen aus HPLC-MS/MS-Untersuchungen

Abgesehen von dem ausgeprägten Peak bei Rt = 7,12 min. in der Inkubation nach 123 h (Abbildung 6-2) wurden zwei weitere signifikante Peaks detektiert (Rt = 6,11 min; Rt = 8,68 min Abbildung 6-2). Untersuchungen mittels NMR wurden nicht durchgeführt. Die per LC-MS/MS ermittelten Daten sollen hier dennoch besprochen werden, da sie einige Aspekte liefern, die darauf hindeuten, dass es sich bei den Substanzen unter diesen zusätzlichen Peaks möglicherweise um weitere BT- bzw. OHBT-Abbauintermediate handelt.



Abbildung 6-6: Spektren der Peaks bei Rt = 6,11 min (links) und Rt = 8,68 min (rechts) aus dem scan-MS-Chromatogramm der Inkubationsprobe 123 h (Abbildung 6-2).

Das MS-scan-Spektrum des Peaks bei Rt = 6,11 min. (Abbildung 6-6, links) stammt von einem Analyt, der ebenfalls bereits in der Quelle fragmentiert, wie die di-Carbonsäure aus Abbildung 6-3. Abspaltung von 44 Da vom vermeintlichen Molekülion m/z 188, unter Bildung von m/z 144, zeigt, dass m/z 188 eine Carbonsäuregruppe enthält. Ob es davor bereits zur Abspaltung von 44 Da kam (zweite Carbonsäure), kann nicht geprüft werden, da der scan-Bereich bei m/z 300 endet. Die M+2 Ionen (6,75 % bei m/z 188; 4,67 % bei m/z 144) deuten auf das Vorhandensein von einem Schwefelatom (und möglicherweise mehrerer Sauerstoffatome, aber nicht zwei Schwefeln!) hin. Die Konzentration dieses Metaboliten ist in der Probe nach 199 h Inkubation (ohne Abbildung) nahezu gleich groß wie in der Probe nach 123 h, was belegt, dass es sich um einen relativ stabilen Metaboliten handelt. Obwohl

es einige Strukturmerkmale gibt, ist die Darstellung einer möglichen Struktur zu hypothetisch, weshalb hier auf die Abbildung von Strukturvorschlägen verzichtet wurde.

Das MS-scan-Spektrum des Peaks bei Rt = 8,68 (Abbildung 6-6, rechts) zeigt m/z 170 als vermeintliches Molekülion. Auch hier ist das M+2-Satellitenion (5,99 %) sehr ausgeprägt (ein Schwefelatom und mehrere Sauerstoffatome). Das Spektrum enthält ferner m/z 126, ein Fragment, das auch im Spektrum der Dicarbonsäure aus Abbildung 6-3 erscheint. Zwar ist die Aussagekraft von M+2-Satellitenionen bei geringer werdender Signalintensität geschmälert, aber auch bei m/z 126 ist M+2 recht hoch (7,81 %; ein Schwefelatom). Auch bei m/z 170 handelt es sich um eine Carbonsäure (Abgang von 44 Da). Trotz der Parallelen dieses Spektrums zur di-Carbonsäure aus Abbildung 6-3 erschent.

Insgesamt sind die Hinweise zu vage, um zweifelsfrei auf Benzothiazolmetabolite zu schließen. Es erscheint jedoch sinnvoll, bei weiteren Abbauversuchen die MS-Daten nach diesen Verbindungen bzw. nach Spektren ähnlicher Charakteristik zu durchleuchten.

### 6.2 Abbauweg von MBT

Nachdem unser französischer Kooperationspartner (s. Kapitel 1) eine Möglichkeit fand, MBT mittels der von De Wever et al. (De Wever et al. 1997) isolierten Spezies *Rhodococcus rhodochrous OBT18* zu metabolisieren, wurde auch dieser Abbauweg näher untersucht. NMR-Untersuchung einiger Inkubationsproben, angefertigt und durchgeführt von unserem Kooperationspartner, lieferten Hinweise auf die Metabolite M1<sub>MBT</sub>, M2<sub>MBT</sub>, M3<sub>MBT</sub> und M5<sub>MBT</sub> (Tabelle 6-1)(Haroune et al. 2004). In LC-ESI-MS/MS-Messungen waren die Metabolite M1<sub>MBT</sub>, M2<sub>MBT</sub>, M2<sub>MBT</sub>, M4<sub>MBT</sub>, M4<sub>MBT</sub> und M5<sub>MBT</sub> signifikant zu detektieren (Tabelle 6-1). Während die Struktur einiger Metabolite sehr gut ermittelt werden konnte, wurden auch Intermediate detektiert, für die es starke Hinweise auf das Abstammen von MBT gibt, deren genaue Identifizierung jedoch nicht gelang. Aus den Ergebnissen der Kooperation resultiert der in Abbildung 6-7 dargestellte Metabolisierungspfad. Die Identifizierung der einzelnen Metabolite wird im Folgenden beschrieben.

	Substanz	Rt [Min]	RP/IP*	(M-H)⁻ <i>m/z</i>	Probe mit max. Konz.
M0 <sub>MBT</sub>	MBT	8,18	RP	166	30 Min
$M1_{\text{MBT}}$	MBT-6,7-dihydrodiol	1,99	RP	200	3,5 h
M2 <sub>MBT</sub>	6-Hydroxy-MBT	6,01	RP	182	5,5 h
M3 <sub>MBT</sub> **	MBT-6,7-dicarbonsäure			230	
$M4_{MBT}$	ungeklärt	2,16	RP	280	6,5 h
$M5_{\text{MBT}}$	ungeklärt	13,26***	IP	250	n.b.

Tabelle 6-1: Metabolite im Abbau von MBT.

n.b. : nicht bestimmt

\* : Art der angewandten Chromatographie: RP: reversed phase-Chromatographie; IP: Ionenpaarchromatographie.

\*\* : Identifizierung durch Kooperationspartner; M3<sub>MBT</sub> konnte in den uns zur Verfügung gestellten Inkubationsproben nicht detektiert werden.

\*\*\*: Doppelpeak mit zweitem Maximum bei 13,45 Min.

#### 6.2.1 Metabolite im Abbau von MBT

 $MO_{MBT}$  (Tabelle 6-1; Abbildung 6-7) eluiert bei Rt = 8,18 min (Abbildung 6-8). Im scan-Spektrum dieses Peaks (Anhang: Abbildung 13-2) lässt sich *m/z* 166 als Molekülion identifizieren. Tochterionen-spektren von *m/z* 166 (Abbildung 6-9) zeigen die Fragmente *m/z* 134 und *m/z* 58. Retentionszeit, Molekülion und die Fragmente lassen eindeutig auf das Substrat MBT schließen. Die MS-Signale für diesen Stoff sind in der ersten Inkubationsprobe am größten und nehmen mit zunehmender Inkubationsdauer entsprechend eines Verlaufes erster Ordnung ab (Abbildung 6-10).



Abbildung 6-7: Metabolisierungspfad des Abbaus von MBT durch Rhodococcus rhodochrous OBT18.





**M1**<sub>MBT</sub> (Tabelle 6-1; Abbildung 6-7) hat eine Retentionszeit von 1,99 min (Abbildung 6-8). Das Molekülion im scan-Spektrum diese Peaks (Anhang: Abbildung 13-2) ist *m/z* 200 und korrespondiert mit dem Molekülgewicht des Dihydrodiol-Metaboliten von MBT. Die Intensität des M+2-Ions erreicht

8,2 % des Molekülions und deutet auf das Vorhandensein von zwei Schwefelatomen im Molekül hin. Die Abspaltung von 18 Da (ein Molekül Wasser) ist bereits im scan-Spektrum erkennbar (Anhang: Abbildung 13-2). H<sub>2</sub>O als gute Abgangsgruppe und die Rearomatisierung des verbleibenden Moleküls zum hydroxylierten MBT (*m/z* 182) begünstigen diese leichte Fragmentation in der ESI-Quelle.

Im Tochterionenspektrum von m/z 200 (Abbildung 6-9) ist das Molekülion aufgrund der leichten Fragmentation nicht mehr zu detektieren. Zu erkennen sind jedoch weiterhin m/z 118 und m/z 150. Diese Fragmente sind um 16 Da schwerer (ein Sauerstoff mehr im Molekül als Fragmente von MBT) als die entsprechenden Fragmente im Tochterionenspektrum von MBT (M0<sub>MBT</sub> in Abbildung 6-9).

Die Position der Hydroxy-Gruppe kann per LC-MS/MS nicht bestimmt werden. In Untersuchungen unseres Kooperationspartners mit <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR (Haroune et al. 2004) zeigten sich charakteristische Signale für eine Substitution an den Kohlenstoffatomen Nr. 6 und Nr. 7 dieses MBT-Metaboliten.

Die Konzentration von  $M1_{MBT}$  erreicht ein Maximum bei einer Inkubationszeit von 3,5 h. Zusammen mit dem sehr steilen Konzentrationsanstieg zu Beginn der Inkubation lässt dies vermuten, dass  $M1_{MBT}$  der erste gebildete Metabolit ist (Abbildung 6-10).

Dihydrodiole sind als Intermediate im Abbau von Aromaten bekannt (Schwarzenbach et al. 1993). Dioxygenasen katalysieren deren Bildung.



Abbildung 6-9: Tochterionenspektren der mittels ESI-MS bestimmten Metabolite von MBT beim Abbau mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18*.

 $M2_{MBT}$  (Tabelle 6-1; Abbildung 6-7) hat eine Retentionszeit von Rt = 6,01 min (Abbildung 6-8). Die Polarität dieses Stoffes scheint zwischen der des weniger polaren Substrats MBT (Rt = 8,18 Min) und

der des polareren Metaboliten  $M1_{MBT}$  (Rt = 1,99 Min) zu liegen. Mit *m/z* 182 korrespondiert das Molekülion im scan-Spektrum dieses Peaks (Anhang: Abbildung 13-2) mit der Molekülmasse von hydroxyliertem MBT (OH-MBT). Wiederum ist die Intensität des M+2-Ions sehr ausgeprägt und erreicht 9,4 % des Molekülions, was auf das Vorhandensein von zwei Atomen Schwefel im Molekül hindeutet.

Die Fragmente m/z 150 und m/z 118 im Tochterionenspektrum (Abbildung 6-9) korrespondieren, durch das zusätzliche Sauerstoffatom im Molekül, mit den um 16 Da leichteren Fragmenten aus dem Tochterionenspektrum von MBT. Übereinstimmend mit dem Fragmentationsmuster für Benzothiazole ist auch das Auftreten von m/z 58.

Abermals kann mittels LC-MS/MS keine Aussage über die Position der Hydroxy-Gruppe am Benzothiazolgerüst getroffen werden. NMR-Untersuchungen unseres Kooperationspartners mittels <sup>15</sup>N-NMR (Haroune et al. 2004) bestätigen die Substitution am Benzolring (und nicht am Thiazol-Ring). Weitere NMR-Daten (<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren) weisen auf Substitution an Position 5 oder 6 hin. Diese Signale zeigen Übereinstimmung mit früheren Resultaten unseres Kooperationspartners aus Untersuchungen von ABT und BT (Besse et al. 2001; Haroune et al. 2001) und ließen so auf die Substitution in Position 6 schließen. Dem Verlauf der Peakfläche von M2<sub>MBT</sub> über die Inkubationszeit mit einem Maximum bei ca. 5 h nach zu urteilen ist M2<sub>MBT</sub> ein späterer Metabolit als M1<sub>MBT</sub> (Abbildung 6-10). Ob es sich dabei um einen Folgemetaboliten, der durch Wasserabspaltung und Rearomatisierung aus M1<sub>MBT</sub> entsteht, handelt, kann nicht beurteilt werden. Vielmehr besteht die Möglichkeit eines durch Monooxygenasen katalysierten Metabolisierungspfades (Schwarzenbach et al. 1993), der parallel zu dem Pfad läuft, aus welchem M1<sub>MBT</sub> hervorgeht.



Abbildung 6-10: Verlauf der Konzentrationen von MBT, sowie zwei identifizierten und einem nicht identifizierten Intermediat bei der Inkubation von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18*.

Ein weiterer Metabolit (**M3**<sub>MBT</sub>, Abbildung 6-7) wurde von unserem Kooperationspartner detektiert. Signale aus <sup>1</sup>H-NMR Untersuchungen entsprechen denen der Dicarbonsäure aus dem Abbau von BT und OHBT (Haroune et al. 2002). In eigenen Fließinjektion-ESI-MS-Untersuchungen erkannte unser Kooperationspartner weiterhin das Auftreten von *m/z* 230 (*m/z* der MBT-Dicarbonsäure), wonach eine Muconatstruktur sehr wahrscheinlich ist. Aufgrund der geringen Stabilität von M3<sub>MBT</sub> gelang keine umfassende NMR-Analyse. Bei MS-Untersuchungen unseres Kooperationspartners waren nur Fließinjektionsversuche erfolgreich. In den uns zugesandten Inkubationsproben konnte das Muconat (vermutlich aufgrund der geringen Stabilität und dadurch Transformation während des Transports) nicht nachgewiesen werden.

Diese identifizierten Metabolite im Abbau von MBT lassen den in Abbildung 6-7 dargestellten und publizierten (Haroune et al. 2004) Metabolisierungspfad erkennen. Wie schon bei den Untersuchungen zum Abbau von BT und OHBT (s. o.) gelang die Detektion des Catechols nicht. Die Bildung einer Dicarbonsäure setzt jedoch die zwischenzeitliche Bildung des Catechols und die Aktivität von Catechol-1,2-Dioxygenasen (C12D) voraus.

### 6.2.2 Nicht identifizierte Metabolite im Abbau von MBT

 $M4_{MBT}$  (*m/z* 280) (Tabelle 6-1): Unter den noch unbekannten Metaboliten ist besonders  $M4_{MBT}$ interessant. Mit einer Retentionszeit von 2,16 Min. (Abbildung 6-11) handelt es sich offensichtlich um einen sehr polaren Stoff. Das intensive Signal in der UV-Spur lässt auf eine hohe Konzentration dieses Stoffes schließen. Im TIC (total ion chromatogram) des MS-scans ist kein signifikanter Peak zu erkennen, jedoch zeigt sich ein markanter Peak im EIC (extracted ion chromatogram) des Molekülions *m/z* 280. Als Pimärfragmente entstehen durch Quellenfragmentation *m/z* 200 und *m/z* 182 (Abbildung 6-12). Die Abstraktion von 80 Da wird häufig bei aromatischen Sulfonaten aufgrund der Abstraktion eines SO<sub>3</sub>-Moleküls beobachtet (Stueber 2005). Das Tochterionenspektrum (Abbildung 6-12) zeigt ebenfalls *m/z* 200 und *m/z* 182 und darüber hinaus das für Benzothiazole sehr charakteristische Fragment *m/z* 58 und, wenn auch mit schwacher Intensität, *m/z* 150, das schon bei der Fragmentation von M1<sub>MBT</sub> und M2<sub>MBT</sub> detektiert wurde. Eine Abstammung des Metaboliten M4<sub>MBT</sub> von MBT wird angenommen.

Das *m*/z-Verhältnis des Molekülions und die Polarität dieses Stoffes (sehr kurze Retentionszeit) legen die Vermutung nahe, dass es sich bei M4<sub>MBT</sub> um einen sulfonierten Dihydrodiol-Metaboliten handeln könnte. Neben einer Sulfonierung am 6-Ring oder des exozyklischen Schwefels ist auch denkbar, dass sich während der Inkubation MBTS aus MBT gebildet hat. Nach mikrobieller Oxidation der Disulfidbindung könnte die vormalige C-S-S-C-Bindung asymmetrisch gespalten worden sein, woraus ein Molekül BT und ein Molekül mit zwei teilweise oxidierten, exozyklischen Schwefelatomen entstanden wäre.

 $M4_{MBT}$  erreicht bei ca. 6,5 h ein Konzentrationsmaximum und konnte selbst in den späten Inkubationsproben 20 bzw. 28,5 h noch detektiert werden (Abbildung 6-10).  $M4_{MBT}$  ist demnach schlechter transformierbar als die frühen Metabolite  $M1_{MBT}$  und  $M2_{MBT}$ .

Für M4<sub>MBT</sub> wurden keine NMR-Daten generiert. Eine nähere Charakterisierung gelang daher nicht.





Oben: DAD Chromatogramm; unten: MS-Ionenspur von m/z 280; der Zeitversatz zwischen DAD- und MS-Retentionszeit resultiert aus der Fließzeit, die der Eluent nach der DAD-Detektion bis zur ESI-Quelle benötigt.



Abbildung 6-12: Tochterionenspektrum von  $M4_{MBT}$  (*m*/z 280) aus dem Abbau von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18*.

 $M5_{MBT}$  (*m*/*z* 250) (Tabelle 6-1): Aus weiteren Inkubationsansätzen war mittels Ionenpaarchromatographie ein weiterer signifikanter Peak in Proben nach einer Inkubationszeit von 21 h erkennbar. Dieser zeigt sich in Form eines Doppelpeaks bei Rt = 13,26/13,54 Min (Abbildung 6-13). Die Spektren unter dem linken und rechten Peakteil weisen zahlreiche identische Fragmente auf. Diese Fragmente finden sich in den Tochterionen-Spektren wieder (Abbildung 6-14), ergänzt mit zusätzlichen Fragmenten im niedrigen *m*/*z*-Bereich. Die genaue Struktur von M5<sub>MBT</sub> konnte nicht ermittelt werden, jedoch ist im Tochterionen-Spektrum *m*/*z* 58 zu erkennen, was in bisherigen Versuchen mit negativer ESI-Ionisierung ein starkes Indiz für Benzothiazolderivate bzw. einen intakten Thiazol-Ring war. In den zahlreichen Fragmenten lassen sich auch Abspaltungen von 44 Da erkennen, was vermutlich die Abstraktion von CO<sub>2</sub> darstellt. Da diese Abspaltung aber nicht vom Molekülion, wie sonst üblich bei Carbonsäuren, sondern von einem Fragment stattfindet, bleibt ungewiss, ob es sich tatsächlich um den Verlust von CO<sub>2</sub> handelt.



Abbildung 6-13: Scan-TIC-Chromatogramm nach Ionenpaar-Chromatographie (IP) einer Probe ("24 h") aus dem Abbau von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18*. Fettgedruckt ist der Doppelpeak von  $M5_{MBT}$  (*m/z* 250) zu erkennen. Die weiteren Beschriftungen geben die Retentionszeiten von identifizierten Metaboliten bei IP-Trennung wieder.



Abbildung 6-14: Tochterionenspektrum von M5<sub>MBT</sub> aus dem Abbau von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous* OBT18.

# 6.3 Schlussfolgerungen aus den Abbauversuchen

Die Resultate der durchgeführten Versuche zeigen für BT/OHBT und MBT, dass deren Abbau mit den verwendeten Mikroorganismen über ortho-Spaltung des aromatischen 6-Ringes verläuft, während der Thiazolring zunächst intakt bleibt.

Bisher war bekannt, dass BT und OHBT, BT häufig über OHBT als Intermediat, zu 2,6-di-OHBT metabolisiert werden (De Wever et al. 1997; De Wever et al. 1998; Besse et al. 2001). Des Weiteren wurde bislang lediglich die Aktivität des die meta-Spaltung katalysierenden Enzyms C23D beobachtet (Gaja & Knapp 1997). Die hier durchgeführten Ergebnisse geben ein genaueres Bild des weiteren Abbaus. Demnach erfolgt der Abbau von BT und OHBT mittels *Rhodococcus pyridinovorans PA N-120-8* über die Bildung von 6,7-di-OHBT und des Catechols 2,6,7-tri-OHBT, welches selbst nicht detektiert wurde. Durch ortho-Spaltung des Catechols entsteht schließlich eine Dicarbonsäure.

Für MBT liegen aus der Literatur keine Resultate zum Metabolisierungspfad mit Reinkulturen vor. Beobachtungen in Umweltproben und mit Mischkulturen zeigten jedoch, dass MBT zu den schlecht abbaubaren Stoffen BTSA (De Vos, De Wever & Verachtert 1993; Reemtsma et al. 1995; De Wever et al. 2001), MBTS (De Wever et al. 2001) und MTBT (Brownlee et al. 1992; Reemtsma et al. 1995) transformiert werden kann. Die hier beschriebenen Resultate aus der Inkubation von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18* beschreiben hingegen einen dem Abbau von OHBT und BT ähnlichen Verlauf. Neben 6-Hydroxy-2-MBT wurde 6,7-di-Hydroxy-di-hydro-2-MBT detektiert. Unser Kooperationspartner detektierte darüber hinaus die Dicarbonsäure als Ringöffnungsprodukt. Das Catechol 6,7-di-Hydroxy-2-MBT, welches die Verbindung der ersten beiden Metabolite mit der Carbonsäure darstellt, konnte hingegen, wie schon im Abbau von BT/OHBT, nicht detektiert werden.

Bei M4<sub>MBT</sub>, dem nicht identifizierten Metaboliten im Abbau von MBT, könnte es sich um ein mögliches MBT-Transformationsprodukt handeln. Aufgrund seiner zwischenzeitlich signifikanten Konzentration während der Inkubation und da dieser Stoff noch nach einer Inkubationszeit von 28,5 h detektiert wurde, bestand für M4<sub>MBT</sub> eine gewisse Relevanz, zukünftige Proben hinsichtlich dieses Stoffes zu untersuchen. Eine Quantifizierung wäre bei einem möglichen positiven Befund nicht möglich, da M4<sub>MBT</sub> nicht identifiziert werden konnte und folglich keine Referenzsubstanz vorliegt. Einige Klärwerksproben (Zu- und Ablauf) und Oberflächenwässer wurden auf M4<sub>MBT</sub> untersucht, aber im Gegensatz zu positiven Befunden anderer Benzothiazolmetabolite, konnte M4<sub>MBT</sub> nicht detektiert werden.

Dies ist nicht erstaunlich, da die oben beschriebenen Inkubationsversuche mit Reinkulturen durchgeführt wurden, die die Vorgänge während der Abwasserbehandlung in einer großtechnischen Anlage nicht notwendigerweise widerspiegeln müssen. Im Falle der Inkubationsversuche von MBT wurde der eingesetzte Stamm erst nach einigen Züchtungsversuchen isoliert. Es handelt sich hier offensichtlich nicht um einen Mikroorganismus, der in hoher Konzentration in der Biozönose einer biologischen Abwasserbehandlung zu erwarten ist.

Metabolite, die bei der Untersuchung zukünftiger Umweltproben zu berücksichtigen wären, wurden in der Untersuchung des Abbaus von BT/OHBT mit *Rhodococcus pyridinovorans PA N-120-8* und von MBT mit *Rhodococcus rhodochrous OBT18* demnach nicht erkannt.

Zwar wurden Benzothiazole in der Vergangenheit bereits mehrfach in Abläufen von Kläranlagen detektiert, doch geschah dies in der Regel beiläufig im Rahmen von *screening*-Untersuchungen und die Ergebnisse hinsichtlich Benzothiazole waren zumeist nur semiquantitativ. Diese *screening*-Analysen basierten auf GC-Techniken, wodurch lediglich die GC-gängigen Benzothiazole BT und MTBT erfasst werden konnten (s. Kapitel 3.5). Trotz einiger Hinweise auf ein weit verbreitetes Vor-kommen von Benzothiazolen war es vermutlich das Fehlen einer geeigneten Analysenmethode, das umfassende Studien zum Auftreten von Benzothiazolen in Umweltproben verhinderte (s. Kapitel 3.4).

Mit dem Ziel der Durchführung der ersten umfassenden Studie zum Auftreten und Verhalten von Benzothiazolen in Zu- und Ablauf von Kommunalen Kläranlagen, wurde eine Methode basierend auf SPE LC-ESI-MS/MS entwickelt, die nicht nur quantitative Bestimmungen von Benzothiazolen im subµg/L-Bereich ermöglichte, sondern neben den häufig detektierten Benzothiazolen BT und MTBT vier weitere, polarere Metabolite, BTSA, MBT, ABT, OHBT erfasste.

Mit der entwickelten Methode (Kloepfer, Jekel et al. 2004; Kloepfer, Quintana et al. 2005) wurden kommunale Kläranlagen beprobt und untersucht. Darüber hinaus wurde auch der Frage nach den Quellen und dem Verbleib von Benzothiazolen nach deren Emission in Vorfluter nachgegangen (Kloepfer, Gnirss et al. 2004; Kloepfer, Jekel et al. 2005).

Die folgenden Kapitel beschreiben zunächst das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser und gehen auf deren Elimination während der Abwasserbehandlung ein.

### 7.1 Gehalte in kommunalem Abwasser

Kommunales Abwasser (Rohabwasser: *raw*) wurde an zwei Standorten (Berlin und Beijing) untersucht. Eine umfangreiche Untersuchung zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser wurde durchgeführt in Kooperation mit den Berliner Wasserbetrieben an der Kläranlage Ruhleben (Berlin). Hier wurden zwei Beprobungsserien (*Ruhl1* und *Ruhl2*) mit insgesamt 30 Proben angelegt. In geringerem Umfang erfolgte die Beprobung der Kläranlage GaoBeiDian in Beijing (*Beij*; drei Proben). Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Tsinghua Universität Beijing und der Beijing Drainage Group (Betreiber der Kläranlage).

### 7.1.1 Zulauf in Ruhleben (Ruhl1 und Ruhl2)

Die beiden Beprobungsserien auf der Kläranlage Ruhleben wurden durchgeführt von März bis Juni 2002 (*Ruhl1*) und im Oktober/November 2003 (*Ruhl2*). Der zeitliche Gang der Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen (BTSA, MBT, OHBT, ABT, BT, MTBT) im Zulauf zum Klärwerk Ruhleben ist in (Abbildung 7-1) dargestellt. Benzothiazole wurden regelmäßig und in allen Proben detektiert. Die Gesamtkonzentration der sechs Benzothiazole lag dabei zwischen 2 und 5,5 µg/L. Während der Beprobungsphase *Ruhl1* betrug die mittlere Konzentration 3,4 µg/L, während *Ruhl2* lag diese mit 3,0 µg/L etwas tiefer.



Abbildung 7-1: Gesamtkonzentration der sechs Benzothiazole BTSA, MBT, OHBT, ABT, BT und MTBT in Zulauf der Kläranlage Ruhleben.

**BTSA** dominierte in beiden Beprobungsserien die Zusammensetzung (Abbildung 7-2 und Tabelle 7-1). Die mittleren Konzentrationen betrugen 1,7 μg/L und 1,2 μg/L (*Ruhl1*; *Ruhl2*), was in beiden Fällen ca. 50 % der Gesamtkonzentration entspricht. Konzentrationsschwankungen von BTSA sind ausgeprägter in der ersten der beiden Probenserien (Abbildung 7-2).



Abbildung 7-2: Box-Plot-Diagramme der Konzentration von 6 Benzothiazolen im Zulauf der Kläranlage Ruhleben. a) 4 positive Befunde; b) 3 positive Befunde. Legende zur Box-Plot-Darstellung s. Abbildung 5-13 auf S. 63

Legende zur Box-Piol-Darstending S. Abbildung 5-15 auf S. 05

In der Reihenfolge der höchsten mittleren Konzentration folgen die Stoffe **BT** (0,9  $\mu$ g/L) und **OHBT** (ca. 0,5  $\mu$ g/L). Auch für BT ist der Anteil an der Gesamtkonzentration in beiden Probenserien gleich groß (*Ruhl1*: 29 %; *Ruhl2*: 27 %). BT wurde in jeder Probe oberhalb des Quantifizierungslimits nachgewiesen. In den Proben aus *Ruhl2* wurde auch OHBT in jeder Probe detektiert, allerdings stets unterhalb LOQ (980 ng/L, Tabelle 5-2). Die Gehaltsangaben für OHBT sind daher nur semiquantitativ und variierten zwischen 0,3 und 0,8  $\mu$ g/L (10-20 % der Gesamtkonzentration). Bei der Probenserie *Ruhl2* wiesen lediglich drei von 9 Proben Konzentrationen oberhalb LOD auf (detailliertere Angaben im Anhang Kapitel 13.8).

**MTBT** wurde ebenfalls mit signifikanter Konzentration detektiert und war, wie im Falle von BTSA und BT, in jeder Probe enthalten. Mittlere Konzentrationen betrugen 0,2 μg/L (*Ruhl1*) bzw. 0,4 μg/L

(*Ruhl2*). Anders als bei BTSA, OHBT, BT und MBT, die in *Ruhl2* geringere mittlere Konzentrationen zeigten als in *Ruhl1*, war die mittlere Konzentration von MTBT in *Ruhl2* höher als in *Ruhl1* (Tabelle 7-1). Dies ist damit zu erklären, dass das Transformationsprodukte MTBT bereits in der Kanalisation gebildet wird. Auf diesen Punkt wird in Kapitel 7.3 näher eingegangen.

Die mittlere Konzentration von **MBT** lag in den Proben aus *Ruhl1* bei 0,2 µg/L, wobei nur 3/4 aller Proben Konzentrationen oberhalb LOQ aufwiesen. In der zweiten Probenserie konnte MBT nur in 2 von 9 Fällen (> LOD) detektiert werden.

Konzentrationen von **ABT** in kommunalem Abwasser sind nicht signifikant. Die ermittelten Gehalte waren durchweg kleiner als 0,1  $\mu$ g/L und bewegten sich generell nahe des Detektionslimits (LOD = 20 ng/L). Lediglich in zwei Fällen konnten Konzentrationen von 0,07  $\mu$ g/L detektiert werden.

Υ.	, , , ,							
	<i>Ruhl1</i> (n <sub>ges</sub> = 20)		<i>Ruhl2</i> (n <sub>ges</sub> = 9)			Beij (n <sub>ges</sub> = 3)		
	av	sd		av	sd		av	sd
BTSA	1,70	0,75		1,21	0,20		4,75	2,69
BT	0,85	0,20		0,74	0,24		22,87	2,43
OHBT	0,50	0,16		0,16			2,29	1,64
MTBT	0,17	0,06		0,44	0,39		0,53	0,15
MBT	0,19	0,07		0,02			1,12	1,26
ABT	0,03	0,02		0,03	0,02		0,04	< 0,01
total	3,44	0,92		2,60	0,46		31,6	0,45
DOC [mg/L]	58,1	12,7		n.b.	n.b.		51,4	2,8

Tabelle 7-1: Mittlere Konzentrationen von Benzothiazolen und mittlerer DOC-Gehalt im Zulauf (*raw*) von kommunalen Kläranlagen in Berlin Ruhleben (*Ruhl1* und *Ruhl2*) und in GaoBeiDian (*Beij*) in Beijing/China.

Physikalische Einheiten generell in µg/L; außer DOC: mg/L

av : Mittelwert (average)

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

n.b. : nicht bestimmt

### 7.1.2 Zulauf in GaoBeiDian (Beij)

Die Benzothiazolkonzentrationen in Zulaufproben von GaoBeiDian unterschieden sich teilweise deutlich von den Konzentrationen in den Zulaufproben der Kläranlage Ruhleben. Während die Benzothiazolzusammensetzung des Zulaufes in Ruhleben von BTSA dominiert wurde, enthielt der Zulauf von GaoBeiDian hohe Konzentrationen an BT (23 µg/L !). Bis auf ABT, welches auch hier nicht in nennenswerten Mengen enthalten war, waren auch die Konzentrationen der anderen untersuchten Benzothiazole erhöht (Tabelle 7-1). Abgesehen von BT (Erhöhung auf das 27-fache) liegen die Konzentrationen von BTSA, MBT, MTBT und OHBT um das 3- bis 6-fache höher als in den Zuläufen in Ruhleben. Die Verhältnisse untereinander sind (abgesehen von BT) ähnlich. Da nur drei Proben des Zulaufes gezogen werden konnten, ist die Aussagekraft dieser Daten geringer als die der Zuläufe zum Klärwerk Ruhleben.

#### 7.1.3 Benzothiazolquellen

Die Konzentrationen der einzelnen Benzothiazole während der Beprobungsserie *Ruhl1* variieren in gleicher Größenordnung (rsd 2-40 %) wie der DOC-Gehalt (rsd 20 %) (Tabelle 7-1). Dies deutet auf

eine gleichmäßige Belastung des Abwassers mit Benzothiazolen, bzw. auf einen gleichmäßigen Eintrag von Benzothiazolen ins Abwasser hin. Es ist bekannt, dass Benzothiazole in Abwasser der Gummi-, Leder-, Papierindustrie und anderen industriellen Zweigen enthalten sind (s. Kapitel 3.1). Da der Zulauf zum Klärwerk Ruhleben jedoch vorwiegend häusliches Abwasser enthält (bis zu 30 % industrielles Abwasser), muss davon ausgegangen werden, dass auch Privathaushalte eine Quelle für den Eintrag von Benzothiazolen ins Abwasser darstellen. Häusliche Quellen konnten bisher noch nicht identifiziert werden (s. Kapitel 8.3).

Bei Mischkanalisation ist Straßenablauf als Benzothiazolquelle in Betracht zu ziehen. Straßenablauf kann Benzothiazole in signifikanter Konzentration enthalten, da Benzothiazole bei Regenereignissen aus Reifenabrieb ausgewaschen werden. (s. Kapitel 3.5.3 und 8.2). Während der Beprobungsserie *Beij* waren keine Niederschläge zu verzeichnen, womit Straßenablauf als Quelle in der Studie in Beijing ausgeschlossen werden kann. Demgegenüber gab es während der langen Beprobungsserien in Ruhleben (Mischkanalisation) einige Regenereignisse unterschiedlicher Intensität. Eine signifikante Änderung der Gesamtkonzentration der Benzothiazole infolge der Niederschläge wurde jedoch nicht beobachtet (Abbildung 8-3).

Über den Grund für die hohe Konzentration an BT in den Zuläufen von *Beij* kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Durch den beträchtlichen Anteil industriellen Abwassers von 50 % wären Belastungen aus industrieller Einleitung nicht überraschend. Zur Klärung dieser Frage müssten jedoch weitere, umfangreichere Studien in GaoBeiDian durchgeführt werden.

### 7.2 Benzothiazole in Kläranlagenablauf

Im Zuge der Beprobungsserien *Ruhl1*, *Ruhl2* und *Beij* wurde auch der Klarlauf (*CAS*) der Anlagen beprobt. Ferner wurden Proben aus dem Ablauf der berliner Kläranlage Schönerlinde (*Schö*) entnommen. Alle untersuchten Kläranlagen betreiben biologische Abwasserbehandlung mit Belebtschlamm (*conventional activated sludge*; *CAS*).

Die Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen in den Klarläufen reichte von 1,9 µg/L (*Ruhl2*) bis 6,7 µg/L (*Beij*) (Tabelle 7-2). In allen Abläufen dominierte **BTSA** die Benzothiazolzusammensetzung mit mittleren Konzentrationen von 1,0 µg/L (*Ruhl2*) bis 2,3 µg/L (*Beij*). **BT**, **MTBT** und **OHBT** waren ebenfalls in signifikanter Konzentration vorhanden. Die Konzentrationen liegen zwischen 2,3 µg/L (BT in *Beij*) und 0,1 µg/L (BT in *Schö*) (Tabelle 7-2). Die Klarläufe wurden ebenfalls auf **MBT** und **ABT** untersucht. Die Konzentrationen dieser Stoffe sind gering und liegen im Bereich des Quantifizierungslimits (ABT: 15 ng/L bzw. MBT: 35 ng/L; s. Tabelle 5-2). Angaben zur Anzahl positiver Befunde und positiver Befunde oberhalb LOQ enthält Anhang Kapitel 13.8.

		<i>Ruhl1</i> (n <sub>ges</sub> = 20)			<i>Ruhl2</i> (n <sub>ges</sub> = 9)			Be (n <sub>ges</sub>	eij = 4)	<i>Schö</i> (n = 1)
	á	av	sd	á	av	sd		av	sd	conc
BTSA	2	,10	0,48	0,	,99	0,39		2,25	1,16	1,76
BT	0	,55	0,19	0,	,28	0,08		2,26	0,27	0,07
OHBT	0	,14	0,08	0,	,20	0,06		1,54	0,66	0,27
MTBT	0	,44	0,09	0,	,36	0,06		0,55	0,13	0,40
MBT	0	,02	0,03	0,	,01	0,01		0,04	0,01	0,01
ABT	0	,02	< 0,01	0,	,02	0,01		0,02	<0,01	0,02
total	3	,27	0,56	1,	,86	0,32		6,66	2,28	2,53
DOC [mg/L]	14	4,0	2,2	n	.b.	n.b.		6,5	1,2	n.b.

Tabelle 7-2: Benzothiazolgehalte von sechs Benzothiazolen in Klarlauf (CAS) von drei Klärwerken.

Physikalische Einheiten generell in µg/L; außer DOC: mg/L

av : Mittelwert (average)

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

n.b. : nicht bestimmt

Die Gesamtkonzentration der untersuchten Benzothiazole ist im Ablauf von GaoBeiDia deutlich höher (6,7 µg/L) als in den Abläufen der Berliner Klärwerke (1,9 bis 3,3 µg/L). Die prozentuale Benzothiazolzusammensetzungen in den vier Abläufen unterscheiden sich hingegen nur wenig (Abbildung 7-3). Lediglich im Hinblick auf den BT-Anteil heben sich die Abläufe von GaoBeiDian (*Beij*) und Schönerlinde (*Schö*) etwas von den anderen ab: der Klarlauf von GaoBeiDian zeigt einen hohen Anteil BT (33 %), der Klarlauf von Schönerlinde einen sehr geringen Anteil (3 %). Außerdem ist der Anteil von OHBT (23 %) im Ablauf von GaoBeiDian im Vergleich zu den anderen Abläufen erhöht. Als Metabolit im Abbau von BT (s. Kapitel 3.6.2 und 6.1), dessen Konzentration im Zulauf über 20 µg/L liegt, ist die Bildung von OHBT während der Abwasserbehandlung anzunehmen, was dessen hohe Konzentration im Ablauf erklärt. Die angeführten Abweichungen in der prozentualen Zusammensetzung sind nicht ungewöhnlich und möglicherweise die Folge von unterschiedlichen Benzothiazol-quellen und daraus resultierenden unterschiedlichen Zulaufzusammensetzungen. Darüber hinaus können die Eliminationsraten in biologischen Reinigungsstufen unterschiedlich sein.

Die übergeordnete Erkenntnis aus diesen Daten jedoch ist, dass die Klarläufe kommunaler Kläranlagen mit sekundärer (GaoBeiDian) aber auch tertiärer (Ruhleben, Schönerlinde) Abwasserbehandlung Benzothiazole regelmäßig im einstelligen µg/L-Bereich enthalten. Ferner ist das Auftreten von Benzothiazolen in Klarlauf von Kläranlagen kein Phänomen, das sich auf eine Kläranlage oder eine Beprobungsserie beschränkt. Wie die Daten belegen, werden Benzothiazole kontinuierlich über den Ablauf von Kläranlagen in die Umwelt emittiert.



Abbildung 7-3: Mittlere Anteile (in %) einzelner Benzothiazole bezogen auf die Gesamtmenge in Klarlauf von drei Kläranlagen. Die Angaben rechts der Balken weisen die Gesamtkonzentration aus.

Neben den durchgeführten, umfangreichen Untersuchungen weist auch die Literatur das Vorkommen von Benzothiazolen in Abläufen von Kläranlagen aus, beschränkt allerdings auf die GCgängigen Benzothiazole BT und MTBT. Erste Funde wurden bereits Anfang der 1980er-Jahre beobachtet (Ellis et al. 1982; Paxeus & Schroeder 1996). Jüngste Daten weisen positive Befunde von BT (0,05-0,1 µg/L) und MTBT (0,1-0,3 µg/L) in den Klarläufen von vier Kläranlagen in Kalifornien aus (Zeng et al. 2004). Wird der höhere pro-Kopf-Wasserverbrauch in den USA (verglichen mit dem in Deutschland) berücksichtigt, so zeigen die hier ermittelten Daten gute Übereinstimmung mit den in Kalifornien beobachteten. Über das Auftreten der vier anderen in dieser Arbeit behandelten Benzothiazole (BTSA, OHBT, MBT, ABT) existieren in der Literatur keine Untersuchungen. Dies ist zum großen Teil auf den fast ausschließlichen Einsatz von GC-basierenden Analyseverfahren zurückzuführen, womit lediglich BT und MTBT analysierbar sind. Erst die Anwendung von HPLC-MSgestützten Analysenmethoden ermöglichte die Detektion insbesondere von BTSA sowie OHBT, MBT und ABT (Reemtsma et al. 2000; Kloepfer, Jekel et al. 2004). Da BTSA das Benzothiazol mit den Ablaufkonzentrationen Freisetzung höchsten ist, wurde die von Benzothiazolen über Kläranlagenabläufe in früheren Studien, die BTSA nicht brücksichtigten, systematisch unterbewertet.

# 7.3 Elimination mittels CAS im Klärwerk Berlin-Ruhleben

Das Auftreten von Benzothiazolen im Ablauf kommunaler Kläranlagen wirft die Frage nach deren Abbaubarkeit bzw. Eliminierbarkeit auf. Dies muss vor dem Hintergrund erörtert werden, dass die Benzothiazole, die regelmäßig in µg/L-Konzentrationen im Klarlauf detektiert wurden (BTSA, MTBT, OHBT; BT), weder zu den bekannten industriell eingesetzten Benzothiazolderivaten gehören, noch als Zusatzstoffe zu Haushaltsprodukten bekannt sind. Vielmehr handelt es sich bei den genannten vier Benzothiazolen um Transformationsprodukte aus mikrobiellen und/oder physikalisch-chemischen Prozessen.

Tabelle 7-3: Mittlere Änderung der Benzothiazolkonzentration von sechs Benzothiazolen während der Abwasserbehandlung in Berlin Ruhleben (*Ruhl*) mittels CAS bzw. MBR. Die Zahlen beziehen sich auf die Konzentrationen in Zulauf (Tabelle 7-1) und Ablauf (Tabelle 7-2) der Kläranlage Ruhleben.

		Ruhl1		Ruhl2					
	CAS	MBR1	MBR2	CAS	MBR1	MBR2			
	ng/L (%)	ng/L (%)	ng/L (%)	ng/L (%)	ng/L (%)	ng/L (%)			
BTSA	+395 (+23)	-187 (-11)	-372 (-22)	-251 (-21)	-121 (-10)	-48 (-4)			
BT	-305 (-36)	-566 (-66)	-621 (-73)	-458 (-62)	-460 (-62)	-489 (-66)			
OHBT	-360 (-72)	-456 (-91)	-426 (-85)	-237 (-54)	-206 (-47)	-236 (-53)			
MTBT	+275 (+164)	+117 (+70)	+342 (+205)	-120 (-25)	-313 (-65)	-161 (-34)			
MBT	-170 (-89)	-171 (-89)	-185 (-97)	-79 (-94)	-80 (-94)	-83 (-98)			
ABT	-10 (-36)	-3 (-10)	-13 (-46)	-4 (-16)	-11 (-44)	-10 (-42)			
total* [nmol/L]	-2 (-12)	-8 (-43)	-8 (-43)	-5 (-32)	-5 (-34)	-4 (-29)			
DOC [mg/L]	-44,1 (76)	-46,2 (80)	-46,3 (80)	n.b.	n.b.	n.b.			

\*: Gesamtelimination in nmol/L; in Klammern %

DOC in mg/L; in Klammern %

Die Beprobung des Zulaufs (*raw*) und Ablaufs (*CAS*) der Kläranlage Ruhleben (*Ruhl1*, *Ruhl2*) erfolgte unter Berücksichtigung der hydraulischen Aufenthaltszeit, was die Berechnung von Eliminationsraten ermöglicht. Bezogen auf die Gesamtkonzentration der Benzothiazole erfolgt in der ersten Beprobungsserie (*Ruhl1*) keine signifikante Elimination (12 % bezogen auf den molaren Benzothiazolgehalt), in der zweiten Serie (*Ruhl2*) war die Elimination gering (32 %; Abbildung 7-4 "total"). Diese Befunde decken sich nicht mit früheren, bei welchen eine Gesamtelimination von 87 % bezogen auf die gleichen sechs Benzothiazole beobachtet wurde (Reemtsma et al. 2002). Allerdings handelte es sich in jenem Fall um industrielles Abwasser einer Gerberei, in welchem MBT dominierte und die Benzothiazolbelastung bei insgesamt über 700 µg/L und damit mehr als zwei Größenordnungen höher lag als in kommunalem Abwasser.



Abbildung 7-4: Zu- bzw. Abnahme der Konzentration von Benzothiazolen bei der kommunalen Abwasserklärung mit Belebtschlamm.

Angabe der Werte in % bezogen auf die Zulaufkonzentration: positive Werte bedeuten Zunahme, negative Werte bedeuten Abnahme der Konzentration während CAS. "total" spiegelt die molare Konzentrationsänderung wider. \* heißt: p < 0,05; \*\* heißt: p < 0,005 (mit: p = statistische Signifikanz für die These, dass sich die Zulauf- und Ablauf-Konzentrationen **nicht** unterscheiden)

**ABT** war weder im Zulauf noch im Ablauf in signifikanter Konzentration enthalten. Bei der Diskussion wird deshalb nicht weiter auf ABT eingegangen (Tabelle 7-1, Tabelle 7-2). Die verbleibenden fünf Benzothiazole verhielten sich recht unterschiedlich (Abbildung 7-4).

**BT** zeigte zwar in beiden Untersuchungszeiträumen eine relativ stabile mittlere Elimination von zwischen 40 und 60 %, vollständige Elimination wurde jedoch in keinem Probenpaar beobachtet. Dies widerspricht Laborversuchen in welchen vollständige Elimination für BT gezeigt wurde (Brownlee et al. 1992; De Vos, De Wever & Verachtert 1993; Reemtsma et al. 1995).

Für BTSA wurde ein Konzentrationsanstieg von 23 % in der ersten Versuchperiode (Ruhl1) festgestellt. Die Abnahme von 20 % in der zweiten Versuchsperiode (Ruhl2) war statistisch nicht signifikant (Abbildung 7-4). Eine Zunahme der Konzentration von BTSA während der Behandlung von industriellem Abwasser wurde auch von Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 2002) beobachtet. Hingegen wurde in Laboruntersuchungen Abbau von BTSA (Bestimmung von NH<sub>3</sub> und SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> aus der Mineralisation von BTSA (Mainprize et al. 1976)) bzw. Elimination von BTSA (De Wever & Verachtert 1994) festgestellt. Untersuchungen von industriellem Abwasser mit sehr hohen MBT-Konzentrationen (Reemtsma et al. 2002) zeigten die Entstehung von BTSA als Transformationsprodukt aus MBT. In unserem Fall jedoch kann MBT als Edukt für BTSA ausgeschlossen werden, da die Konzentrationen von MBT zu gering sind. Vielmehr wird die Transformation von MBT zu MTBT begünstigt (s. u.: MBT/MTBT). Mögliche Edukte für die Bildung von BTSA könnten hingegen aus Gummi ausgelaugte, hydrophobe, benzothiazolenthaltende Reaktionsprodukte aus der Vulkanisation und auch MBTS sein. Aufgrund des hydrophoben Charakters liegen solche Stoffe in Rohabwasser überwiegend an partikuläre, organische Abwasserbestandteile sorbiert vor. Wird dieses partikuläre Material in der Vorklärung nicht entfernt, ist eine Oxidation der adsorbierten, hydrophoben Stoffe und eine Freisetzung, aufgrund der nun höheren Polarität, in die wässrige Phase möglich. BTSA als Transformationsprodukt aus solchen Reaktionen ist denkbar.

Die Elimination von **OHBT** ähnelte der von BT und bewegte sich im Bereich von 50 – 70 % in den Untersuchungszeiträumen *Ruhl1* und *Ruhl2* (Abbildung 7-4). Mineralisierung von OHBT ist anzunehmen, da sowohl Laboruntersuchungen mit Belebtschlamm (De Vos, De Wever & Verachtert 1993) als auch Versuche mit Reinkulturen (De Vos, De Wever, Bryon et al. 1993) Mineralisierung von OHBT gezeigt haben. Während in den Laborversuchen leichte und vollständige Abbaubarkeit für OHBT beobachtet wurde, war die Elimination im realen Maßstab stets unvollständig. Ein Zusammenhang mit dem Abbau von BT ist anzunehmen, da OHBT als Intermediat im Abbau von BT auftritt (Versuche mit Reinkulturen) (De Wever et al. 1998; Haroune et al. 2002).

**MBT** ist im Klarlauf von Ruhleben nur in sehr geringer Konzentration detektierbar, wird also vollständig eliminiert. Während MBT in der ersten Untersuchungsperiode (*Ruhl1*) im Zulauf noch in moderater Konzentration nachweisbar war ( $0,2 \mu g/L$ ), waren die mittleren Konzentrationen von MBT in der zweiten Untersuchungsperiode sehr gering ( $0,02 \mu g/L$ ) und lagen nur in zwei von neun Fällen oberhalb LOD. Eine statistisch signifikante Elimination von MBT kann demnach nur für den ersten Untersuchungszeitraum errechnet werden.

**MTBT** wird, ähnlich BTSA, nicht abgebaut, sondern wird während der Abwasserbehandlung gebildet. Die Konzentrationszunahme (!) beträgt ca. 160 % ausgehend von der Zulaufkonzentration. In

der zweiten Untersuchungsperiode war keine Konzentrationszunahme von MTBT erkennbar, ein signifikanter Abbau wurde jedoch auch nicht beobachtet (Abbildung 7-4).

Was das Verhalten bei der Abwasserbehandlung in Ruhleben betrifft, scheint zwischen MBT und MTBT eine Verbindung zu bestehen. Während des ersten Untersuchungszeitraumes (*Ruhl1*) korrespondiert die mittlere entstandene Menge MTBT (+1,5 nmol/L) ungefähr mit der mittleren eliminierten Menge MBT (-1,0 nmol/L; vollständige Elimination). Dieser erste Hinweis wird durch die große Ähnlichkeit der Zeitreihen der Zulaufkonzentration von MBT und der Konzentrationszunahme von MTBT bestätigt (Abbildung 7-5). Die Korrelation der Wertepaare weist eine hohe Signifikanz auf (statistische Signifikanz p für die Anti-These: "Wertepaare korrelieren nicht miteinander" ist sehr klein:  $p \le 0,002$ ).





Die mikrobiologische Methylierung von Thiolen ist eine bekannte, von S-Methyltransferasen katalysierte Reaktion und wurde als Detoxifizierungsstrategie interpretiert (Drotar & Fall 1985; Drotar et al. 1987). Die Methylierung von MBT zu MTBT wurde bereits in Laborversuchen bei unterschiedlichen Bedingungen beobachtet (Brownlee et al. 1992; Reemtsma et al. 1995), die Umsetzung von MBT zu MTBT war dabei nahezu vollständig. Auch wurde gezeigt, dass die aquatische Toxizität von MBT-Lösungen unter Bildung von MTBT sinkt (Reemtsma et al. 1995). Zwar ist die Methylierung von MBT eine geeignete Strategie zur Detoxifizierung, jedoch wird dadurch die Mineralisation der ursprünglichen Verbindung erschwert oder gar verhindert, da sich MTBT in Laborversuchen als nicht abbaubar erwies (Reemtsma et al. 1995).

Während das Verhalten von MBT/MTBT in der ersten Beprobungsserie (*Ruhl1*) die Beobachtungen aus Laborversuchen sehr gut widerspiegelt, konnte bei der Untersuchung der Proben der zweiten Serie (*Ruhl2*) weder ein statistisch signifikanter Abbau von MBT noch eine Zunahme von MTBT während der Abwasserbehandlung registriert werden (Abbildung 7-4). Dieses Verhalten lässt sich anhand der Zulaufkonzentrationen von MBT und MTBT erklären (Tabelle 7-1): im Gegensatz zu den positiven MBT-Befunden im Zulauf der ersten Probenserie waren die MBT-Konzentrationen im Zulauf während der zweiten Beprobungsserie vernachlässigbar. Hingegen waren die Konzentrationen von MTBT in den Zuläufen der zweiten Serie signifikant höher als in der ersten Probenserie und lagen im Bereich der MTBT-Ablaufkonzentrationen der ersten Probenserie. Es ist nahe liegend, dass im zweiten Untersuchungszeitraum (*Ruhl2*) die Methylierung von MBT bereits in der Abwasserkanalisation stattgefunden hat. Diese Erklärung wird gestützt von mutmaßlich höheren Temperaturen in der Kanalisation nach dem Sommer (*Ruhl-2*, Oktober-November) und der damit verbundenen höheren mikrobiellen Aktivität gegenüber tieferen Temperaturen und geringerer mikrobieller Aktivität vor dem Sommer (*Ruhl-1*, März-Juni).

# 7.4 Elimination mittels CAS in GaoBeiDian

In GaoBeiDian konnten die Proben von Zulauf und Klarlauf nicht verweilzeitbezogen entnommen werden. Aufgrund der geringeren Probenanzahl von der Kläranlage GaoBeiDian sind die Ergebnisse dieser Untersuchung weniger verlässlich als die der Untersuchung in Ruhleben. Daher wird die Elimination in GaoBeiDian nur kurz diskutiert. Unter der Annahme, dass die Konzentrationen in Zulauf und Klarlauf nur geringe Variationen aufweisen, können hinsichtlich der Elimination semi-quantitative Aussagen getroffen werden.

Trotz der hohen Ablaufkonzentrationen (gesamt: 6,7 µg/L) scheint die Gesamtelimination mittels *CAS* in GaoBeiDian (80 %; Tabelle 7-1, Tabelle 7-2) viel besser als in Ruhleben (20 %, Tabelle 7-3). Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Zulauf von GaoBeiDian nicht das schwer abbaubare BTSA, sondern das leicht bis mäßig abbaubare BT dominiert (Konzentrationen über 20 µg/L). OHBT scheint nur schlecht eliminiert zu werden (Abbildung 7-7). Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass es während der Abwasserbehandlung vermutlich zur Bildung von OHBT kommt, da OHBT ein Metabolit im biologischen Abbau von BT ist (De Wever et al. 1998; Haroune et al. 2002). Die schlechte Elimination von BTSA und MTBT bestätigt die in Ruhleben ermittelten Ergebnisse.

Die allgemeine Reinigungsleistung der CAS-Behandlung in GaoBeiDian ist mit einer DOC-Entfernung von über 85 % (Tabelle 7-1, Tabelle 7-2) gut. Auffallend ist auch der sehr geringe Klarlauf-DOC (6,5 mg/L). Wie in Ruhleben werden auch in GaoBeiDian, trotz einer guten Reinigungsleistung bezogen auf den DOC, Benzothiazole (besonders BTSA und MTBT) nur unvollständig entfernt.

# 7.5 Elimination von Benzothiazolen in Membranbioreaktoren

Seit einiger Zeit stößt das Potential von Membranbioreaktoren (MBR) zur Entfernung organischer Spurenstoffe aus Wasser auf zunehmendes Interesse. Hinsichtlich der Reinigungsleistung, bezogen auf den gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC), zeigen MBRs meist bessere Ergebnisse als die konventionelle Abwasserklärung mit Belebtschlamm (CAS). Es wird vermutet, dass MBRs auch in Bezug auf organische Spurenkontaminanten eine bessere Reinigungsleistung erzielen. Begründet wird dies oft mit der Möglichkeit einer besseren Adaption der Biozönose durch das höhere Schlammalter, einer höheren Schlammkonzentration und dem guten Schlammrückhalt an der Membran. Wie von Lesjean et al. (Lesjean et al. 2002) zusammengefasst, ist die Kenntnis bezüglich organischer Spurenkontaminanten und MBR derzeit jedoch noch sehr begrenzt. Reemtsma et al. (Reemtsma et al. 2002) untersuchten die Elimination von Benzothiazolen in einer industriell eingesetzten MBR-Anlage, konnten die erzielten Daten jedoch nicht mit denen einer CAS-Behandlung vergleichen. Zühlke et al. (Zuehlke et al. 2003) untersuchten in einer Studie die Elimination einiger Pharmaka mittels MBR- Technik und konnten parallel dazu deren Elimination in einer CAS-Anlage beobachten. Zwar wurde festgestellt, dass die Elimination einiger Pharmazeutika in den MBR-Anlagen besser ist als mittels CAS, jedoch bedurfte es einer langen Adaptionsphase.

Innerhalb der Studien auf der Kläranlage Ruhleben (*Ruhl1*, *Ruhl2*) wurden parallel zu Zulauf und Ablauf auch die Permeate zweier Membranbioreaktoren (*MBR1* und *MBR2*) beprobt. Hierbei handelt es sich um dieselben Anlagen wie in der Studie von Zuehlke et al. (Zuehlke et al. 2003). *MBR1* und *MBR2* sind baugleich und unterschieden sich lediglich in der Betriebsweise: *MBR1* wurde im Pre-Denitrifikations-Modus gefahren (wie auch die konventionelle Abwasserbehandlung (*CAS*) in Ruhleben), *MBR2* wurde im Post-Denitrifikations-Modus gefahren. Die beiden Anlagen im Pilotmaßstab wurden mit demselben Rohabwasser beschickt wie die eigentliche Abwasserbehandlung. Die Beprobung der Permeate erfolgte zeitversetzt zur Beprobung des Zulaufs, unter Berücksichtigung der hydraulischen Verweilzeit im Reaktor. Proben der Nachklärung (*CAS*) und der Permeate *MBR1* und *MBT2* beziehen sich auf gemeinsame Zulaufproben, was einen direkten Vergleich von Zulauf und Ablauf sowie einen Vergleich der Abläufe untereinander ermöglicht.

### 7.5.1 Vergleich der Benzothiazolelimination mittels MBR und CAS

Aufgrund der geringen Zulauf-, Ablauf- und Permeatkonzentration wird **ABT** hier nicht weiter diskutiert. Geringe bis keine Unterschiede zwischen der Elimination mittels Belebtschlamm und MBR bestehen beim Abbau von **OHBT** und **MBT** und **BT**. Bei letzterem war die *CAS*-Elimination in der ersten Beprobungsserie (*Ruhl1*) schlechter (ca. 35 %) als die Elimination mittels *MBR* (ca. 70 %) (Tabelle 7-3; Abbildung 7-6). Dieser Unterschied kann saisonale Ursachen haben und wird dadurch relativiert, dass im zweiten Unersuchungszeitraum (*Ruhl2*) die Elimination von BT mittels *CAS* im gleichen Bereich lag wie die Elimination von BT mittels *MBR* (62 bis 66 %). Die Elimination von OHBT war in der zweiten Untersuchungsperiode geringer als in der ersten. Dieser Effekt erstreckt sich auf alle drei Behandlungsarten (*CAS*, *MBR1* und *MBR2*)

		Ruhl1				Ruhl2					
	<i>MBR1</i> (r	<i>MBR1</i> (n <sub>ges</sub> = 20)		<i>MBR2</i> (n <sub>ges</sub> = 20)		MBR1 (	(n <sub>ges</sub> = 8)	MBR2 (	<i>MBR2</i> (n <sub>ges</sub> = 10)		
	av	sd	av	sd		av	sd	av	sd		
BTSA	1,52	0,40	1,33	0,26		1,10	0,29	1,17	0,25		
BT	0,29	0,07	0,23	0,09		0,28	0,05	0,25	0,05		
OHBT	0,05	0,02	0,08	0,10		0,24	0,04	0,21	0,07		
MTBT	0,28	0,07	0,51	0,18		0,17	0,10	0,32	0,15		
MBT	0,02	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	< 0,01	< 0,01		
ABT	0,02	0,01	0,01	< 0,01		0,01	< 0,01	0,02	< 0,01		
total	2,18	0,45	2,17	0,38		1,80	0,25	1,96	0,35		
DOC [mg/L]	11,9	1,57	11,8	1,43		n.b.		n.b.			

Tabelle 7-4: Benzothiazolkonzentrationen von sechs Benzothiazolen in Permeat zweier Membranbioreaktoren.

Physikalische Einheiten generell in µg/L; außer DOC: mg/L

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

n.b. : nicht bestimmt

av : Mittelwert (average)

Deutliche Unterschiede in den Eliminationsleistungen von CAS, MBR1 und MBR2 treten bei den Substanzen BTSA und MTBT auf. Die Konzentrationen von MTBT sind in CAS-Ablauf und MBR2-Permeat nahezu identisch (Ruhl1: 0,44 bis 0,51 µg/L, Ruhl2: 0,32 bis 0,36 µg/L), während im Permeat von MBR1 (Ruhl1: 0,28 µg/L, Ruhl2: 0,17 µg/L) deutlich geringere Konzentrationen auftreten (Tabelle 7-2, Tabelle 7-4). Bezogen auf die Eliminationsraten bedeutet dies, dass während der ersten Beprobungsphase (Ruhl1) eine starke Konzentrationszunahme von 164 % (CAS) bzw. 205 % (MBR2) einer geringeren von 70 % in MBR1 gegenüber steht (Abbildung 7-6). Während der zweiten Beprobungsphase (Ruhl2), konnte in allen drei Abwasserbehandlungsverfahren eine teilweise Elimination von MTBT beobachtet wurde. Die Elimination war durch Behandlung mittels CAS und MBR2 signifikant schwächer (25 % bzw. 34 %) als durch Behandlung mittels MBR1 (65 %). Hinsichtlich der Elimination bzw. Konzentrationszunahme von MTBT während der Abwasserbehandlung muss jedoch berücksichtigt werden, dass während der Untersuchungsphase Ruhl1 Bildung von MTBT aus MBT stattfand, wohingegen während Ruhl2 aufgrund der geringen MBT-Konzentration im Zulauf bei der Abwasserbehandlung kein MTBT gebildet wurde. Es ist zu vermuten, dass eine mögliche Elimination von MTBT in der ersten Beprobungsphase (Ruhl1) von einer starken Konzentrationszunahme verdeckt wird. Die Elimination von MTBT könnte auf Stripping-Prozesse während der Belüftung in der aeroben Zone zurückgeführt werden. Aufgrund des hydrophoben Charakters besteht ebenfalls die Möglichkeit, der Sorption von MTBT an Belebtschlamm, worauf erste Untersuchungen von Schlammproben schließen lassen (s. u.). Ein mikrobieller Abbau von MTBT ist unwahrscheinlich, da es hierfür in der Vergangenheit keine konkreten Hinweise gab.

**BTSA** wurde bei der Abwasserbehandlung mittels *MBR* während *Ruhl1* wie auch während *Ruhl2* geringfügig eliminiert (4% bis 22 %, Tabelle 7-3, Abbildung 7-6). Signifikante Unterschiede zwischen der Eliminationsleistung der beiden *MBR* während *Ruhl1* und *Ruhl2* waren nicht zu beobachten. Die konventionelle Abwasserbehandlung (*CAS*) während *Ruhl2* liefert ein ähnliches Resultat (21 %). Hiervon hebt sich hingegen das Verhalten von BTSA bei *CAS*-Behandlung in der Untersuchungsphase *Ruhl1* ab, während welcher eine Konzentrationszunahme um 23 % zu verzeichnen war (Tabelle 7-3, Abbildung 7-6).

Hinsichtlich der Gesamtelimination der untersuchten Benzothiazole unterscheiden sich konventionelle Behandlung und MBR-Verfahren, auch im Vergleich von *Ruhl1* zu *Ruhl2*, wenig (Elimination zwischen 29 und 43 %). Lediglich die Elimination mittels *CAS* während *Ruhl1* fällt etwas geringer aus (12 %), was in diesem Fall auf die Konzentrationszunahme von BTSA und MTBT zurückzuführen ist.



Abbildung 7-6: Elimination von Benzothiazolen durch Abwasserbehandlung mittels CAS bzw. MBR. Positive Werte bedeuten eine Zunahme der Konzentration während der Abwasserbehandlung, negative Werte bedeuten Konzentrationsabnahme.

Betrachtet man zur Beurteilung der allgemeinen Reinigungsleistung der Abwasserbehandlung die DOC-Werte, so zeigen sich gute, effektive Reinigungsleistungen in allen drei Behandlungsverfahren, wobei die beiden MBR-Anlagen leicht bessere DOC-Elimination (80 %) als die konventionelle Klärung mit Belebtschlamm (76 %) aufweisen (Tabelle 7-3). Neben einer möglicherweise höheren biologischen Aktivität in den MBR spielt dabei der bessere Rückhalt kolloider Stoffe durch die Membranen (0,2 µm Porendurchmesser) eine zu beachtende Rolle. Bezüglich der Elimination von Benzothiazolen übertreffen die MBRs in der ersten Beprobungsserie (*Ruhl1*) die konventionelle Abwasserbehandlung (43 % gegenüber 12 %; Tabelle 7-3, Abbildung 7-6), aber eine nahezu vollständige Elimination der Spurenstoffe BTSA, MTBT, OHBT, MBT, BT und ABT konnte auch mit Membranbioreaktoren nicht erreicht werden.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Betriebsweisen der beiden MBR (*MBR1* im Pre-Denitrifikations-Modus, *MBR2* im Post-Denitrifikations-Modus) waren wesentliche Unterschiede in deren Eliminationsleistung hinsichtlich (polarer) organischer Spurenstoffe nur für MTBT zu beobachten. Eine generell bessere Eliminationsleistung eines MBRs konnte nicht erkannt werden.

# 7.6 Elimination durch Flockung und GAC-Adsorption

In GaoBeiDian wird ein Teil des Klarlaufes (300 000 m<sup>3</sup>/d) durch Flockung mit Polyaluminiumchlorid (PACI)), Sedimentation und Sandfiltration zur Verwendung als Brauchwasser (vor allem zur Bewässerung von Grünflächen) aufbereitet. Innerhalb eines Chinesisch-Deutschen Kooperationsprojektes wurde auf dem Gelände von GaoBeiDian eine Pilotanlage errichtet, in welcher ein Teil dieses Brauchwassers weiteren Aufbereitungschritten (Adsorption an granulierte Aktivkohle (GAC), Filtration in einem biologisch aktiven Sandfilter) unterzogen wird, um dieses über einen Infiltrationsbrunnen direkt in den Grundwasserleiter zu infiltrieren (künstliche Grundwasseranreicherung). Innerhalb der Untersuchungen von Zu- und Ablauf der Kläranlage auf das Vorhandensein von Benzothiazolen wurden auch Proben des Ablaufes der GAC-Adsorption (*GAC*) untersucht. Die Beprobung wurde nicht verweilzeitbezogen durchgeführt, wodurch Aussagen zur Elimination der im CAS-Ablauf (*CAS*) enthaltenen Benzothiazole lediglich semiquantitativen Charakter haben.

	ra (n <sub>ges</sub>	<i>raw</i> (n <sub>ges</sub> = 3)		CAS (n <sub>ges</sub> = 4)			GA (n <sub>ges</sub>	C = 4)
	av	sd	a	/	sd		av	sd
BTSA	4,75	2,69	2,2	25	1,16		1,46	0,68
BT	22,87	2,43	2,2	26	0,27		2,25	1,54
OHBT	2,29	1,64	1,5	54	0,66		1,73	1,08
MTBT	0,53	0,15	0,5	55	0,13		0,02	0,01
MBT	1,12	1,26	0,0	)4	0,01		0,01	0,01
ABT	0,04	< 0,01	0,0	)2	< 0,01		< 0,01	< 0,01
total	31,6	0,45	6,6	66	2,28		5,48	3,30
DOC [mg/L]	51,4	2,8	6,	5	1,2		5,5	1,4

Tabelle 7-5: Benzothiazolgehalte von sechs Benzothiazolen in Wässern unterschiedlicher Prozessstufen der Kläranlage GaoBeiDian in Beijing/China.

Physikalische Einheiten generell in µg/L; außer DOC: mg/L

av : Mittelwert (average)

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

Die Benzothiazole **MBT** und **ABT** waren weder im Klarlauf von GaoBeiDian (*CAS*) (Tabelle 7-2) noch in den *GAC*-Proben (Tabelle 7-5) in relevanter Konzentration vorhanden. Diese beiden Stoffe werden daher an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

Das Verhalten von BT, BTSA, OHBT und MBT während der Abwasserbehandlung ist in Abbildung 7-7 dargestellt. Nach der guten Elimination von **BT** mittels CAS, ist keine weitere deutliche Senkung der Konzentration durch Flockung und Adsorption erkennbar. Die Konzentrationen im Ablauf des GAC-Reaktors betrugen 2,25  $\mu$ g/L. Die Konzentration von **BTSA**, die mittels CAS-Behandlung nur schlecht reduziert werden konnte, wurde auch durch Flockung und Adsorption nicht weiter verringert. Bei **OHBT** kommt möglicherweise selbst in dieser fortgeschrittenen Prozessstufe zum Tragen, dass OHBT ein Metabolit im biologischen Abbau von BT ist (De Wever et al. 1998; Haroune et al. 2002), wodurch das in GAC-Ablauf detektierte OHBT als Transformationsprodukt während der Behandlung aus BT entstanden sein könnte. Die fehlende Elimination von **MTBT** während der CAS-Behandlung bestätigt die in Berlin erzielten Resultate. Die sehr gute Elimination von MTBT in der nachgeschalteten Behandlung des Klarlaufes kann aufgrund des unpolaren Charakters von MTBT (log  $K_{OW}$  = 3,2 (Platford 1983)) der Adsorption an GAC zugeschrieben werden.


Abbildung 7-7: Elimination von vier Benzothiazolen mittels CAS und anschließender Flockung und Adsorption an GAC.

### 8 Untersuchung weiterer aquatischer Systeme

Die gewonnenen Erkenntnisse zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser, sowie deren Freisetzung in die Umwelt über Klarlauf von Kläranlagen fordern weitergehende Untersuchungen. Darin muss unter anderem geklärt werden, in welcher Konzentration Benzothiazole in Oberflächengewässern auftreten und wie sich diese nach Emission in die Umwelt verhalten. Eine erste, initiierende Studie wurde hierzu am Nordgraben (Berlin) durchgeführt.

Doch nicht nur der weitere Verbleib von Benzothiazolen fordert Beachtung, auch die möglichen Emissionsquellen verlangen Nachforschungen. Industrielle Einleiter als einzige Emissionsquelle sind, aufgrund des kontinuierlichen Auftretens von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser, unwahrscheinlich. Daraus ergibt sich die Frage, ob durch das Abwasser von Privathaushalten Benzothiazole in kommunales Abwasser eingebracht werden.

Handelt es sich bei dem kommunalen Abwassernetz um Mischkanalisation, so sind Straßenabläufe eine weitere mögliche Quelle für das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser, da durch Niederschläge Benzothiazole aus dem feinverteilten Reifenabrieb auf Fahrbahnen ausgewaschen werden können (s. Kapitel 3.5.3). Zwar existieren schon Daten zum Auftreten von Benzothiazolen in Straßenablauf, doch mit der in dieser Arbeit vorgestellten Analysenmethode können nun erstmals auch polare Benzothiazole erfasst werden.

Obwohl es sich bei den untersuchten Benzothiazolen um polare bis mäßig unpolare Stoffe handelt, bei welchen von einer generell geringen Sorptionsneigung ausgegangen werden kann, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen im Wasser gelösten und partikulär gebundenen Anteilen ein. Dies macht es unumgänglich auch die partikulären Anteile kommunalen Abwassers zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Untersuchungen mit Klärschlämmen durchgeführt.

Die folgenden Kapitel beschreiben Versuche und Untersuchungen, die zu den oben genannten Punkten innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden.

### 8.1 Verhalten von Benzothiazolen nach Freisetzung in Oberflächengewässer

Eine erste Studie wurde entlang eines 19 km langen Grabensystems im Norden von Berlin, welches das Klärwerk Schönerlinde (*Schö*) mit dem Tegeler See (als Vorfluter) verbindet, erstellt. Dieses Grabensystem *Nordgraben* (bestehend aus dem Blankenfelder Graben und dem Nordgraben) eignet sich in besonderer Weise als Untersuchungsgebiet, da es keine weiteren, volumenmäßig nennenswerten Zuflüsse hat. Lediglich bei Starkregenereignissen oder bei Hochwasser dient der Nordgraben zusätzlich als Überlauf für die Panke, einen Bach im Norden Berlins. Im Nordgraben kann das Verhalten von Benzothiazolen gut studiert werden, da die Konzentrationen noch relativ hoch sind. Dient ein größerer Fluss als Vorfluter, wäre die Präzision quantitativer Aussagen, aufgrund der enormen Verdünnung vermindert. Abbildung 8-1 zeigt die Konzentration von sechs untersuchten Benzothiazole in fünf Proben, die entlang des *Nordgrabens* einer "stehenden Welle" entnommen wurden.



Abbildung 8-1: Konzentration von Benzothiazolen entlang des Nordgrabens.

Die Benzothiazolzusammensetzung in den entlang des Nordgrabens entnommenen Proben (Abbildung 8-1) spiegelt diejenige im Klarlauf des Klärwerks Schönerlinde wider (Fließkilometer 0,7 in Abbildung 8-1 bzw. *"Schö"* in Tabelle 7-2). Über die Fließstrecke von 16 km hinweg (Fließzeit 15 h) sind Schwankungen in der Gesamtkonzentration sichtbar, die sich zwischen 2,0 und 3,4 µg/L bewegt. Dies fällt auch für **BTSA** (1,3 bis 2,3 µg/L) auf. Es ist wahrscheinlich, dass diese Variabilität auf Probleme, eine stehende Welle über die gesamte Fließzeit (15 h) zu beproben, zurückzuführen ist. Von anderen Quellen als dem Klärwerk Schönerlinde wurden keine nennenswerten Einträge in den Graben beobachtet. Weder DOC (9,7 +/-0,3 mg/L) noch Borat (3,8 +/-0,5 mg/L) geben Hinweise auf weitere Zuflüsse oder zeigen einen Trend entlang des Grabens. In Analogie dazu konnte für keines der detektierten Benzothiazole ein Trend hin zu niedrigeren (oder höheren) Konzentrationen erkannt werden (Abbildung 8-1). Diese ersten Resultate zum Verhalten von Benzothiazolen in Oberflächengewässer bescheinigen den Stoffen **BT**, **OHBT**, **MTBT** und **BTSA** eine beträchtliche Lebenszeit. Ein deutlicher Abbau dieser Stoffe in Oberflächengewässern innerhalb von 15 h ist nicht zu erkennen.

Aus Literaturdaten zum Auftreten von Benzothiazolen in Oberflächenwasser geht hervor, dass 60-90 % des von einer Chemiefabrik freigesetzten Benzothiazols BT etliche Meilen flussabwärts nachgewiesen werden konnten (Jungclaus et al. 1976). Eine weitere Studie fand abnehmende BT-Konzentrationen und gleichbleibende MTBT-Konzentrationen über eine Fließzeit von 8-14 h hinweg in einem Bach, in welchen Abwasser eines Chemieunternehmens eingeleitet wird (Brownlee et al. 1992). MTBT wurde auch in Konzentrationen von 0,04 µg/L innerhalb einer Langzeitstudie an der Elbe in den Jahren 1994 bis 1999 gefunden (Fooken et al. 2000). Das korreliert mit den Konzentrationen die im Ablauf von kommunalen Klärwerken (Tabelle 7-2) und im Nordgraben (Abbildung 8-1) gefunden wurden, wenn ein genereller Verdünnungsfaktor von 10 für die Verdünnung von Klarlauf nach dessen Freisetzung in die aquatische Umwelt angenommen wird. Für die anderen hier bestimmten Benzothiazole gibt es in der Literatur keine Vergleichswerte.

Für das Verhalten polarer organischer Verbindungen in Oberflächenwasser ist, neben deren Beständigkeit gegenüber mikrobiellen Prozessen, auch deren photochemische Reaktivität entscheidend. Zur Photolyse von MBT sind verschiedene Studien verfügbar (Brownlee et al. 1992; Malouki et al. 2004). Aber für die Benzothiazole, die in Oberflächenwasser detektiert wurden, gibt es keine Studien hinsichtlich photolytischer Transformationen. Es bleibt daher unklar, durch welche

Prozesse Benzothiazole in Oberflächengewässern transformiert und/oder abgebaut werden und in welchem Maße Photolyse dazu beiträgt.

#### 8.2 Benzothiazole in Straßenablauf

Benzothiazole können aus dem Reifenabrieb von Autoreifen bei Regenereignissen ausgewaschen werden. Über das Auftreten von Benzothiazolen in Straßenablauf berichten verschiedene Publikationen (Spies et al. 1987; Reddy & Quinn 1997; Kumata et al. 2002). Zu den in Straßenablauf detektierten Benzothiazolen gehören BT, OHBT und MTBT sowie zwei unpolare, benzthiazolische Nebenprodukte aus Formulierungen von Vulkanisationsbeschleunigern, wie sie bei der Herstellung von Gummi Einsatz finden (Tabelle 8-1). Die Untersuchungen allerdings beruhen oft auf isolierten Proben oder liefern nur qualitative Ergebnisse.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde eine Datenreihe zum Auftreten von sechs polaren Benzothiazolen in Straßenablauf aufgenommen. Straßenablauf eines Teilstückes der Berliner Stadtautobahn wurde durch die Kollegen T. Ludwig und M. Stüber innerhalb des Projektes *"Neue Konzepte der Regenwasserbewirtschaftung in Stadtgebieten", Teilprojekt 6: "Entfernung von Kolloiden und gelösten Stoffen bei der Versickerung von Regenwasser"* beprobt. Der Straßenablauf entstand durch ein Regenereignis (8,2 mm), welches einer längeren Trockenperiode folgte. Der Beprobungspunkt war ein Sammelrohr eines Drainagesystems, das den Abfluss von 63 000 m<sup>2</sup> Fläche sammelt.

Der gemessene Fluss des Straßenablaufs ist in Abbildung 8-2 (Kreise) dargestellt. Dieser zeigt einen sehr steilen Anstieg zu Niederschlagsbeginn und erreicht nach ca. 30 Minuten (7:00 h) einen maximalen Fluss von 340 m<sup>3</sup>/h. Nach dieser ersten großen "Welle" fällte der Fluss zunächst rasch auf ca. 150 m<sup>3</sup>/h ab und verringert sich dann unter merklichen Schwankungen langsamer.

Die Gesamtkonzentration der sechs untersuchten Benzothiazole, gelöst in der wässrigen Phase, lag in der ersten Probe bei 74 µg/L (Abbildung 8-2). Diese erste Probe kann, bildlich dargestellt, als erste Fraktion der Extraktion von feinverteiltem Reifengummi mit Wasser erachtet werden und erklärt die hohe Benzothiazolkonzentration. In den Fraktionen 2 und 3 beträgt die Gesamtkonzentration durch die starke Verdünnung (stark ansteigender Fluss) lediglich ca. 40 µg/L. Hierbei muss beachtet werden, dass zwar die Konzentration zurückgeht, da aber der Anstieg des Flusses größer ist, liegt auch die Gesamtfracht an Benzothiazolen höher. Mit zunehmender Dauer des Regens war die Fahrbahn zunehmend von Staub und Reifenabrieb befreit, was eine weitere Reduktion der Benzothiazol-gesamtkonzentration im Straßenablauf bewirkt. Nicht desto trotz stellte sich bei ca. 20 µg/L ein Konzentrationsgleichgewicht ein, welches bis zum versiegen des Abflusses relativ konstant blieb.

Die hier gemessenen Konzentrationen liegen grob eine Größenordung höher als die in unbehandeltem Abwasser gemessenen Werte. Während des gesamten Regenereignisses änderte sich die Benzothiazolzusammensetzung im Straßenablauf nur wenig. Hierbei dominiert **BTSA** mit 60 % des Gesamtgehaltes und variierte zwischen 55 und 10  $\mu$ g/L (inklusive der ersten Probe). BTSA bildet zusammen mit **OHBT** (25–30 %; 12-5  $\mu$ g/L) und **BT** (8–13 %; 4-1  $\mu$ g/L) ca. 97 % der Gesamtmenge gelöster Benzothiazole. Die Anteile von **MBT** und **MTBT** waren gering (zusammen  $\leq$  3 %) und **ABT** vernachlässigbar (Abbildung 8-2).



Abbildung 8-2: Konzentration von Benzothiazolen in Straßenablauf. ABT wurde nicht in signifikanten Konzentrationen detektiert und ist in diese Abbildung nicht mit aufgenommen.

Die hier präsentierten, hohen Konzentrationen an Benzothiazolen in Straßenablauf zeigen für ein umfangreicheres Analytspektrum als bisher untersucht, dass Straßenablauf eine Quelle für den Eintrag von Benzothiazolen in die Umwelt darstellt. Dabei bestätigen unsere Untersuchungen bisherige Arbeiten hinsichtlich des Auftretens von BT, OHBT und MTBT (Tabelle 8-1). BT (0,1–1,2  $\mu$ g/L) und OHBT (1–7  $\mu$ g/L) (Reddy & Quinn 1997; Zeng et al. 2004) waren in früheren Studien die dominierenden Benzothiazole. Die von uns beobachtete, ca. 4-5fache höhere Konzentration von OHBT und BT ist, unter Berücksichtigung des sehr hohen Verkehrsaufkommens auf der Berliner Stadtautobahn (mehr Reifenabrieb bzw. Straßenstaub) und der längeren Trockenperiode vor dem Regenereignis, verständlich. Dies spiegelt sich auch in der Konzentration von MTBT wider, die in unserem Fall zwischen 0,2-1,5  $\mu$ g/L liegt und bei Zeng et al. (Zeng et al. 2004) lediglich 0,04-0,2  $\mu$ g/L betrug. Da aber bislang nicht das Auftreten des wichtigsten Benzothiazols BTSA erfasst wurde, unterschätzten bisherige Untersuchungen das Ausmaß der Belastung von Straßenablauf mit Benzothiazolen enorm. Mit Konzentrationen zwischen 55 und 10  $\mu$ g/L übertrifft BTSA die Konzentrationen früherer BT und OHBT Befunde (Tabelle 8-1) um mehr als das eine Größenordnung.

BTSA	BT	OHBT	MTBT	24MoBT	NCBA	Zitat
Oberflächenab	lauf/Straßenabl	auf, wässrige Fr	aktion [µg/L bzv	w. ppb]		
	0,4-1,2 0,1-0,5	1-7	0,04-0,2	0,2 0,08-0,2 0,02-0,4	0,01-0,1	(Reddy & Quinn 1997) (Zeng et al. 2004) (Kumata et al. 2002)
10-55	1-4	5-12	0,2-1,5			(Kloepfer, Jekel et al. 2005) (Resultate der Versuche aus dieser Arbeit)
Oberflächenab	lauf/Straßenabl	auf, partikuläre F	Fraktion [µg/L b	zw. ppb]		
	0,05-0,15	< 0,05-0,11		< 0,01		(Reddy & Quinn 1997)
	0,04-0,16		0,02-0,07	n.d.		(Zeng et al. 2004)
Straßenstaub [	µg/kg bzw. ppb	]				
	80150	25-90		2		(Reddy & Quinn 1997)
				10-500	15-1200	(Kumata et al. 2000)
				2-33	5-400	(Kumata et al. 2002)
				270		(Spies et al. 1987)

Tabelle 8-1: Konzentrationen von Benzothiazolen in Oberflächenablauf/Straßenablauf bzw. Straßenstaub.

n.d.: nicht detekierbar

Die Benzothiazolfracht des Straßenablaufes einer Fläche von 63 000 m<sup>2</sup> aus dem untersuchten Regenereignis summiert sich zu 14 000 mg. Bezogen auf die Fläche sind dies 152  $\mu$ g/m<sup>2</sup> BTSA, 54  $\mu$ g/m<sup>2</sup> OHBT, 15  $\mu$ g/m<sup>2</sup> BT. Die Fracht von MTBT, MBT und ABT liegt zusammen unter 5  $\mu$ g/m<sup>2</sup>. Dies bestätigt, dass innerstädtischer Straßenablauf beträchtliche Mengen BTSA, BT und OHBT beinhaltet, weitere polare, organische Stoffe sind zu vermuten.

Werden, wie im Untersuchungsgebiet, die Straßenabläufe Oberflächengewässern zugeführt (Trennkanalisation), kommt es zu direkter Kontamination, da die derzeit übliche Behandlungsmethode von Straßenablauf vor der Einleitung ins Oberflächengewässer aus einem Sedimentationsschritt besteht. Zur Entfernung hydrophober organischer Stoffe kann diese Art der Behandlung aufgrund der Adsorption an partikuläres Material ausreichend sein. Für polare Kontaminanten, die gelöst in der Wasserphase vorliegen, muss dies jedoch bezweifelt werden.

Einer Mischkanalisation zugeführt, würden Straßenabläufe zwar die Benzothiazolfracht des Abwassers erhöhen, könnten jedoch teilweise in der Abwasserbehandlung entfernt werden. Beim Kanalisationssystem im Einzugsgebiet des Klärwerkes Berlin-Ruhleben handelt es sich um Mischkanalisation. Niederschlagsdaten für den Untersuchungszeitraum wurden von einer Wetterstation in Berlin-Tempelhof bezogen. Wie aus Abbildung 8-3 hervorgeht, besteht im Falle des Klärwerkes Ruhleben keine strenge Korrelation zwischen der Benzothiazolkonzentration im Zulauf und dem Auftreten von Regenereignissen. Zwar sind die Konzentrationen nach dem Regenereignis an den Kalendertagen 105/106 verglichen mit den Konzentrationen der Tage davor erhöht. Jedoch beim Regenereignis am Kalendertag 143 verändert sich die Konzentration nicht.



Abbildung 8-3: Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen im Zulauf zur Kläranlage Ruhleben und Regenereignisse in Berlin während desselben Zeitraums. Dargestellt ist der erste Untersuchungszeitraum *Ruhl1* (März bis Juni 2002) (s. Kapitel 7.1.1); die Niederschlagsmengen entstammen der Wetterstation Berlin-Tempelhof.

Verschiedene Faktoren können eine klare Korrelation in unserem Fall verwischen: die Niederschlagsmengen im Bereich der Wetterstation (Tempelhof) und im Einzugsgebiet der Kläranlage können sehr unterschiedlich sein. Besonders bei Starkregenereignissen infolge eines Gewitters ist das betroffene Gebiet oft lokal begrenzt. Darüber hinaus spielt die Durchmischung von Straßenablauf und Abwasser im großen Einzugsgebiet der Kläranlage Ruhleben (1,6 Mio. Einwohnergleichwerte) eine Rolle, sowie die unterschiedlich lange und schwer abschätzbare Aufenthaltszeit in der Kanalisation. Die Entnahme von 24-h-Mischproben bewirkt einen weiteren "Ausgleich" von Konzentrationsunterschieden. Der Einfluss von Straßenablauf auf die Benzothiazolkonzentration im Kläranlagenzulauf kann genauer überprüft werden, indem der Untersuchungszeitraum auf die Dauer eines Regenereignisses (plus ein paar Stunden davor und einige danach) begrenzt wird und Proben stündlich gezogen werden. Von Vorteil wären außerdem, wenn die Niederschlagsmenge in kürzeren Intervallen bestimmt würde und der Fluss des Zulaufes zum Klärwerk bekannt wäre. Eine solche Studie konnte innerhalb dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

#### 8.3 Benzothiazole in häuslichem Abwasser

Der Anteil industriellen Abwassers im Rohabwasser der Kläranlage Ruhleben beträgt ca. 30 %. Es stellt ich die Frage, ob allein industrielle Einleitungen das Auftreten von Benzothiazolen im Rohabwasser verursachen oder ob auch Privathaushalte als mögliche Emissionsquellen in Betracht gezogen werden müssen. Das Auftreten von Benzothiazolen in sanitärem Abwasser wurde bislang nicht untersucht. Informationen zum Einsatz von Benzothiazolen in haushaltsüblichen Konsumgütern liegen nicht vor. Aufgrund der breiten industriellen Anwendung von Benzothiazolen ist anzunehmen, dass verschiedenste Produkte Benzothiazole enthalten. Durch Anwendung und Gebrauch entsprechender Produkte können Benzothiazole freigesetzt und mit dem häuslichen Abwasser abgegeben werden. Um diesen Aspekt zu beleuchten, wurde rein häusliches Abwasser (Trennkanalisation, kein Straßenablauf, keine industriellen Einleiter) eines Wohngebietes im Süden Berlins untersucht. Die mittleren Konzentrationen mehrerer Stichproben aus einem Pumpwerk (Beprobungen erfolgten an zwei Tagen) sind in Tabelle 8-2 dargestellt. Die Benzothiazolgesamtkonzentration in häuslichem Abwasser lag im Mittel bei 1,71 und 2,21 µg/L. Das entspricht ca. 50-85 % der in Kläranlagenzulauf (Berlin-Ruhleben; Tabelle 7-1) detektierten Menge, was vergleichsweise hoch ist. Erstmalig wird damit gezeigt, dass häusliche Abwässer eine Quelle für den Eintrag von Benzothiazolen in kommunales Abwasser darstellen können.

Die Proben von häuslichem Abwasser konnten nicht auf **MBT** untersucht werden. Trotz der Zugabe des Antioxidans Glutathion (GSH) vor der Probenaufarbeitung, war MBT in den untersuchten Proben von häuslichem Abwasser nicht stabil. Demzufolge liegt die Benzothiazolgesamtkonzentration möglicherweise höher als hier angegeben. Hinsichtlich der einzelnen Analyte ist **BTSA** abermals am stärksten vertreten (0,8 bzw. 0,9  $\mu$ g/L). Der Anteil am Gesamtgehalt (41 bzw. 44 %) ist nur wenig geringer als in kommunalem Abwasser (46-49 %; Berlin-Ruhleben in Tabelle 7-1). Ähnlich stellt sich die Situation für **BT** dar: BT ist in häuslichem Abwasser am zweitstärksten vertreten (28-36 %) und liegt dort in ähnlichen Anteilen wie in kommunalem Abwasser (25-32 %) vor. Aufgrund der hohen Bestimmungsgrenzen von OHBT in unbehandeltem Abwasser ist dessen Detektion schwierig. **OHBT** konnte in jeder Beprobungsserie lediglich je einmal oberhalb des LOD detektiert werden. Die Aussagekraft hinsichtlich OHBT ist demnach gering. Die geringen Konzentrationen von **MTBT** (< 0,1  $\mu$ g/L) korrespondieren mit der Abwessenheit von MBT und mit einer zu kurzen Aufenthaltszeit des Abwassers im Abwassersystem, als dass Biomethylierung hätte stattfinden können.

	Januar (n =	Januar 2004 (n = 3)		2004 )
	av	sd	av	sd
BTSA	0,76	0,09	0,92	0,38
BT	0,48	0,32	0,79	0,35
OHBT	0,32*		0,37*	
MTBT	0,10	0,07	0,07*	
MBT	n.d.		n.d.	
ABT	0,05	0,07	0,06	0,07
total	1,71	0,67	2,21	1,05

Tabelle 8-2: Konzentrationen von sechs Benzothiazolen in rein häuslichem Abwasser.

Einheiten von av und sd in µg/L

av : Mittelwert (average)

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

n.d. : nicht detektierbar \* : nur eine Probe > LOD

Gleichbleibende, regelmäßige Befunde könnten ein Hinweis darauf sein, dass Benzothiazole durch alternde Produkte oder durch Auswaschen aus Produkten ins häusliche Abwasser gelangen. Die Höhe der Konzentration allerdings lässt auch die Vermutung zu, dass im Haushalt eingesetzte Produkte, wie z. B. Reinigungsmittel, Benzothiazole enthalten und die Benzothiazole mit diesen direkt ins Abwasser abgegeben werden. Eine Reihe von Haushaltsprodukten (vorwiegend Reinigungsmittel; Liste im Anhang Kapitel 13.10) wurde auf Benzothiazole untersucht, jedoch konnten in keinem der Produkte Benzothiazole nachgewiesen werden.

#### 8.4 Untersuchung von Klärschlamm

Zwar handelt es sich bei den untersuchten Benzothiazolen um polare bis mäßig unpolare Stoffe, bei welchen generell eine eher geringe Sorptionsneigung zu vermuten ist. Da sich zwischen der partikulären Phase und der wässrigen Phase ein Gleichgewicht einstellt und die partikulärer Fracht einen hohen Anteil in der Kläranlage hat, ist es erforderlich, zu überprüfen, ob und in welchem Umfang Benzothiazole sorbiert vorliegen. Untersuchungen hierzu wurden durchgeführt, indem Klärschlamm mit Lösungsmitteln mehrfach extrahiert wurde (Anhang Tabelle 13-30). Aliquote Teile der Extrakte wurden entsprechend dem Standard-Additions-Verfahren dotiert und per LC-ESI-MS/MS auf *extrahierbare Benzothiazole* analysiert.

#### 8.4.1 Extrahierbare Benzothiazole

Für die Extraktionsversuche standen Mischschlamm (Gemisch aus Primärschlamm der Vorklärung und Sekundärschlamm der Nachklärung; s. Abbildung 4-2) der konventionellen Abwasserbehandlung in Berlin Ruhleben und Belebtschlamm eines Membranbioreaktors zur Verfügung.

Im Extrakt von **Mischschlamm** (TS: 37,5 g/L) konnten die Benzothiazole ABT, BT, BTSA, MBT und OHBT nicht nachgewiesen werden. Als einziges der untersuchten Benzothiazole zeigte **MTBT** ein deutliches Signal im undotierten Extrakt des Standard-Additions-Verfahrens. Aus der Geradengleichung der Standard-Additions-Geraden (Abbildung 8-4) ergibt sich eine MTBT-Konzentration von 119 µg/kg Trockensubstanz. Bezogen auf die untersuchte Mischschlamm-Suspension beträgt die Konzentration von sorbiertem MTBT 4,46 µg/L.



Abbildung 8-4: Standard-Addition von MTBT in Wasser (Quadrate) und MeOH/Aceton-Extrakt aus Mischschlamm (Kreise).

Auch in Proben von **Belebtschlamm** einer MBR-Anlage (n = 4; TS: 17,1-19,9 g/L) konnte kein ABT, BTSA und OHBT detektiert werden. Hingegen wurden neben MTBT auch BT und OHBT beobachtet. Die aus den Steigungen der Standard-Additions-Geraden (Anhang Abbildung 13-3) bestimmten Konzentrationen bezogen auf die Trockenmasse betragen 399 µg/kg (MTBT), 85 µg/kg (BT) und 75 µg/kg (MBT). Bezogen auf die Schlammsuspension betragen die Konzen-

trationen der partikulär gebundenen Benzothiazole 6,8  $\mu$ g/L (MTBT), 1,4  $\mu$ g/L (BT) und 1,3  $\mu$ g/L (MBT).

Verglichen mit Konzentrationen von MTBT, BT und MBT, gelöst in der wässrigen Phase von Kläranlagenzulauf der Kläranlage Ruhleben (Tabelle 7-1 und Tabelle 7-2), liegen die Konzentrationen partikulär gebundener Benzothiazole deutlich höher (Tabelle 8-3). Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um eine grobe Schätzung, da die Proben des Zulaufs und die Schlammproben zwar alle im Klärwerk Ruhleben entnommen wurden, aber aus in unterschiedlichen Beprobungsserien stammen.

Tabelle 8-3: Konzentrationen von Benzothiazolen in der wässrigen Phase und von partikulär gebundenen Benzothiazolen.

[µg/L]	MTBT	ВТ	MBT
partikulär gebundene Konzentration	[µg/L]		
Mischschlamm	4,46		
MBR-Belebtschlamm	6,8	1,4	1,3
gelöste Konzentration im Zulauf [µg/	'L]		
Ruhl1	0,17	0,85	0,19
Ruhl2	0,44	0,74	0,02

Zur Ermittlung der Sorptionsneigung von MTBT, BT und MBT an den untersuchten Schlamm kann ferner der Verteilungskoeffizient K<sub>D</sub> von sorbierter Konzentration (mol/kg) zu gelöster Konzentration (mol/L) bestimmt werden (Tabelle 8-4). Zwar handelt es sich hier abermals um eine Schätzung, jedoch lassen die hohen Koeffizienten von MTBT auf eine ausgeprägte Sorptionsneigung an Belebtschlamm schließen, wohingegen die Sorptionsneigung von BT und MBT nicht stark ausgeprägt ist (K<sub>D</sub> < 500).

Tabelle 8-4: Verteilungskoeffizient  $K_D$  von sorbierter Konzentration an Belebtschlamm (mol/kg) zu gelöster Konzentration (mol/L) von drei Benzothiazolen.

	MTBT (181 g/mol)	BT (135 g/mol)	MBT (167 g/mol)
partikulär gebundene Konzentration	[µg/kg]*		
MBR-Belebtschlamm	399	85	75
partikulär gebundene Konzentration	C <sub>s</sub> [µmol/kg]*		
MBR-Belebtschlamm	2,20	0,63	0,45
gelöste Konzentration im Zulauf Cd	[µmol/L]		
Ruhl1	0,0009	0,0063	0,0011
Ruhl2	0,0024	0,0055	0,0001
$\mathbf{K}_{D} = \mathbf{C}_{s} / \mathbf{C}_{d} [(\mu mol/kg) / (\mu mol/L)]$			
Ruhl1	2444	100	409
Ruhl2	919	115	**

\*: bezogen auf die Trockenmasses der partikulären Fracht.

\*\*: dieser Wert würde aufgrund der geringen Zulaufkonzentration in der Probenserie *Ruhl2* sehr groß werden und würde so das tatsächlichen Verhältnisse in keiner Weise widerspiegeln; die Berechnung wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt Den hier durchgeführten Extraktionsversuchen zufolge zeigen MTBT, BT und MBT hohe Neigung zur Sorption an Schlamm und liegen dadurch in deutlichen Mengen partikulär gebunden vor.

Bei der Untersuchung der wässrigen und der partikulären Fraktion von Oberflächenablauf hinsichtlich der Gehalte von BT, OHBT und 24MoBt beobachtete Reddy et al. (Reddy & Quinn 1997) höhere Konzentrationen aller drei Benzothiazole in der wässrigen Fraktion als in der partikulären Fraktion (Tabelle 8-1). Zum gleichen Ergebnis kommt auch Zeng et al. (Zeng et al. 2004) für die Stoffe BT, MTBT und 24MoBT (Tabelle 8-1). Dass sich die Ergebnisse der beiden vorgenannten Autoren nicht mit unseren Resultate decken, kann unter anderem auf die Art der partikulären Fracht zurückgeführt werden. In Oberflächenablauf besteht diese zu einem großen Teil aus anorganischen Stoffen, wohingegen in Klärschlämmen organische Bestandteile, die ein besseres Sorbens für die untersuchten Benzothiazole darstellen, dominieren.

Aus den Untersuchungen wird klar, dass Benzothiazole durch Sorption an Schlamm in signifikanten Mengen bei der Abwasserbehandlung eliminiert werden. Um eine näherungsweise korrekte Bilanz hierzu erstellen zu können, wäre es notwendig zu wissen, wie hoch der Anteil partikulär gebundener Benzothiazole in Rohabwasser ist. Zukünftige Studien müssen diesen Punkt berücksichtigen.

#### 8.4.2 Rücklösung von Benzothiazolen während der Abwasserbehandlung

Aus der Tatsache, dass deutliche Anteile der Benzothiazole MTBT, BT und MBT partikulär gebunden vorliegen, stellte sich die Frage, ob diese Benzothiazole wieder in Lösung gehen, sobald die Konzentration gelöst vorliegender Substanzen durch mikrobiellen Abbau während der Abwasserbehandlung geringer wird.

Auch die Konzentrationszunahme einiger Benzothiazole (MTBT, BTSA) durch den Klärprozess fordert Untersuchungen zum Verhalten sorbierter Benzothiazole während der Abwasserbehandlung. Eine Desorption von Benzothiazolen von der partikulären in die wässrige Phase, möglicherweise unterstützt durch mikrobielle oder chemische Prozesse während der biologischen Abwasserbehandlung, wird beispielsweise im Zusammenhang mit dem Konzentrationsanstieg von BTSA während der Abwasserbehandlung (Probenserie *Ruhl1*; Kapitel 7.3) vermutet.

Zur Klärung dieser Vermutung wurde in einer ersten Versuchsreihe Mischschlamm (s. o.) im Labor inkubiert. Bei unterschiedlichen Bedingungen sollten dabei die anaerobe sowie die aerobe Stufe der biologischen Abwasserbehandlung simuliert werden. Als Kontrolle zu diesen biologischen Ansätzen wurden mikrobielle Prozesse in einem weiteren Inkubationsansatz durch HgCl<sub>2</sub> unterbunden. Die Konzentration des Mischschlammes in den Inkubationsansätzen betrug 4 g/L. In regelmäßigen Abständen wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen hinweg Proben entnommen, filtriert und direkt per LC-MS auf Benzothiazole untersucht.

In keinem der Inkubationsansätze konnten BTSA, MTBT, MBT, OHBT und ABT in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Über BT kann anhand dieses Versuches keine Aussage getroffen werden. Eine Überprüfung der Spritzenfilter, die während dieses Versuches verwendet wurden, zeigte, dass diese eine Quelle für die Kontamination mit BT sind, da in Filtraten von Reinstwasser erhebliche Mengen BT gefunden wurde. Alle Proben der drei Inkubationsansätze (aerob, anaerob, vergiftet mit HgCl<sub>2</sub>) enthielten BT von der ersten bis zur letzte Probe.

Aufgrund der hohen Konzentration von partikulär gebundenem MTBT (119 µg/kg), die bei dem oben beschriebenen Extraktionsversuch mit Mischschlamm beobachtet wurde, wäre eine Freisetzung von MTBT zu erwarten gewesen, aber in keiner Probe konnte MTBT detektiert werden. Das Detektionslimit für MTBT liegt bei 20 ng/L (s. Kapitel 5.8.3). Eine 5 %-ige Rücklösung von sorbiertem MTBT hätte eine Konzentration gelösten MTBT im Inkubationsansatz von ca. 25 ng/L verursacht. Rücklösung von MTBT während des Untersuchungszeitraumes (8 Wochen) fand demnach, wenn überhaupt, in einem Ausmaß von weniger als 5 % statt.

Obgleich diese ersten Resultate lediglich orientierenden Charakter haben, wird deutlich, dass bei der Untersuchung auf Benzothiazole dem partikulären Anteil aquatischer Proben eine bedeutendere Rolle zukommt als bislang vermutet. Um verlässliche Aussagen zum Sorptionsverhalten und zum Ausmaß der Sorption von Benzothiazolen machen zu können, muss bei zukünftigen Messreihen neben der wässrigen Phase auch die partikuläre Phase untersucht werden. Untersuchungen von Proben mit partikulärer Fracht sehr unterschiedlichen Charakters, könnten ferner Aufschluss über die Ausprägung der Sorptionsneigung in Abhängigkeit von der Art des partikulären Materials liefern.

### 9 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

#### Analytik von Benzothiazolen

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde eine Analysenmethode entwickelt, die es ermöglicht, neben den mäßig polaren Benzothiazolen BT, MTBT und MBT, auch die sehr polaren Vertreter BTSA, OHBT und ABT in unterschiedlichen aquatischen Proben quantitativ zu bestimmen. Die Analysenmethode basiert auf chromatographischer Trennung der Analyte mittels HPLC über C18-Säulen und nachfolgender Detektion mittels ESI-MS/MS im MRM-Modus. Die sechs Analyte werden dabei in zwei separaten HPLC-MS-Analysenläufen analysiert, wodurch eine deutliche Verbesserung der chromatographischen Trennung und insbesondere der MS-Empfindlichkeit erreicht werden konnte.

Durch Anreicherung der Analyte mittels SPE über Festphasen der Marke *Oasis HLB (Waters)* konnten Detektionsgrenzen im Bereich von 5-40 ng/L (Detektionslimit der Methode in Klarlauf) erreicht werden. Dies ermöglicht, Benzothiazole in kommunalem Abwasser, Ablauf kommunaler Kläranlagen, Oberflächenwasser u. a. zu untersuchen. Besonders zu beachten war bei der Festphasenextraktion, dass einerseits die sehr polaren Analyte BTSA und ABT während der Probenaufgabe nicht durchbrechen, und dass andererseits MTBT, der unpolarste der Analyte, vollständig eluiert wird. Ferner musste die freie Thiolgruppe von MBT geschützt werden, da es ansonsten verstärkt zur Bildung von MBTS kommt, das nicht per ESI-MS detektierbar ist. Von sieben Reduktionsmitteln, wie sie gängigerweise in der Biochemie zum Schutz proteinogener Thiolgruppen benutzt werden, erwies sich GSH als am besten geeignet. Die ermittelten SPE-Wiederfindungen der sechs Analyte lagen zwischen 60 und 100 %.

Die notwendigerweise unspezifische SPE-Methode hatte auch unerwünschte Folgen, wie z. B. die Anreicherung von Matrix. Untersuchungen zum Einfluss von Matrixbestandteilen zeigten, dass Matrixeffekte sehr unterschiedlich sein können und nicht vorhersagbar sind. Die Verringerung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes durch *post-column splitting* reduzierte Matrixeffekte erfolgreich, wobei der optimale Volumenstrom von der Matrix und von dem jeweiligen Analyten abhängt. In vorliegenden Fall wurde der Volumenstrom von 500 µL/min auf 90 µL/min (negativer ESI-Modus; Detektion von BTSA, MBT, OHBT) bzw. auf 20 µL/min (positiver ESI-Modus; ABT, BT, MTBT) verringert.

Matrixeffekte können zwar reduziert, aber nicht vollständig eliminiert werden. Da sie ferner nicht vorhersagbar sind und sehr unterschiedlichen Einfluss auf das Analysenergebnis haben können, ist für eine korrekte Quantifizierung die Anwendung des Standard-Additions-Verfahrens notwendig. Bei langen Probenserien, wie innerhalb dieser Arbeit durchgeführt, ist die Durchführung des Standard-Additions-Verfahrens mit jeder Probe jedoch nicht praktikabel, weshalb die Anwendbarkeit einer Variante dieses Verfahrens, der *externen Kalibration in Probenmatrix*, untersucht wurde. Je vier Proben aus Beprobungsserien von Zulauf und Ablauf einer kommunalen Kläranlage mit je 20 Proben wurden dem Standard-Additions-Verfahren unterzogen. Der so ermittelte matrixspezifische MS-Response variierte um maximal 25 %, was, bezogen auf die Probenart, auf eine recht homogene Matrix hindeutet. Diese Variabilität wurde für die Untersuchung von Zulauf und Ablauf als akzeptabel

angesehen und die Quantifizierung der gesamten Probenserie erfolgte über den mittleren Response aus den jeweils 4 Standard-Additions-Verfahren.

Die entwickelte Analysenmethode wurde zur Untersuchung einer Vielzahl von Proben unterschiedlicher Kompartimente eingesetzt und diente in leicht abgeänderter Form und ohne den Anreicherungsschritt für die Untersuchung von Metaboliten des Abbaus von BT/OHBT und MBT in Laborversuchen mit Reinkulturen.

#### Transformation und Abbau von Benzothiazolen

In Kooperation mit einer französischen Arbeitsgruppe wurde die Metabolisierung von BT/OHBT und von MBT mit Reinkulturen von Mikroorganismen untersucht. Die Inkubation der Benzothiazole mit Subspezies der Gattung *Rhodococcus*, die Beprobung der Ansätze und Untersuchungen mittels NMR wurden von der französischen Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Identifizierung relevanter Metabolite erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS im Rahmen dieser Arbeit.

Bei der Metabolisierung von BT wird zunächst der Thiazolring aktiviert, indem BT zu OHBT hydroxyliert wird. Weitere Transformationen im Abbau von OHBT wie auch von MBT verlaufen jedoch primär am Benzolring des benzothiazolischen Systems. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Abbau von OHBT als auch von MBT über eine Ringspaltung des 6-Ringes verläuft und damit dem allgemeinen Abbau von Aromaten folgt.

Im Abbau von MBT gelang mittels LC-ESI-MS/MS der Nachweis und die Identifizierung von Vorläufern des Catechols von MBT (6-Hydroxy-2-MBT und 6,7-dihydroxy-dihydro-2-MBT), im Abbau von OHBT wurde das Muconat von OHBT als Ringspaltungsprodukt nachgewiesen. Untersuchungen unseres Kooperationspartners bestätigten weiterhin das Auftreten des Muconats von MBT im Abbau von MBT, was zeigt, dass es sowohl im Abbau von OHBT als auch im Abbau von MBT mit Rhodococcus Subspezies vorwiegend zur ortho-Spaltung des aromatischen 6-Ringes kommt.

Neben den identifizierten Metaboliten wurden noch weitere auffällige Metabolite beobachtet, für die es einige Hinweise auf eine benzothiazolische Struktur gibt. Jedoch konnte die genaue Struktur oder Summenformel nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Diese Untersuchungen standen unter anderem vor dem Hintergrund, mögliche Transformationsprodukte zu identifizieren, die für *screening*-Untersuchungen relevant sein könnten. Die identifizierten Metabolite erwiesen sich jedoch als rasch transformierbar und in Proben von Zu- und Ablauf von Kläranlagen, in welchen Benzothiazole vorhanden waren, konnte keiner der Metabolite aus dem Laborabbau von OHBT oder MBT detektiert werden.

#### Benzothiazole im Zulauf von Kläranlagen

Aufgrund fehlender analytischer Methoden lagen bislang zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser keine Informationen vor. Die erste umfangreiche Untersuchung zum Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser wurde im Zuge dieser Arbeit durchgeführt. In zwei Serien, über jeweils mehrere Wochen hinweg, wurde dabei der Zulauf zur kommunalen Kläranlage Ruhleben untersucht. Alle sechs erfassten Benzothiazole konnten im Zulauf detektiert werden. Die Gesamtkonzentrationen lagen zwischen 2,1 und 5,5  $\mu$ g/L bei einem mittleren Benzothiazolgehalt von ca. 3  $\mu$ g/L. Hervorzuheben ist hierbei, dass alle Proben Benzothiazole enthielten. BTSA dominierte die Zusammensetzung mit Konzentrationen zwischen 0,7 und 3,5  $\mu$ g/L, gefolgt von BT (0,2-1,3  $\mu$ g/L) und

OHBT (bis 0,8 µg/L). Der lange Beprobungszeitraum und die Beprobung in zwei Serien zeigen, dass das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser kein saisonales bzw. einmaliges Phänomen darstellt.

Die regelmäßigen Konzentrationen weisen auf eine kontinuierliche Emission von Benzothiazolen hin. Da industrielle Einleiter eher diskontinuierlich emittieren, lässt dies vermuten, dass noch weitere, bislang unbekannte Emissionsquellen existieren, die Benzothiazole kontinuierlich ins kommunale Abwasser eintragen. Hierfür spricht auch der geringe Anteil industriellen Abwassers (bis ca. 30 %) im Zulauf der Kläranlage Ruhleben. Bei Untersuchungen zum Auftreten von Benzothiazolen in rein häuslichem Abwasser lagen mittlere Gesamtkonzentrationen von 3 bzw. 5 Stichproben (1,7 bzw. 2,1 µg/L) bei ungefähr 2/3 der Konzentration des Zulaufes zur Kläranlage Ruhleben. Weitere Untersuchungen zur Offenlegung von Quellen für den Eintrag von Benzothiazolen in häusliches Abwasser wurden angestrebt und einige Haushaltsprodukte wurden auf Benzothiazole untersucht, jedoch enthielt keines der Produkte eines der sechs Benzothiazole. Die Quellen für den Eintrag von Benzothiazolen in häusliches und auch kommunales Abwasser bleiben nach wie vor weitgehend ungeklärt. Untersuchungen hierzu und Recherchen diesbezüglich könnten wichtige Erkenntnisse liefern.

Innerhalb eines Chinesisch-Deutschen Kooperationsprojektes wurden einige Stichproben des Zulaufes zur kommunalen Kläranlage GaoBeiDian in Beijing, China untersucht. Die Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen war hier deutlich höher und lag bei ca. 30 µg/L. BT dominierte hier die Zusammensetzung mit 20 bis 25 µg/L. Verglichen mit der Kläranlage in Ruhleben waren auch die Gehalte von BTSA (2 - 7,4 µg/L) und OHBT (0,4 - 3,6 µg/L) erhöht. Zwar ist die Verlässlichkeit der Resultate von der Kläranlage in Beijing aufgrund der geringen Probenzahl geringer als die der Beprobungsserie in Berlin Ruhleben, doch bestätigen die Ergebnisse, dass das Auftreten von Benzothiazolen in kommunalem Abwasser kein lokales Problem, beschränkt auf den Raum Berlin, ist.

#### Benzothiazole in Klärschlämmen

In der Literatur beschriebene Beobachtungen lassen auf geringe Sorptionsneigung von Benzothiazolen an partikuläres Material schließen, was mit deren polarem Charakter einhergeht. Diese Beobachtungen entstammen Untersuchungen, bei welchen von eher sandigem partikulärem Material ausgegangen werden muss. Erste, hier durchgeführte Untersuchungen zur Sorption von Benzothiazolen an Klärschlamm legen hingegen offen, dass trotz deren Polarität signifikante Anteile an dieses organische, partikuläre Material adsorbiert sein können. Vorwiegend MTBT, der unpolarste der sechs Analyte, konnte in Schlammextrakten bis ca. 40 µg/100g nachgewiesen werden. Überraschend war die Detektion von MBT und BT, deren Konzentration allerdings deutlich geringer war (BT:8,5 g/100g, MBT: 7,5 g/100g).

Bisherige Untersuchungen haben den sorbierten Anteil von Benzothiazolen stets unterschätzt. Die hier durchgeführten Analysen von Klärschlamm hinsichtlich des Benzothiazolgehaltes belegen, dass bei zukünftigen Untersuchungen von Klärwerksproben die partikuläre Fracht nicht außer Acht gelassen werden darf. Darüber hinaus bedarf es weiterer Informationen und Experimente, um die Sorption von Benzothiazolen an partikuläres Material und deren etwaige Elimination über die partikuläre Fracht besser beschreiben zu können.

# Elimination von Benzothiazolen durch konventionelle Abwasserbehandlung und mittels Membranbioreaktoren

Parallel zur Untersuchung des Zulaufes zur Kläranlage Ruhleben wurde deren Klarlauf sowie die Permeate zweier Membranbioreaktoren beprobt, wodurch Rückschlüsse auf die Elimination von Benzothiazolen während der Abwasserbehandlung möglich sind.

Während beider Untersuchungszeiträume war die Elimination von Benzothiazolen durch konventionelle Belebtschlammbehandlung gering und erreichte maximal 30 %. BT, MBT, OHBT und ABT wurden gut bis sehr gut eliminiert und konnten im Ablauf der Kläranlage Ruhleben nur in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu ist die Eliminierbarkeit von BTSA und MTBT gering. In einem der Untersuchungszeiträume zeigte sich sogar ein Anstieg der Konzentration sowohl von MTBT als auch von BTSA. Für MTBT scheint hierfür die Bildung aus MBT verantwortlich zu sein. Dies steht zwar nicht im Einklang mit den Resultaten aus den Abbauversuchen von MBT, jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass Beobachtungen aus Inkubationen mit Reinkulturen selten direkt auf die Prozesse in einer Anlage im Realmaßstab übertragen werden können. Für den Konzentrationsanstieg von BTSA konnte aus den Untersuchungen keine Erklärung abgeleitet werden. Ein Eintrag von adsorbierten Benzothiazolen in die Kläranlage und eine Oxidation/Desorption während der Abwasserbehandlung wird in diesem Zusammenhang vermutet.

Die Untersuchung der Permeate der Membranbioreaktoren zeigt, dass deren Reinigungsleistung hinsichtlich der Elimination von Benzothiazolen nur geringfügig besser war als die konventionelle Belebtschlammbehandlung.

#### Freisetzung von Benzothiazolen über Klarlauf und Verhalten in der Umwelt

Durch die unvollständige Elimination von Benzothiazolen werden diese über den Klarlauf in die aquatische Umwelt eingeleitet. Besonders BTSA und MTBT spielen hier eine bedeutende Rolle, da diese Benzothiazole eine ausgeprägte Stabilität hinsichtlich des mikrobiellen Abbaus aufweisen. Die mittlere Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen im Klarlauf von Berlin Ruhleben liegt bei 2-3  $\mu$ g/L. BTSA (1,0-2,1  $\mu$ g/L) und MTBT (ca. 0,4  $\mu$ g/L) machen darin den größten Anteil aus. Berücksichtigt man den Durchsatz der Kläranlage in Berlin Ruhleben von ca. 200 000 m<sup>3</sup>/d, so werden täglich ca. 400 - 600 g (!) Benzothiazole in die Umwelt entlassen.

Ähnliche Benzothiazolkonzentrationen wurden im Klarlauf weiterer Klärwerke beobachtet. Der Klarlauf des Klärwerkes GaoBeiDian in Beijing wies mittlere Gesamtkonzentrationen von ca. 6,7 µg/L auf, was sich mit den deutlich höheren Zulaufkonzentrationen in GaoBeiDian verglichen mit Ruhleben deckt.

Der Ablauf eines weiteren Berliner Klärwerkes, Schönerlinde, zeigte Gesamtkonzentrationen von ca. 2,5 µg/L. Die Zusammensetzung war hier ähnlich der im Ablauf von Ruhleben und wies hohe Anteile BTSA (1,8 µg/L) und MTBT (0,4 µg/L) auf. Als Vorfluter dieses Klärwerkes dient ein Grabensystem aus Blankenfelder Graben und Nordgraben. Über dieses ca. 19 km lange Grabensystem wird der Klarlauf von Schönerlinde in den Tegeler See geleitet, ohne dass nennenswerte weitere Zuflüsse in das Grabensystem münden. Zur Untersuchung des Verhaltens der emittierten Benzothiazole nach deren Freisetzung in die Umwelt wurde eine stehende Welle mehrfach beprobt. Im Verlauf von 15 h, die das Wasser für die Fließstrecke benötigt, wurden keine signifikanten Konzentrationsänderungen beobachtet.

#### Benzothiazole in Straßenablauf

Benzothiazole gelangen über Auslaugungen von Reifenabrieb in Straßenabläufe. Das Kanalisationsnetz in Berlin besteht teilweise aus Trenn- und teilweise aus Mischkanalisation. Durch Trennkanalisation werden Straßenabläufe direkt in Oberflächenwasser eingeleitet, was eine direkte Kontamination der Umwelt mit Benzothiazolen bedeutet. Bei Mischkanalisation werden Straßenabläufe ins städtische Abwassernetz eingeleitet, erreichen so kommunale Klärwerke und werden dort der Abwasserbehandlung unterzogen. Zur Bewertung des Auftretens von Benzothiazolen in Straßenablauf wurde der Ablauf der Berliner Stadtautobahn infolge eines Regenereignisses untersucht.

Die Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen lag in den ersten Proben bei bis zu 70  $\mu$ g/L, nahm dann im Verlauf des Regenereignisses ab und pendelte sich bei ca. 20  $\mu$ g/L ein. Dies entspricht einer Oberflächenbeladung von 152  $\mu$ g/m<sup>2</sup>. BTSA war abermals das dominierende Benzothiazol mit einem Anteil von 60 %, gefolgt von OHBT (25 %) und BT (13 %) in deutlichen Anteilen.

Trotz der hohen Benzothiazolkonzentrationen in Straßenablauf konnte keine Korrelation der Zulaufgehalte der Kläranlage Ruhleben mit den Regenereignissen in Berlin hergestellt werden.

#### Fazit

Die gewonnen Erkenntnisse zeigen, dass Benzothiazole in µg/L-Konzentrationen in kommunalem Abwasser auftreten, wo sie durch die Abwasserbehandlung nur unvollständig entfernt werden. Das führt zu einer Freisetzung von Benzothiazolen, vorwiegend von BTSA und MTBT, in die aquatische Umwelt. Besonders BTSA birgt aufgrund seiner ausgeprägten Polarität und seines schlechten biologischen Abbaus die Gefahr der Migration ins Grundwasser. In Berlin ist dies von besonderer Bedeutung, da Berlin große Teile seines Trinkwassers aus Uferfiltrat gewinnt. Die aktuellen Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung sind nicht primär auf die Entfernung von polaren Organika ausgerichtet, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, dass BTSA auch in Trinkwasser auftreten kann.

Toxikologische Aspekte von BTSA wurde bislang wenig untersucht. Werden vergleichsweise die toxikologischen Daten anderer Benzothiazole betrachtet, so kann davon ausgegangen werden, dass die detektierten Konzentrationen von BTSA keine nennenswerte toxikologische Relevanz haben. Dennoch ist es für eine nachhaltige Wasserversorgung notwendig, dem Auftreten und der Entfernung polarer Organika Rechnung zu tragen, da sich polare, persistente Stoffe im teilgeschlossenen Wasserkreislauf Berlins anreichern können.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich BTSA sind von Interesse, da es während der Abwasserbehandlung zur Bildung von BTSA kommen kann. Zwar stieg durch Biomethylierung von MBT während der Abwasserbehandlung auch die Konzentration von MTBT an, doch ist im Vergleich dazu der Ursprung von BTSA unbekannt und der Konzentrationsanstieg war deutlicher. Zur Klärung, ob in diesem Zusammenhang partikulär gebundene Benzothiazole eine Rolle spielen, bedarf es weiterer Nachforschungen.

Da BTSA in den unterschiedlichsten Probenarten die Zusammensetzung dominierte, unterschätzten frühere Untersuchungen, basierend auf GC-Techniken, die BTSA nicht erfassten, systematisch die Gesamtkonzentration von Benzothiazolen deutlich. BTSA erfüllt in gewisser Hinsicht die Funktion eines Markers. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte daher besonderer Wert auf die Erfassung von BTSA gelegt werden. Möglicherweise kann von BTSA ausgehend, auf die

Konzentration anderer benzothiazolischer Analyte geschlossen werden. Dies würde bedeuteten, dass nicht mehr in allen Proben das komplette Set von Benzothiazolen untersucht werden müsste, sondern nur noch in einigen Stichproben einer gesamten Probenserie.

Insgesamt wären weitere Untersuchungen zum Auftreten und Verhalten von Benzothiazolen sowie Recherchen hinsichtlich ihres Einsatzes und der Emissionsquellen von Benzothiazolen wünschenswert, denn obgleich hier die Ansicht vertreten wird, mit den untersuchten sechs Benzothiazolen die wichtigsten Vertreter der Stoffklasse der Benzothiazole erfasst zu haben, ist das Vorhandensein weiterer, noch nicht erkannter Transformationsprodukte nicht ausgeschlossen.

## 10 Literatur

Advanced Chemistry Development Inc. (1994-2002). ACD/Labs Software. Toronto, Advanced Chemistry Development (ACD). Vers. V4.67.

**Andreozzi R., Caprio V. & Marotta R.** (2001). Oxidation of benzothiazole, 2-mercaptobenzothiazole and 2- hydroxybenzothiazole in aqueous solution by means of  $H_2O_2/UV$  or photoassisted Fenton systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76(2): 196-202.

**Baez M. E., Aponte A. & Sanchez-Rasero F.** (2003). Microwave-assisted solvent extraction of the herbicide methabenzthiazuron from soils and some soil natural organic and inorganic constituents. Influence of environmental factors on its extractability. *Analyst* 128(12): 1478-1484.

**Bellavia V., Natangelo M., Fanelli R. & Rotilio D.** (2000). Analysis of benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(4): 1239-1242.

**Besse P., Combourieu B., Boyse G., Sancelme M., De Wever H. & Delort A. M.** (2001). Longrange H-1-N-15 heteronuclear shift correlation at natural abundance: a tool to study benzothiazole biodegradation by two Rhodococcus strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4): 1412-1417.

**BG Chemie** (2000). *Kurzfassung Toxikologische Bewertungen - Band 6*. Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Heidelberg. 367pp.

**Bosma T., Harms H. & Zehnder A.** (2001). Biodegradation of Xenobiotics in Environment and Technosphere. *The Handbook of Environmental Chemistry - Biodegradation and Persistance*. Beek B. (Ed.) Springer-Verlag, Berlin. Vol. 2: 163-202.

Bradshaw T. D., Stevens M. F. G. & Westwell A. D. (2001). The discovery of the potent and selective antitumour agent 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and related compounds. *Current Medicinal Chemistry* 8(2): 203-210.

Braus H., Middleton F. M. & Walton G. (1951). Organic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters. *Analytical Chemistry* 23(8): 1160-1164.

Brownlee B. G., Carey J. H., MacInnis G. A. & Pellizzari I. T. (1992). Aquatic Environmental Chemistry of 2-(Thiocyanomethylthio)Benzothiazole and Related Benzothiazoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11(8): 1153-1168.

**Bruins A. P.** (1997). ESI Source Design and Dynamic Range Considerations. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications*. Cole R. B. (Ed.) Wiley-Interscience, New York. 107-136.

**BUA** (1991). *2-Mercaptobenzothiazol*. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt/Germany. 183pp.

Burnham A. K., Calder G. V., Fritz J. S., Junk G. A., Svec H. J. & Vick R. (1973). Trace Organics in Water - Their Isolation and Identification. *Journal of the American Water Works Association* 65(11): 722-725.

American Chemical Society (2002). Electronic database of CAS (division of the ACS) searched by SciFinder Scholar, <u>http://www.cas.org/SCIFINDER/</u>.

**Cespedes R., Petrovic M., Raldua D., Saura U., Pina B., Lacorte S., Viana P. & Barcelo D.** (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 697-708.

**Chudoba J., Tucek F. & Zeis K.** (1977). Biochemical Decomposition of Benzothiazoles. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 5(5): 495-498.

CRC (1999). CRC Handbook of Chemistry and Physics.

**Daniels C. R. & Swan E. P.** (1987). HPLC Assay of the Anti-Stain Chemical TCMTB Applied to Lumber Surfaces. *Journal of Chromatographic Science* 25(1): 43-45.

Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H. & Jones K. M. (1986). *Data for Biochemical Research*. Clarendon Press, Oxford. 580pp.

**Day J. C., Tisi L. C. & Bailey M. J.** (2004). Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. *Luminescence* 19(1): 8-20.

**De Vos D., De Wever H. & Verachtert H.** (1993). Parameters Affecting the Degradation of Benzothiazoles and Benzimidazoles in Activated-Sludge Systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39(4-5): 622-626.

**De Vos D. E., De Wever H., Bryon G. & Verachtert H.** (1993). Isolation and Characteristics of 2-Hydroxybenzothiazole-Degrading Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39(3): 377-381.

**De Wever H., Besse P. & Verachtert H.** (2001). Microbial transformations of 2-substituted benzothiazoles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(5-6): 620-625.

**De Wever H., De Cort S., Noots I. & Verachtert H.** (1997). Isolation and characterization of *Rhodococcus rhodochrous* for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiazole. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47(4): 458-461.

**De Wever H. & Verachtert H.** (1994). 2-Mercaptobenzothiazole degradation in laboratory fed-batch systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42(4): 623-30.

**De Wever H. & Verachtert H.** (1997). Biodegradation and toxicity of benzothiazoles. *Water Research* 31(11): 2673-2684.

**De Wever H., Vereecken K., Stolz A. & Verachtert H.** (1998). Initial transformations in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3270-3274.

**Dietrich A. M., Millington D. S. & Seo Y. H.** (1988). Specific Identification of Synthetic Organic-Chemicals in River Water Using Liquid Liquid Extraction and Resin Adsorption Coupled with Electron-Impact, Chemical Ionization and Accurate Mass Measurement Gas-Chromatography Mass-Spectrometry Analyses. *Journal of Chromatography* 436(2): 229-241.

Dole M., Mack L. L. & Hines R. L. (1968). Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* 49(5): 2240-2249.

**Drotar A., Burton G. A., Tavernier J. E. & Fall R.** (1987). Widespread Occurrence of Bacterial Thiol Methyltransferases and the Biogenic Emission of Methylated Sulfur Gases. *Applied and Environmental Microbiology* 53(7): 1626-1631.

**Drotar A. M. & Fall R.** (1985). Microbial Methylation of Benzenethiols and Release of Methylthiobenzenes. *Experientia* 41(6): 762-764.

Ellis D. D., Jone C. M., Larson R. A. & Schaeffer D. J. (1982). Organic Constituents of Mutagenic Secondary Effluents from Wastewater-Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11(3): 373-382.

**Engels H. W., Weidenhaupt H. J., Abele M., Pieroth M. & Hofmann W.** (1993). Rubber, 4. Chemicals and Additives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Elvers B., Hawkins S., Rossey W. and Schulz G. (Eds.). Wiley VCH, Weinheim. Vol. A 23.

Fiehn O., Reemtsma T. & Jekel M. (1994). Extraction and Analysis of Various Benzothiazoles from Industrial Wastewater. *Analytica Chimica Acta* 295(3): 297-305.

**Fiehn O., Wegener G., Jochimsen J. & Jekel M.** (1998). Analysis of the ozonation of 2-Mercaptobenzothiazole in water and tannery wastewater using sum parameters, liquid- and gas chromatography and capillary electrophoresis. *Water Research* 32(4): 1075-1084.

**Fisher Scientific Company L.L.C.** (2004). Material Safety Data Sheet, https://www1.fishersci.com/index.jsp.

**Fooken C., Stachel B. & Reincke H.** (2000). *Ausgewählte organische Spurenverunreinigungen in der Elbe und Elbenebenflüssen im Zeitraum 1994-1999*. Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe. 84pp.

**Fowler W. M., Russell A. E., Kruger I. H. & Pinchuck S. C.** (1987). The Extraction and High-Performance Liquid-Chromatography (HPLC) Determination of TCMTB Samples of Treated Wet Blue. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 71(4): 100-107.

Gaja M. A. & Knapp J. S. (1997). The microbial degradation of benzothiazoles. *Journal of Applied Microbiology* 83(3): 327-334.

Gaja M. A. & Knapp J. S. (1998). Removal of 2-mercaptobenzothiazole by activated sludge: A cautionary note. *Water Research* 32(12): 3786-3789.

Gallois A., Gross B., Langlois D., Spinnler H. E. & Brunerie P. (1990). Influence of Culture Conditions on Production of Flavor Compounds by 29 Ligninolytic Basidiomycetes. *Mycological Research* 94: 494-504.

**Gangl E. T., Annan M., Spooner N. & Vouros P.** (2001). Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. *Analytical Chemistry* 73(23): 5635-5644.

Gattner H., Lindner W. & Neuber H.-U. (1988). Mikrobieller Befall bei der Lederherstellung und seine Kontrolle mit modernen Konservierungsmiteln. *Das Leder* (38): 66-73.

**Geier J., Lessmann H., Uter W. & Schnuch A.** (2003). Occupational rubber glove allergy: results of the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK), 1995-2001. *Contact Dermatitis* 48(1): 39-44.

Geier J., Pilz B., Frosch P. J. & Schnuch A. (1994). Contact Allergy Due to 2-Mercaptobenzimidazole. *Dermatosen in Beruf Und Umwelt* 42(5): 190-193.

**Gnirss R., Lesjean B., Buisson H., Adam C. & Kraume M.** (2003). Enhanced Biological Phosphorus Removal with Post-Denitrification in a Membrane Bioreactor. Conference Proceedings of the AWWA Conference, Atlanta, USA.

**Grohmann K., Gilbert E. & Eberle S. H.** (1998). Identification of nitrogen-containing compounds of low molecular weight in effluents of biologically treated municipal wastewater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 26(1): 20-30.

**Habibi M. H., Tangestaninejad S. & Yadollahi B.** (2001). Photocatalytic mineralisation of mercaptans as environmental pollutants in aquatic system using TiO<sub>2</sub> suspension. *Applied Catalysis B-Environmental* 33(1): 57-63.

Hahn J. U. (1993). Kühlwasser, der Entwurf des Anhang 31 zu §7a WHG. Umwelt-Technologie Aktuell 2: 75-83.

Hansson C. & Agrup G. (1993). Stability of the Mercaptobenzothiazole Compounds. *Contact Dermatitis* 28(1): 29-34.

Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M. & Delort A. M. (2001). H-1 NMR: a tool to study the fate of pollutants in the environment. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie li Fascicule C- Chimie* 4(10): 759-763.

Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Kloepfer A., Reemtsma T., De Wever H. & Delort A. M. (2004). Metabolism of 2-mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 6315-6319.

Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Reemtsma T., Kloepfer A., Diab A., Knapp J. S., Baumberg S. & Delort A. M. (2002). Benzothiazole Degradation by *Rhodococcus pyridinovorans Strain PA*: Evidence of a Catechol 1,2-Dioxygenase Activity. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12): 6114-6120.

Hennion M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 856(1-2): 3-54.

**Hillebrand U.** (2000). *Erläuterungen zur Statistik in der Analytik: Eine Darstellung mit Beispielen*. Shaker Verlag, Aachen. 112pp.

**Hopfgartner G., Bean K., Henion J. & Henry R.** (1993). Ion-Spray Mass-Spectrometric Detection for Liquid- Chromatography - a Concentration-Flow-Sensitive or a Mass-Flow- Sensitive Device. *Journal of Chromatography* 647(1): 51-61.

Humphreys M., Hall N., Phillips D. A. S. & Taylor J. A. (2003). Synthesis and application of disperse dyes based on 1,4-bis(benzothiazol-2-yl)benzene to polyethylene terephthalate. *Dyes and Pigments* 59(2): 193-200.

Hutchins S. R., Tomson M. B., Wilson J. T. & Ward C. H. (1984). Microbial Removal of Wastewater Organic-Compounds as a Function of Input Concentration in Soil Columns. *Applied and Environmental Microbiology* 48(5): 1039-1045.

Iribarne J. V. & Thomson B. A. (1976). Evaporation of Small lons from Charged Droplets. *Journal of Chemical Physics* 64(6): 2287-2294.

**Jung J. H., McLaughlin J. L., Stannard J. & Guin J. D.** (1988). Isolation, Via Activity-Directed Fractionation, of Mercaptobenzothiazole and Dibenzothiazyl Disulfide as 2 Allergens Responsible for Tennis Shoe Dermatitis. *Contact Dermatitis* 19(4): 254-259.

Jungclaus G. A., Games L. M. & Hites R. A. (1976). Identification of Trace Organic-Compounds in Tire Manufacturing Plant Wastewaters. *Analytical Chemistry* 48(13): 1894-1896.

**Jungclaus G. A., Lopezavila V. & Hites R. A.** (1978). Organic-Compounds in an Industrial Wastewater - Case-Study of Their Environmental Impact. *Environmental Science & Technology* 12(1): 88-96.

**Kebarle P. & Ho Y.** (1997). On the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications*. Cole R. B. (Ed.) Wiley-Interscience, New York. 3-63.

**Kebarle P. & Tang L.** (1993). From lons in Solution to lons in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 65(22): A972-A986.

**Kennedy M. J.** (1986). High-performance Liquid-Chromatographic Analysis of Preservative-Treated Timber for 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole and Methylene Bisthiocyanate. *Analyst* 111(6): 701-705.

Kloepfer A., Gnirss R., Jekel M. & Reemtsma T. (2004). Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. *Water Science and Technology* 50(5): 203-208.

**Kloepfer A., Jekel M. & Reemtsma T.** (2004). Determination of benzothiazoles from complex aqueous samples by liquid chromatography–mass spectrometry following solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1058(1-2): 81-88.

**Kloepfer A., Jekel M. & Reemtsma T.** (2005). Occurrence, Sources, and Fate of Benzothiazoles in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology* 39(10): 3792-3798.

**Kloepfer A., Quintana J. B. & Reemtsma T.** (2005). Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1067(1-2): 153-160.

Konstantinou I. K. & Albanis T. A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* 30(2): 235-248.

**Krumwiede D.** (2001). Umwelteintrag von Benzothiazolen aus dem Reifenabrieb über Kanalisation und Kläranlage. Dissertation, Universität Bremen, Bremen.

**Kumata H., Sanada Y., Takada H. & Ueno T.** (2000). Historical trends of N-cyclohexyl-2benzothiazolamine, 2-(4- morpholinyl)benzothiazole, and other anthropogenic contaminants in the urban reservoir sediment core. *Environmental Science & Technology* 34(2): 246-253.

**Kumata H., Takada H. & Ogura N.** (1997). 2-(4-morpholinyl)benzothiazole as an indicator of tire-wear particles and road dust in the urban environment. *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*. American Chemical Society, Washington. Vol. 671: 291-305.

Kumata H., Yamada J., Masuda K., Takada H., Sato Y., Sakurai T. & Fujiwara K. (2002). Benzothiazolamines as tire-derived molecular markers: Sorptive behavior in street runoff and application to source apportioning. *Environmental Science & Technology* 36(4): 702-708.

Lacorte S., Latorre A., Barcelo D., Rigol A., Malmiqvist A. & Welander T. (2003). Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 22(10): 725-737.

Lehninger A. L. (1987). Prinzipien der Biochemie. de Gruyter, Berlin. 1117pp.

**Lesjean B., Gnirss R., Duennbier U. & Gilbert M.** (2002). Removal of Trace Organics Through Membrane Bioreactor Processes - Presumptive Advantages, Review and Discussion on Appropriate Indicators. Conference Proceedings of the 2nd World Water Congress of the IWA, Melbourne, Australia.

Li Y., Li R. W., Zhou S. X. & Luo B. J. (2001). Sedimentary environment indicators: Benzothiazole and its derivatives. *Chinese Science Bulletin* 46(5): 412-416.

**Liska I.** (2000). Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - historical development and overview. *Journal of Chromatography A* 885(1-2): 3-16.

Louter A. J. H., Rinkema F. D., Ghijsen R. T. & Brinkman U. A. T. (1994). Rapid Identification of Benzothiazole in River Water with on-line Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography-Mass selective Detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 56: 49-56.

**Mainprize J., Knapp J. S. & Callely A. G.** (1976). Fate of Benzothiazole-2-Sulfonic Acid in Biologically Treated Industrial Effluents. *Journal of Applied Bacteriology* 40(3): 285-291.

Malouki M. A., Giry G., Besse P., Combourieu B., Sancelme M., Bonnemoy F., Richard C. & Delort A. M. (2003). Sequential bio- and phototransformation of the herbicide methabenzthiazuron in water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(9): 2013-2019.

Malouki M. A., Richard C. & Zertal A. (2004). Photolysis of 2-mercaptobenzothiazole in aqueous medium - Laboratory and field experiments. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 167(2-3): 121-126.

Mark H. F., Othker D. F., Overberger C. G. & Seaborg G. T. (1982). Rubber Chemicals. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley, New York. Vol. 20.

Matuszewski B. K., Constanzer M. L. & Chavez-Eng C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75(13): 3019-3030.

Merck KGaA, Darmstadt, Germany (2005). ChemDat online, http://de.chemdat.info/mda/de/.

**Milanova E., Ellis S. & Sithole B.** (2001). Aquatic toxicity and solution stability of two organic corrosion inhibitors: 2-mercaptobenzothiazole and 1,2,3- benzotriazole. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 16(3): 215-218.

**Niessen W. M. A.** (1999). Chromatographic Science Series. *Liquid Chromatorgraphy-Mass Specrometry*. Marcel Dekker, Inc., New York. 634pp.

**Parkanyi C. & Abdelhamid A. O.** (1985). Photodegradation of Pesticides - Photolysis of 2-Mercaptobenzothiazole and 2-Mercaptobenzimidazole. *Heterocycles* 23(11): 2917-2926.

**Pattinson S. J. & Wilkins J. P. G.** (1989). Investigation by Gas-Chromatography - Mass-Spectrometry of Potential Contamination Incurred by the Use of Crimp-Cap Vial Closures. *Analyst* 114(4): 429-434.

**Paxeus N.** (1996). Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden. *Water Research* 30(5): 1115-1122.

**Paxeus N. & Schroeder H. F.** (1996). Screening for non-regulated organic compounds in municipal wastewater in Goteborg, Sweden. *Water Science and Technology* 33(6): 9-15.

Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA.) (2004). PAN Pesticide Database, http://www.pesticideinfo.org.

**Platford R. F.** (1983). The Octanol-Water Partitioning of Some Hydrophobic and Hydrophilic Compounds. *Chemosphere* 12(7-8): 1107-1111.

**Reddy C. M. & Quinn J. G.** (1997). Environmental chemistry of benzothiazoles derived from rubber. *Environmental Science & Technology* 31(10): 2847-2853.

**Reemtsma T.** (1994). *Wirkung einer anaerob-aeroben biologischen Behandlung auf gelöste organische Stoffe in Gerbereiabwasser*. Dissertation, Technische Universtiät Berlin, Berlin.

**Reemtsma T.** (2000). Determination of 2-substituted benzothiazoles of industrial use from water by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14(17): 1612-1618.

**Reemtsma T.** (2001). The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part II: Obstacles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 20(10): 533-542.

**Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G. & Jekel M.** (1995). Microbial Transformations and Biological Effects of Fungicide-Derived Benzothiazoles Determined in Industrial Wastewater. *Environmental Science & Technology* 29(2): 478-485.

**Reemtsma T., Gnirss R. & Jekel M.** (2000). Infiltration of combined sewer overflow and tertiary municipal wastewater: An integrated laboratory and field study on nutrients and dissolved organics. *Water Research* 34(4): 1179-1186.

**Reemtsma T., Zywicki B., Stueber M., Kloepfer A. & Jekel M.** (2002). Removal of sulfur-organic polar micropollutants in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Environmental Science & Technology* 36(5): 1102-1106.

**Reyes L. H. & Wrobel K.** (2002). Indirect extraction-spectrophotometric determination of 2-(thiocyanomethylthiol)benzothiazole in chrome tanning liquors after its breakdown to 2mercaptobenzothiazole. *Talanta* 56(3): 515-521.

Georg Thieme Verlag (1995). Roempp Chemie Lexikon (CD-ROM).

**Santodonato J., Davis L., Howard P. H. & Saxena J.** (1976). *Investigation of Selected Potential Environmental Contaminants: Mercaptobenzothiazoles*. National Technical Information Service (NTIS). 145pp.

Schlegel H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 634pp.

**Schmegel C.** (1995). *Struktur-Wirkungsuntersuchungen in der prospektiven Analyse von Umweltgefährdungen am Beispiel der Substanzklasse der Benzothiazole*. Dissertation, Universität Bremen, Bremen.

Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M. & Imboden D. M. (1993). *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 681pp.

**Seifert R. M. & King A. D.** (1982). Identification of Some Volatile Constituents of *Aspergillus-Clavatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30(4): 786-790.

Sigma-Aldrich Company (2005). Material Safety Data Sheet, http://www.sigmaaldrich.com.

Spies R. B., Andresen B. D. & Rice D. W. (1987). Benzthiazoles in Estuarine Sediments as Indicators of Street Runoff. *Nature* 327(6124): 697-699.

**Syracuse Research Corporation** (2005). Physical Properties Database (PHYSPROP), <u>http://www.syrres.com/esc/physprop.htm</u>.

**Stierle A. A., Cardellina J. H. & Singleton F. L.** (1991). Benzothiazoles from a Putative Bacterial Symbiont of the Marine Sponge *Tedania-Ignis*. *Tetrahedron Letters* 32(37): 4847-4848.

Streitwieser A., Heathcock C. H. & Kosower E. M. (1994). Organische Chemie. VCH, Weinheim. 1374pp.

**Stueber M.** (2005). Vorkommen und Verhalten von Naphthalinsulfonaten in der biologischen Abwasserbehandlung. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin.

**Stueber M. & Reemtsma T.** (2004). Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4): 910-916.

**Thomas K. V., McHugh M. & Waldock M.** (2002). Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Science of the Total Environment* 293(1-3): 117-127.

**Thomson B. A. & Iribarne J. V.** (1979). Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure. *Journal of Chemical Physics* 71(11): 4451-4463.

**Towns A. D.** (1999). Developments in azo disperse dyes derived from heterocyclic diazo components. *Dyes and Pigments* 42(1): 3-28.

**Tswett M. S.** (1906 a). Adsorption Analyse und Chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 24: 384.

**Tswett M. S.** (1906 b). Physikalische-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 24: 316-323. **Van Agteren M., Keuning S. & Janssen B.** (1998). Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds. *Volume 2: Environment & Chemistry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 504pp.

Vermont Safty Information Resources, Inc. (2004). SIRI MSDS Index, http://siri.org.

**Voyksner R. D.** (1997). Combining Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications*. Cole R. B. (Ed.) Wiley-Interscience, New York. 323-341.

Wallnöfer P., Tillmanns G., Thomas R., Wünsche C., Kurz J. & Jarczyk H. J. (1976). Mikrobieller Abbau des Herbizids Methabenzthiazuron und Identifizierung der Metaboliten. *Chemosphere* (5): 377-382.

**Wang G. & Cole R. B.** (1997). Solution, Gas-Phase, and Instrumental Parameter Influences on Charge-State Distributions in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation & Applications*. Cole R. B. (Ed.) Wiley-Interscience, New York. 137-174.

**Warner J. S., Engel T. M. & Mondron P. J.** (1985). *Determination of MBTS and TCMTB in industrial and municipal Wastewaters*. Environmental Monitoring and Support Laboratory, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, USA. 45pp.

**Yuwen Z., Xiaoying Z. & Xingpo L.** (2003). Status and Planning Layout of Beijing Municipal Wastewater Treatment Plants. Deutsch-Chinesisch-Polnisches Symposium in Umweltschutztechnik, Stuttgart, Germany, Fachhochschule Stuttgart - Hochschule für Technik.

**Zeng E. Y., Tran K. & Young D.** (2004). Evaluation of potential molecular markers for urban stormwater runoff. *Environmental Monitoring and Assessment* 90(1-3): 23-43.

**Zuehlke S., Duennbier U., Lesjean B., Gnirss R. & Buisson H.** (2003). Long Term Comparison of Trace Organics Removal Perfomaces between Conventional and Membrad Activated Sludge Processes. Conference Proceedings of the WEFTEC, Los Angeles, USA.

## Anhang

## 11 Weitere Verzeichnisse

## 11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Verhalten und Entfernung unpolarer organischer Stoffe im Wasserkreislauf (Abbildung nach einer Vorlage aus einer Präsentation von Thorsten Reemtsma 2004)
Abbildung 1-2: Verhalten polarer organischer Stoffe im Wasserkreislauf (Abb. nach einer Vorlage aus einer Präsentation von Thorsten Reemtsma 2004)
Abbildung 3-1: Grundstruktur der Benzothiazole
Abbildung 3-2: Hauptreaktionen bei der Vulkanisation von Gummi beim Einsatz von MBT-Derivaten als Beschleuniger
Abbildung 3-3: Darstellung der Polarität und der Acidität von sechs Benzothiazolen
Abbildung 3-4: Schema zum biologischen Abbau organischer Stoffe
Abbildung 3-5: Mikrobielle Metabolisierung von Benzol unter aeroben Bedingungen
Abbildung 3-6: Mögliche Transformationen von Benzothiazolen bei Inkubation mit Mischschlamm
Abbildung 3-7: Biotransformation von Benzothiazolen in der Umwelt
Abbildung 3-8: Konvergierender Metabolisierungspfad dreier Benzothiazole
Abbildung 4-1: Dotierschema zur differenzierten Untersuchung von SPE-Wiederfindung und Matrixeffekten 33
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Schlämme, die in einer Kläranlage anfallen
Abbildung 5-1: Durchbruch von BTSA bei der Extraktion aus Leitungswasser und Klarlauf über die Festphasen Oasis HLB und StrataX
Abbildung 5-2: Durchbruchskurven von sechs Benzothiazolen bei Extraktion über Oasis HLB
Abbildung 5-3: Elutionsprofile von MTBT bei Extraktion über <i>Oasis HLB</i> und Elution mit MeOH bzw. Gemischen von MeOH/Aceton. 47
Abbildung 5-4: Oxidation von MBT zum Disulfid MBTS 47
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen         Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten.         48         Abbildung 5-6: Wirkung von GSH auf MBT in Realproben.         50         Abbildung 5-7: Differenzierte Betrachtung von Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung.         52
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen         Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten.         48         Abbildung 5-6: Wirkung von GSH auf MBT in Realproben.         50         Abbildung 5-7: Differenzierte Betrachtung von Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung.         52         Abbildung 5-8: Schematische Darstellung der Electrospray-Ionisierung.
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen         Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten.         48         Abbildung 5-6: Wirkung von GSH auf MBT in Realproben.         50         Abbildung 5-7: Differenzierte Betrachtung von Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung.         52         Abbildung 5-8: Schematische Darstellung der Electrospray-Ionisierung.         54         Abbildung 5-9: Änderung des Response von sechs Benzothiazolen bei Untersuchung von Standardlösungen und Reduzierung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes.
Abbildung 5-5: Konzentrationen von MBT-Lösungen nach dreitägiger Inkubation bei unterschiedlichen         Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten.         48         Abbildung 5-6: Wirkung von GSH auf MBT in Realproben.         50         Abbildung 5-7: Differenzierte Betrachtung von Matrixeffekten und SPE-Wiederfindung.         52         Abbildung 5-8: Schematische Darstellung der Electrospray-Ionisierung.         54         Abbildung 5-9: Änderung des Response von sechs Benzothiazolen bei Untersuchung von Standardlösungen und Reduzierung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes.         56         Abbildung 5-10: Änderung des Response von sechs Benzothiazolen bei Untersuchung von Klarlauf und Rohabwasser und Reduzierung des der ESI-Quelle zugeführten Volumenstromes.

Abbildung 5-12: Mittelwert und Variabilität des Response von sechs Benzothiazolen in zwei unterschiedlichen Matrices
Abbildung 5-13: Box-Plot-Diagramme zur Darstellung der Variabilität des Instrumentellen Detektionslimits (IDL). 63
Abbildung 6-1: Struktur des Ringöffnungsproduktes im Abbau von OHBT
Abbildung 6-2: Scan-Chromatorgramm einer Probe nach 123 h Inkubation aus dem Abbau von OHBT mit <i>N-120-8</i> (Ionenpaarchromatographie)
Abbildung 6-3: <b>Scan</b> -Spektrum des Peaks bei Rt = 7,12 min aus Abbildung 6-2
Abbildung 6-4: Fragmentionen im Tochterionenspektrum von <i>m</i> /z 214 bei hoher Kollisionsenergie (20 V) 69
Abbildung 6-5: Intermediate in der Metabolisierung von BT und OHBT mit Rhodococcus pyridinovorans PA 69
Abbildung 6-6: Spektren der Peaks bei Rt = 6,11 min (links) und Rt = 8,68 min (rechts) aus dem scan-MS- Chromatogramm der Inkubationsprobe 123 h (Abbildung 6-2)
Abbildung 6-7: Metabolisierungspfad des Abbaus von MBT durch Rhodococcus rhodochrous OBT18
Abbildung 6-8: MS-Chromatogramme von Proben aus der Inkubation von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous</i> <i>OBT18</i> 72
Abbildung 6-9: Tochterionenspektren der mittels ESI-MS bestimmten Metabolite von MBT beim Abbau mit <i>Rhodococcus rhodochrous OBT18</i>
Abbildung 6-10: Verlauf der Konzentrationen von MBT, sowie zwei identifizierten und einem nicht identifizierten Intermediat bei der Inkubation von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous OBT18</i>
Abbildung 6-11: Chromatogramme der unbekannten Metabolite M4 <sub>MBT</sub> und M5 <sub>MBT</sub> im Abbau von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous OBT18</i> 76
Abbildung 6-12: Tochterionenspektrum von M4 <sub>MBT</sub> ( <i>m/z</i> 280) aus dem Abbau von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous OBT18</i>
Abbildung 6-13: Scan-TIC-Chromatogramm nach Ionenpaar-Chromatographie (IP) einer Probe ("24 h") aus dem Abbau von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous OBT18</i>
Abbildung 6-14: Tochterionenspektrum von M5 <sub>MBT</sub> aus dem Abbau von MBT mit <i>Rhodococcus rhodochrous</i> <i>OBT18</i>
Abbildung 7-1: Gesamtkonzentration der sechs Benzothiazole BTSA, MBT, OHBT, ABT, BT und MTBT in Zulauf der Kläranlage Ruhleben
Abbildung 7-2: Box-Plot-Diagramme der Konzentration von 6 Benzothiazolen im Zulauf der Kläranlage Ruhleben. 80
Abbildung 7-3: Mittlere Anteile (in %) einzelner Benzothiazole bezogen auf die Gesamtmenge in Klarlauf von drei Kläranlagen
Abbildung 7-4: Zu- bzw. Abnahme der Konzentration von Benzothiazolen bei der kommunalen Abwasserklärung mit Belebtschlamm. 85
Abbildung 7-5: Zeitreihe der Konzentration von MBT im Zulauf und der Konzentrationszunahme von MTBT während der Abwasserbehandlung
Abbildung 7-6: Elimination von Benzothiazolen durch Abwasserbehandlung mittels CAS bzw. MBR
Abbildung 7-7: Elimination von vier Benzothiazolen mittels CAS und anschließender Flockung und Adsorption an GAC
Abbildung 8-1: Konzentration von Benzothiazolen entlang des Nordgrabens

Abbildung 8-2: Konzentration von Benzothiazolen in Straßenablauf.	97
Abbildung 8-3: Gesamtkonzentration von sechs Benzothiazolen im Zulauf zur Kläranlage Ruhleben und Regenereignisse in Berlin während desselben Zeitraums	99
Abbildung 8-4: Standard-Addition von MTBT in Wasser (Quadrate) und MeOH/Aceton-Extrakt aus Mischschla (Kreise)	amm . 101
Abbildung 13-1: Std-Add-Diagramme zur Differenzierung zwischen Matrixeffekten und möglichen SPE- Wiederfindungsverlusten	X
Abbildung 13-2: MS-scan-Spektren aus der Inkubation von MBT mit Rhodococcus rhodochrous OBT18	XXIV

Abbildung 13-3: Standard-Additions-Geraden für BT, MTBT und MBT von Extrakten von MBR-Schlamm (links) und der reinen Dotierlösungen (entsprechend mit Wasser verdünnt) und Blindwert-Extrakte (rechts)......XXXII

## 11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Benzothiazolische Vulkanisationsbeschleuniger und zwei in Formulierungen von Beschleunigern         enthaltene Nebenprodukte.         7
Tabelle 3-2: Werte für p $K_a$ , p $K_b$ und log $K_{OW}$ für sechs Benzothiazole
Tabelle 3-3: Einteilung der Befunde über die Abbaubarkeit von Benzothiazolen bei Inkubation mit Mischkulturen.
Tabelle 3-4: Isolate benzothiazolabbauender Mikroorganismen
Tabelle 4-1: Extraktionsprogramm für die Extraktion von Benzothiazolen mit Oasis HLB (200 mg) aus         Probenvolumina von 50-100 mL
Tabelle 4-2: Standardlösungen zur Bestimmung der IDL
Tabelle 5-1: MS-Parameter für die Detektion von sechs Benzothiazolen
Tabelle 5-2 Mittlere Bestimmungsgrenzen der Analyse von Benzothiazolen mittels SPE LC-ESI-MS/MS
Tabelle 6-1: Metabolite im Abbau von MBT
Tabelle 7-1: Mittlere Konzentrationen von Benzothiazolen und mittlerer DOC-Gehalt im Zulauf ( <i>raw</i> ) von kommunalen Kläranlagen in Berlin Ruhleben ( <i>Ruhl1</i> und <i>Ruhl2</i> ) und in GaoBeiDian ( <i>Beij</i> ) in Beijing/China 81
Tabelle 7-2: Benzothiazolgehalte von sechs Benzothiazolen in Klarlauf (CAS) von drei Klärwerken
Tabelle 7-3: Mittlere Änderung der Benzothiazolkonzentration von sechs Benzothiazolen während der         Abwasserbehandlung in Berlin Ruhleben ( <i>Ruhl</i> ) mittels CAS bzw. MBR.
Tabelle 7-4: Benzothiazolkonzentrationen von sechs Benzothiazolen in Permeat zweier Membranbioreaktoren. 89
Tabelle 7-5: Benzothiazolgehalte von sechs Benzothiazolen in Wässern unterschiedlicher Prozessstufen der Kläranlage GaoBeiDian in Beijing/China
Tabelle 8-1: Konzentrationen von Benzothiazolen in Oberflächenablauf/Straßenablauf bzw. Straßenstaub 98
Tabelle 8-2: Konzentrationen von sechs Benzothiazolen in rein häuslichem Abwasser
Tabelle 8-3: Konzentrationen von Benzothiazolen in der wässrigen Phase und von partikulär gebundenen Benzothiazolen
Tabelle 8-4: Verteilungskoeffizient K <sub>D</sub> von sorbierter Konzentration an Belebtschlamm (mol/kg) zu gelöster Konzentration (mol/L) von drei Benzothiazolen
Tabelle 12-1: Strukturen sowie physikalische und chemische Parameter der im negativen ESI-Modus analysierten BenzothiazoleVI
Tabelle 12-2: Strukturen sowie physikalische und chemische Parameter der im positiven ESI-Modus analysierten BenzothiazoleVII
Tabelle 13-1: Peakflächen von MBT nach Festphasenextraktion mit bzw. ohne vorherige GSH-Zugabe verglichen mit einer Standardlösung
Tabelle 13-2: Peakflächen von MBT nach Extraktion mit bzw. ohne GSH-Zugabe aus Zulauf und Ablauf einer KläranlageVIII
Tabelle 13-3: Nominelle Konzentration und detektierte Peakflächen aus der LC-ESI-MS/MS-Analvse von

 I abelle 13-3: Nominelle Konzentration und detektierte Peakflächen aus der LC-ESI-MS/MS-Analyse von

 Standardlösungen (*Std-Lsg*), von Extrakten, die nach der Festphasenextraktion dotierten wurden (*Matrix*) und von

 Extrakten, die durch Dotierung vor der Festphasenextraktion hergestellt wurden (*SPE+Matrix*).

Tabelle 13-4: Geradengleichungen aus den Std-Add-Diagrammen aus Abbildung 13-1 der Form: y = mx+b XI
Tabelle 13-5: Peakflächen aus der Analyse von sechs Benzothiazolen in Reinstwasser, Ablauf und Zulauf einer Kläranlage und Anwendung unterschiedlicher Split-Verhältnisse zur Reduktion des ESI-Flusses
Tabelle 13-6: Konzentrationen der einzelnen Messlösungen (dot0-dot3) der Standard-Additions-Reihen mit Reinstwasser, Ablauf und Zulauf einer Kläranlage aus Tabelle 13-7.
Tabelle 13-7: Flächenwerte aus der Analyse von Standard-Additions-Reihen von sechs Benzothiazolen bei der ESI-MS-Detektion mit und ohne Volumenstromreduzierung durch <i>post-column splitting</i>
Tabelle 13-8: Steigungen der Standard-Additionsgeraden aus den Werten in Tabelle 13-7XIV
Tabelle 13-9: Geradengleichungen (y = mx+b) der Standard-Additions-Geraden von sechs Benzothiazolen in zwei unterschiedlichen MatricesXV
Tabelle 13-10: Grubbs-Test zur Ermittlung von Ausreißern: Berechnungsformel für PW und EntscheidungskriteriumXVI
Tabelle 13-11: Datentabelle und Berechnung des IDL für ABTXVI
Tabelle 13-12: Datentabelle und Berechnung des IDL für BTXVII
Tabelle 13-13: Datentabelle und Berechnung des IDL für MTBTXVII
Tabelle 13-14: Datentabelle und Berechnung des IDL für BTSAXVIII
Tabelle 13-15: Datentabelle und Berechnung des IDL für MBTXVIII
Tabelle 13-16: Datentabelle und Berechnung des IDL für OHBTXIX
Tabelle 13-17: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von BTSAXX
Tabelle 13-18: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von MBTXXI
Tabelle 13-19: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von OHBTXXI
Tabelle 13-20: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von ABTXXII
Tabelle 13-21: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von BTXXII
Tabelle 13-22: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von MTBTXXIII
Tabelle 13-23: Konzentrationen von Benzothiazolen im Zulauf von kommunalen Kläranlagen
Tabelle 13-24: Benzothiazolgehalte [µg/L] im Ablauf von drei KlärwerkenXXV
Tabelle 13-25: Benzothiazolkonzentrationen im Permeat zweier Membranbioreaktoren XXVI
Tabelle 13-26: Konzentrationen [µg/L] von sechs Benzothiazolen im Nordgraben
Tabelle 13-27: Benzothiazolkonzentrationen in Straßenablauf
Tabelle 13-28: Konzentration [µg/L] von Benzothiazolen in rein häuslichem Abwasser
Tabelle 13-29: Haushaltprodukte, die auf Benzothiazole untersucht wurden:
Tabelle 13-30: Extraktion von Schlamm aus der biologischen Abwasserbehandlung XXXI
Tabelle 13-31: In 50 µL Dotierlösung (dot1, dot2, dot2) enthaltene Menge Benzothiazol [ng] XXXII
Tabelle 13-32: Geradengleichungen der Standard-Additions-Geraden aus Abbildung 13-3 und Berechung der         Benzothiazolkonzentration.         XXXIII

## 12 Strukturformeln / Stoffparameter

Tabelle 12-1: Strukturen sowie physikalische und chemische Parameter der im negativen ESI-Modus analysierten Benzothiazole.

	2-Benzothiazol- sulfonsäure		2-Mercapto- benzothiazol		2-Hydroxy- benzothiazol	
	N S	·SO <sub>3</sub> Н	N S	—SH	N S	— ОН
Acronym	BTSA		MBT		OHBT	
Molekülmasse	215,25		167,25		151,19	
CAS Nr.	941-57-1		149-30-4		934-34-9	
Schmelzpunkt [°C]			181	[1]	139	[1]
Siedepunkt [°C]			260 (Zersetzung)	[2]	360	[3]
Löslichkeit in Wasser [mg/L]			117 (25 °C; pH7)	[4]	2350 (25 °C, est)	[3]
рK <sub>a</sub>			9,80 +/-0,2 (calc) 6,94 +/-0,05 7,03	[5] [6] [4]	10,41 +/-0,2 (calc)	[5]
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> berechnet für das undissoziierte, ungeladene Molekül	1,670 +/-0,659	[5]	2,377 +/-0,745	[5]	1,76 +/-0,205	[5]
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> berechnet für pH 7	-2,34	[5]	2,38	[5]	1,76	[5]
weitere recherchierte Log P <sub>ow</sub>	-0,99 (calc)	[7]	2,41 2,84 (calc) 1,61 (exp) 2,42 (exp)	[8] [4] [4] [2;3;4]	1,76 (exp)	[3]
Dampfdruck [mbar] (bei °C)			0,62*10e-3 (25 °C; est) 2,98*10e-8 (20 °C; calc)	[3] [4]	3,4*10e-5 (25 °C; est)	[3]

[1] (CRC 1999); [2] (Merck KGaA 2005); [3] (SRC 2005); [4] (BUA 1991); [5] (CAS database 2002); [6] (Malouki et al. 2004); [7] (Brownlee et al. 1992).

	2-Amino- benzothiazol		Benzothiazol		2-Methylthio- benzothiazol	
	₩ S	-NH <sub>2</sub>	S S	>	N S	—СН <sub>3</sub>
Acronym	ABT		BT		МТВТ	
Molekülmasse	150,2		135,19		181,28	
CAS Nr.	136-95-8		95-16-9		615-22-5	
Schmelzpunkt [°C]	132	[1]	2	[1]	44	[2]
Siedepunkt [°C]	not listed	[2;3]	231 (1013 mbar)	[1;4]	177 (29 mbar)	[5]
Löslichkeit in Wasser [mg/L]	310	[2]	4300 (25 °C, exp)	[2]	125 (24 °C, exp)	[2]
pK₀	6,53 +/-0,2 (calc)	[5]	11,56 +/-0,20 (calc)	[5]	11,39 +/-0,20 (calc)	[5]
log P <sub>ow</sub> berechnet für das undissoziierte, ungeladene Molekül	1,892 +/-0,566	[5]	2,01 +/-0,297	[5]	3,10 +/-0,194	[5]
Log P <sub>ow</sub> berechnet für pH 7	2,01	[5]	2,01	[5]	3,1	[5]
weitere recherchierte Log P <sub>ow</sub>	2,00 (exp) 2,00 (est)	[2] [2]	2,01 (exp) 1,99	[2;3] [6]	3,15 (exp) 3,1	[7] [6]
Dampfdruck [mbar] (bei °C)	1,5*10e-4 (25 °C; est)	[2]	0,13 (20 °C) 0,95 (50 °C) 45 (131 °C)	[3] [3] [4;8;9]	0,35*10e-3 (25 °C; est)	[2]

Tabelle 12-2: Strukturen sowie physikalische und chemische Parameter der im positiven ESI-Modus analysierten Benzothiazole.

[1] (CRC 1999); [2] (SRC 2005); [3] (Merck KGaA 2005); [4] (Fisher Scientific Company 2004); [5] (CAS database 2002);
 [6] (Brownlee et al. 1992); [7] (Platford 1983); [8] (Reemtsma 2000); [9] (Sigma-Aldrich 2005).

## 13 Ergänzende Tabellen und Abbildungen

### 13.1 Prävention von MBT-Oxidation mit Glutathion (GSH)

#### Extraktion von MBT aus Reinstwasser

Tabelle 13-1: Peakflächen von MBT nach Festphasenextraktion mit bzw. ohne vorherige GSH-Zugabe verglichen mit einer Standardlösung.

	Peakfläche [AU]	Wiederfindung [%]	Normierung
Std 200 μg/L (Referenzwert)	6799	100	1
SPE ohne GSH	470	7	0,07
	743	11	0,11
SPE mit GSH	3553	52	0,52
	4316	63	0,63

#### Extraktion von MBT aus Zulauf bzw. Ablauf einer Kläranlage

Tabelle 13-2: Peakflächen von MBT nach Extraktion mit bzw. ohne GSH-Zugabe aus Zulauf und Ablauf einer Kläranlage.

Kläranl	agenzulauf		Kläranlagenablauf				
Messung Nr.	Rt [min]	Peakfläche [AU]	Rt Messung Nr. [min]		Peakfläche [AU]		
ohne GSH	_						
BT057_3040	8,22	19	BT058_3194		n.n.		
BT057_3048	8,2	35	BT058_3201		n.n.		
BT057_3054	8,24	76	BT058_3206		n.n.		
BT057_3073	8,27	28	BT058_3217		n.n.		
BT057_3079	8,24	63	BT058_3231	231 n.n.			
mit GSH							
BT057_3041	8,24	736	BT058_3193	8,24	49		
BT057_3049	8,22	1215	BT058_3200	8,25	35		
BT057_3055	8,26	1608	BT058_3205	8,26	398		
BT057_3066	8,25	531	BT058_3234	8,25	59		
BT057_3076	8,24	895	BT058_3235	8,27	726		

n.n.: nicht nachweisbar

Zugabe von GSH vor der SPE bei den Standard-Additions-Reihen *Matrix* und *SPE+Matrix*: 1 mL 0,1 M Lsg; MW(GSH) = 307,33 g/mol; → Zugabe von 30,7 mg/100 mL (Vorlage zur SPE); (im Vial können demnach theoretisch 30,7 mg GSH vorhanden sein; da das Vial auf 2 mL aufgefüllt wurde entspricht dies einer maximalen Konz. von 15 350 µg/mL (!))

Die nachfolgende Tabelle enthält die im Vial vorliegenden nominellen Konzentrationen und die aus den LC-MS-Messungen resultierenden Peakflächen. Die doppelt so hohen nominellen Konzentrationen bei der Reihe *Std-Lsg* werden in den Standard-Additions-Diagrammen ausgeglichen.

Tabelle 13-3: Nominelle Konzentration und detektierte Peakflächen aus der LC-ESI-MS/MS-Analyse von Standardlösungen (*Std-Lsg*), von Extrakten, die nach der Festphasenextraktion dotierten wurden (*Matrix*) und von Extrakten, die durch Dotierung vor der Festphasenextraktion hergestellt wurden (*SPE+Matrix*).

Reihe			ABT		BT	MTBT	BTSA		MBT		OHBT
		ng/mL	Area	ng/mL	Area	Area	Area	ng/mL	Area	ng/mL	Area
Std-Lsg	dot1	2	2063	10	505	1412	356	6	303	60	471
	dot2	10	10490	60	3263	7363	1591	30	2656	300	2060
	dot3	30	33016	180	9411	28985	6197	120	8117	800	5151
Matrix	dot0	0		0		53		0		0	
	dot1	1	842	5	236	553	101	3	219	30	215
	dot2	5	4587	30	1459	2792	761	15	1523	150	984
	dot3	15	10969	90	4195	10643	1939	60	4333	400	2464
SPE+Matrix	dot0	0		0		45		0		0	
	dot1	1	715	5	128	332	86	3	153	30	194
	dot2	5	3650	30	345	1169	694	15	918	150	814
	dot3	15	10877	90	2376	7608	1665	60	2957	400	2027



O SPE-Matrix (Dotierung von Benzothiazolen von der Festphasenextraktion)

Abbildung 13-1: Std-Add-Diagramme zur Differenzierung zwischen Matrixeffekten und möglichen SPE-Wiederfindungsverlusten
		Steigung m (= Response R) [(ng/mL)/AU]	Absolutglied b [ng/mL]	Regressions- Koeffizient R <sup>2</sup>	R(Matrix)/R(Ste	d-Lsg) und R(SPE+Matrix)/R(Std-Lsg)
ABT	Std-Lsg	1109,5	-342,9	0,9998		
	Matrix	707,0	517,1	0,9913	0.64	
	SPE+Matrix	725,3	3,9	0,9999	-,	1,03
BT	Std-Lsg	52,18	45,0	0,9997		
	Matrix	46,40	30,1	0,9997	0.89	
	SPE+Matrix	27,80	-208,9	0,9505	-,	0,60
МТВТ	Std-Lsg	165,49	-1204,5	0,9930		
	Matrix	118,31	-187,0	0.9939	0.71	
	SPE+Matrix	85,06	-369,5	0,9641	- ,	0,72
BTSA	Std-Lsg	35,10	-210,1	0,9922		
	Matrix	21,26	47,9	0,9948	0.61	
	SPE+Matrix	18,14	59,3	0,9974	- , -	0,85
MBT	Std-Lsq	66,39	239,8	0,9906		
	Matrix	69,51	217,8	0,9870	1.05	
	SPE+Matrix	48,13	91,3	0,9956	.,	0,69
ОНВТ	Std-Lsq	6,303	123,6	0,9997		
	Matrix	6.054	50.5	0.9996	0.96	
	SPE+Matrix	4,939	56,9	0,9998	0,00	0,82

Tabelle 13-4: Geradengleichung	en aus den Std-Add-Diagramn	nen aus Abbildung 13-1 de	er Form: $y = mx+b$ .
			3

# 13.3 Reduktion des ESI-Volumenstromes durch *post-column splitting* (PCS)

Tabelle 13-5: Peakflächen aus der Analyse von sechs Benzothiazolen in Reinstwasser, Ablauf und Zulauf einer Kläranlage und Anwendung unterschiedlicher Split-Verhältnisse zur Reduktion des ESI-Flusses.

			Peakflächen [AU]						
Split- Verhältnis	ESI-Fluss [µL/min]	BTSA	MBT	OHBT	ABT	BT	MTBT	- ESI	+ ESI
Analyte (c = 20 µ	ıg/L) in Reinstwa	isser							
no split	500	69	364	23	9591	83	998	4829	4874
split ~2/1	155	82	408	54	7276	238	2724	4839	4884
split ~4/1	92	102	484	59	7976	370	3520	4849	4894
split ~24/1	20	0	110	0	6686	776	7672	4861	4904
Analyte (c = 20 µ	g/L) in Kläranlag	genablauf							
no split	500	182	434	36	8226	83	858	4832	4877
split ~2/1	155	212	592	55	6681	251	2731	4842	4887
split ~4/1	92	231	494	55	6580	369	3300	4852	4897
split ~24/1	20	0	98	0	6789	743	7151	4864	4907
Analyte (c = 20 µ	ıg/L) in Kläranlaç	genzulauf							
no split	500	233	536	37	4624	77	988	4835	4880
split ~2/1	155	223	606	65	5885	246	2625	4845	4890
split ~4/1	92	235	578	58	6219	354	3340	4855	4900
split ~24/1	20	111	242	30	6045	668	6737	4867	4910

		Konzentration [ng/mL]						
	BTSA	OHBT	MBT	ABT	BT	MTBT		
dot0	0	0	0	0	0	0		
dot1	1,00	10,00	0,40	0,10	0,80	1,00		
dot2	6,00	60,00	2,00	0,50	4,00	6,00		
dot3	18,00	180,00	7,00	1,50	14,00	18,00		

Tabelle 13-6: Konzentrationen der einzelnen Messlösungen (dot0-dot3) der Standard-Additions-Reihen mit Reinstwasser, Ablauf und Zulauf einer Kläranlage aus Tabelle 13-7.

Tabelle 13-7: Flächenwerte aus der Analyse von Standard-Additions-Reihen von sechs Benzothiazolen bei der ESI-MS-Detektion mit und ohne Volumenstromreduzierung durch *post-column splitting*.

Sample name	_		Peakfläc	hen [AU]		
	BTSA	OHBT	MBT	ABT	BT	MTBT
UPW_dot0_splitless	1593	2266	3229	107	n.n.	n.n.
UPW_dot1_splitless	110	315	138	653	27	142
UPW_dot2_splitless	691	720	895	1590	73	682
UPW_dot3_splitless	2067	1858	2985	4693	195	1942
NK12_dot0_splitless	411	343	n.n.	70	n.n.	43
NK12_dot1_splitless	383	234	134	349	n.n.	100
NK12_dot2_splitless	1034	765	886	746	9	393
NK12_dot3_splitless	2696	1561	2102	3149	148	1340
DRW11_dot0_splitless	174	140	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
DRW11_dot1_splitless	344	284	101	32	n.n.	22
DRW11_dot2_splitless	902	535	575	157	n.n.	145
DRW11_dot3_splitless	2150	1525	2038	425	n.n.	289
UPW_dot0	n.n	n.n	n.n.	68	n.n.	220
UPW_dot1	100	n.n	98	346	57	774
UPW_dot2	519	254	540	1208	380	3783
UPW_dot3	1677	819	1753	4199	1453	12201
NK12_dot0	247	n.n	n.n.	47	47	626
NK12_dot1	362	149	125	325	118	1195
NK12_dot2	862	266	659	1458	481	5125
NK12_dot3	2175	938	1814	4777	1656	14360
NK7_dot0	224	n.n	n.n.	71	126	611
NK7_dot1	347	150	84	332	154	1511
NK7_dot2	867	391	683	1576	542	5365
NK7_dot3	2212	1006	1813	4651	1721	14945
DRW11_dot0	172	110	n.n.	n.n.	117	477
DRW11_dot1	303	170	115	236	226	1200
DRW11_dot2	826	391	620	1157	615	5068
DRW11_dot3	2316	1147	2089	3828	1725	14103
DRW16_dot0	199	180	n.n.	n.n.	162	472
DRW16_dot1	367	218	101	159	229	1126
DRW16_dot2	883	366	637	1113	579	5000
DRW16_dot3	2209	998	1895	3346	1649	13668

n.n. : nicht nachweibar

splitless flow: 500 µL/min; split flow: 20 µL/min (ABT, BT, MTBT) bzw. 90 µL/min (BTSA, MBT, OHBT)

				Steigungen	[AU/(µg/L)]		
Matrix	splitting?	BTSA	OHBT	MBT	ABT	BT	MTBT
UPW	mit	93,45	4,708	248,81	2757	106,13	669
	ohne	115,03	9,151	428,17	2986	12,6	105,72
NK	mit	106,94	4,817	249,96	3168	115,73	768,087
	ohne	131,09	7,218	285,04	2036	13,9	72,54
DRW	mit	118,88	5,763	297,83	2586	114,1	757,81
	ohne	108,15	7,531	293,27	278,3	n.b.	15,03

Tabelle 13-8: Steigungen der Standard-Additionsgeraden aus den Werten in Tabelle 13-7.

n.b.: nicht bestimmbar splitless flow: 500  $\mu$ L/min; split flow: 20  $\mu$ L/min (ABT, BT, MTBT) bzw. 90  $\mu$ L/min (BTSA, MBT, OHBT)

## 13.4 Quantifizierung durch externe Kalibration in Probenmatrix

	R	ohabwasse	r		Klarlauf	
	m	b	R <sup>2</sup>	m	b	R <sup>2</sup>
	[AU/(ng/L)]	[AU]		[AU/(ng/L)]	[AU]	
BTSA	120,5 95,7 72,6 	10321 7695 6557 	0,9933 0,9999 0,9815 	152,4 148,9 129,8 92,7 131.0	30239 27133 21498 18051	0,974 0,9771 0,9413 0,9967
sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	24,0 24,9			27,4 20,9		
MBT av [AU/(ng/L)]	123,9 106,4 102,0 99,4 107,9	964 1653 1440 828	0,9995 0,9998 0,9896 0,9977	63,29 59,52 55,27 54,79 58,2	640,5 367 811,1 658	0,982 0,992 0,999 0,9337
sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	11,0 10,2			4,0 6,9		
OHBT	5,045 4,724 4,544 3,838	87,4 79 99,6 113,3	0,9966 0,9962 0,9856 0,9948	3,159 2,929 2,767 2,500	31,65 28,47 36,36 27,17	0,9996 1 0,9996 0,9994
sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	4,34 0,51 11,2			0,28 9,8		
ABT	1217 1194 1182 1089	1970 2311 868 1579	0,9987 1 0,9956 0,9952	2525 2275 2161 1946	3338 2430 2162 3156	0,9997 0,9995 0,997 0,9996
sd[AU/(ng/L)] sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	56 4,8			241 10,8		
BT	98,66 91,15 87,22 82,38	2496 5458 4944 5607	0,9999 0,9934 0,9817 0,9937	113,3 103 94,1 93,8	5641 6986 4342 3178	0,9887 0,9992 0,9975 0,9932
av [AU/(ng/L)] sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	86,9 4,4 5,1			101,1 9,2 9,1		
MTBT	846 837 832 822	10173 4220 11551 5298	0,9979 0,9955 0,9973 0,9976	838 773 731 710	44618 27873 44548 34912	0,9897 0,9836 0,9948 0,9959
sd[AU/(ng/L)] sd[AU/(ng/L)] rsd [%]	10 1,2			56 7,4		

Tabelle 13-9: Geradengleichungen (y = mx+b) der Standard-Additions-Geraden von sechs Benzothiazolen in zwei unterschiedlichen Matrices.

#### 13.5 Instrumentelle Bestimmungsgrenze

#### Ausschluss von Ausreißern mit dem Grubbs-Test

Der Grubbs-Test kann bei Datenreihen mit mehr als 3 Datenpunkten, deren Streuung der Normalverteilung unterliegt, angewandt werden. Zur Prüfung, ob es sich bei einem Datenpunkt um einen Ausreißer handelt, wird ein Prüfwert (PW) errechnet: die Differenz des Mittelwertes aller Punkte und des zu prüfenden Datenpunktes (x\*; Datenpunkt mit dem größten Abstand zum arithmetischen Mittel) wird mit der Standardabweichung der Gesamtheit aller Werte ins Verhältnis gesetzt. Der so errechnete PW wird dem entsprechenden Wert der Grubbs-Tabelle (GT<sub>P/n</sub>) (Hillebrand 2000) verglichen. Wenn PW < GT<sub>P/n</sub> handelt es sich bei x\* nach dem Grubbs-Test nicht um einen Ausreißer, wohingegen x\* ein Ausreißer ist, wenn PW ≥ GT<sub>P/n</sub> vorliegt. Bei den Werten der Grubbs-Tabelle handelt es sich um empirisch ermittelte Werte. Diese sind abhängig von der Anzahl der Datenpunkte (n) und der statistischen Sicherheit (P).

Tabelle 13-10: Grubbs-Test zur Ermittlung von Ausreißern: Berechnungsformel für PW und Entscheidungskriterium.

$\frac{ av - x^* }{sd} = PW$	$PW \ge GT_{P/n} \Longrightarrow x^*$ ist Ausreißer $PW < GT_{P/n} \Longrightarrow x^*$ ist kein Ausreißer	av x* sd — PW	arithmetisches Mittel ausreißerverdächtiger Datenpunkt Standardabweichung Prüfwert
		GT P n	relevanter Wert aus Grubbs-Tabelle statistische Sicherheit Anzahl Datenpunkte

Wurde x\* als Ausreißer erkannt, wird dieser aus der Datenreihe eliminiert. Nun wird für den Datenpunkt mit der nun größten Abweichung von av (av und sd neu berechnen) erneut geprüft, ob es sich um einen Ausreißer handelt. Für die unten angeführten Auswertungen wurden als statistische Sicherheit P = 0,95 (also:  $GT_{95/n}$ ) gewählt.

Tabelle 13-11: Datentabelle	und Berechnung	des IDL	für ABT.
Für Abkürzungen s. Tabelle	13-10.		

file #	pg	S/M	calc. [pg]			
	0.C.	3/11	bei S/N = 3	IDL	von <b>ABT</b>	
BT_063_4103	12	3	12,00	Test auf Ausreißer	#1	#2
BT065_3983	120	105	3,43	n	18	17
BT051_2357	36	51	2,12	av	3,31	2,80
BT051_2358	72	107	2,02	sd	2,78	1,79
BT051_2417	36	84	1,29	X*	12,00	6,75
BT051_2418	72	144	1,50	PW	3,129	2,210
BT055_2694	12.5	123	0,30	GT <sub>95/n</sub>	2,50	2,475
BT055_2663	12.5	37	1,01	Ausreißer?	ja	nein
BT056_2750	120	502	0,72			
BT057_3014	60	226	0,80			
BT058_3102	120	129	2,79			
BT059_3250	120	101	3,56			
BT061_3536	60	46	3,91			
BT061_3537	120	91	3,96			
BT068_4637	36	29	3,72			
BT068_4642	36	16	6,75			
BT073_4780	12	8	4,50			
BT073_4781	36	21	5,14			

file #	pg o.c.	S/N	calc. [pg] bei S/N = 3	IDI	von <b>BT</b>	
BT 063 4106	120	3	120,0	Test auf Ausreißer	#1	#2
BT065_3983	480	15	96,0	n	24	23
BT051_2357	36	1,8	60,0	av	82,72	69,24
BT051_2358	72	4,2	51,4	sd	90,26	62,92
BT051_2359	120	4,2	85,7	x*	392,70	222,20
BT051_2360	360	24,1	44,8	PW	3,435	2,431
BT051_2417	36	2,3	47,0	GT <sub>95/n</sub>	2,64	2,624
BT051_2418	72	4,3	50,2	Ausreißer?	Ja	nein
BT051_2419	120	8,8	40,9			
BT055_2694	500	88	17,0			
BT055_2663	500	280	5,4			
BT056_2750	480	84	17,1			
BT057_3014	240	76	9,5			
BT058_3102	480	120	12,0			
BT059_3250	480	13,3	108,3			
BT061_3536	60	3,5	51,4			
BT061_3537	120	5,4	66,7			
BT061_3538	600	8,1	222,2			
BT068_4637	360	4,9	220,4			
BT068_4638	720	5,5	392,7			
BT068_4642	360	6,1	177,0			
BT073_4780	12	1,4	25,7			
BT073_4781	36	4,3	25,1			
BT073_4780	72	5,6	38,6			

Tabelle 13-12: Datentabelle und Berechnung des IDL für BT. Für Abkürzungen s. Tabelle 13-10.

Tabelle 13-13: Datentabelle und Berechnung des IDL für MTBT. Für Abkürzungen s. Tabelle 13-10.

filo #	pg	S/M	calc. [pg]			
IIIC #	0.C.	3/11	bei S/N = 3	IDL \	/on MTBT	
BT_063_4104	36	8	13,50	Test auf Ausreißer	#1	
BT065_3983	600	188	9,57	n	18	
BT051_2357	36	23	4,70	av	7,28	
BT051_2358	72	48	4,50	sd	5,76	
BT055_2694	500	665	2,28	X*	21,18	
BT055_2663	500	789	1,90	PW	2,411	
BT056_2750	600	1200	1,50	GT <sub>95/n</sub>	2,504	
BT057_3014	300	574	1,57	Ausreißer?	nein	
BT058_3102	600	875	2,06			
BT059_3250	600	128	14,06			
BT061_3536	60	33,7	5,34			
BT061_3537	120	58,5	6,15			
BT068_4637	36	6,2	17,42			
BT068_4638	72	10,2	21,18			
BT068_4642	36	14,3	7,55			
BT073_4780	12	9,3	3,87			
BT073_4781	36	16	6,75			
BT073_4780	72	30	7,20			

file #	pg	S/N	calc. [pg]			
	0.C.	6	bei $S/N = 3$	IDL \	on <b>BTSA</b>	
BT_063_4049	72	7	30,86	Test auf Ausreißer	#1	#2
BT065_3936	600	34	52,94	n	30	29
BT051_2439	36	4,9	22,04	av	51,60	41,83
BT051_2440	72	11,5	18,78	sd	81,34	62,35
BT051_2441	120	16,8	21,43	X*	334,88	308,02
BT051_2499	36	4,36	24,77	PW	3,483	4,269
BT051_2500	72	9	24,00	GT <sub>95/n</sub>	2,745	2,730
BT051_2501	120	12,9	27,91	Ausreißer?	ja	ja
BT055_2591	1251	399	9,41			
BT055_2622	1251	575	6,53			
BT056_2750	600	134	13,43			
BT057_3021	300	22,9	39,30	Test auf Ausreißer	#3	#4
BT058_3176	600	129	13,95	n	28	27
BT059_3321	600	96	18,75	av	32,33	26,32
BT061_3659	60	23,6	7,63	sd	36,25	17,72
BT061_3660	120	37	9,73	X*	194,59	75,00
BT068_4462	600	24	75,00	PW	4,477	2,747
BT068_4552	480	4,3	334,88	GT <sub>95/n</sub>	2,714	2,698
BT068_4553	1920	18,7	308,02	Ausreißer?	ja	nein
BT068_4549	480	7,4	194,59			
BT073_4817	12	6,3	5,71			
BT073 4818	36	8,6	12,56			
BT073_4819	72	7,9	27,34			
BT073_4820	120	9,2	39,13			
BT073 4821	360	35	30,86			
BT073_4790	12	4	9,00			
BT073 4791	36	6,4	16,88			
BT073_4792	72	5,1	42,35			
BT073_4793	120	6,7	53,73			
BT073_4794	360	19,1	56,54			

Tabelle 13-14: Datentabelle und Berechnung des IDL für BTSA. Für Abkürzungen s. Tabelle 13-10.

#### Tabelle 13-15: Datentabelle und Berechnung des IDL für MBT. Für Abkürzungen s. Tabelle 13-10.

file #	pg	S/N	calc. [pg]	]		
	0.C.	0,	bei $S/N = 3$	IDL	von <b>MBT</b>	
BT_063_4049	72	8	27,00	Test auf Ausreißer	#1	
BT065_3936	480	62	23,23	n	28	
BT051_2439	36	6,7	16,12	av	84,39	
BT051_2440	72	14	15,43	sd	84,43	
BT051_2441	120	34	10,59	X*	291,89	
BT051_2499	36	7,3	14,79	PW	2,458	
BT051_2500	72	22,6	9,56	GT <sub>95/n</sub>	2,714	
BT051_2501	120	40	9,00	Ausreißer?	nein	
BT055_2591	125,1	50	7,51			
BT055_2622	125,1	46	8,16			
BT056_2750	480	78	18,46			
BT057_3021	240	58,5	12,31			
BT058_3176	480	37,6	38,30			
BT059_3321	480	6,8	211,76			
BT061_3659	60	7,9	22,78			
BT061_3660	120	5,8	62,07			
BT068_4462	360	10,9	99,08			
BT068_4552	36	0,9	120,00			
BT068_4553	72	1,3	166,15			
BT068_4554	216	3,3	196,36			
BT068_4540	36	1,9	56,84			
BT068_4541	72	2,9	74,48			
BT073_4820	120	2,8	128,57			
BT073_4821	360	8,6	125,58			
BT073_4822	720	12,4	174,19			
BT073_4823	1200	20	180,00			
BT073_4794	360	3,7	291,89			
BT073_4795	720	8,9	242,70			

file #	pg o.c.	S/N	calc. [pg] bei S/N = 3	IDL v	on OHBT	
BT_063_4052	720	4	540,0	Test auf Ausreißer	#1	
BT065_3936	600	30	60,0	n	30	
BT051_2439	36	2,3	47,0	av	312,7	
BT051_2441	120	2	180,0	sd	208,2	
BT051_2442	360	3,5	308,6	x*	871,0	
BT051_2443	720	6,8	317,6	PW	2,682	
BT051_2501	120	2,2	163,6	GT <sub>95/n</sub>	2,745	
BT051_2502	360	5,6	192,9	Ausreißer?	nein	
BT051_2503	720	10,6	203,8			
BT055_2591	1251	53	70,8			
BT055_2622	1251	37	101,4			
BT056_2750	600	5,6	321,4			
BT057_3021	300	3,3	272,7			
BT057_3022	1800	33,3	162,2			
BT058_3176	600	6,8	264,7			
BT058_3177	3600	27,4	394,2			
BT059_3321	600	3,6	500,0			
BT059_3322	3600	13,8	782,6			
BT061_3659	60	1,6	112,5			
BT061_3660	120	3	120,0			
BT061_3661	600	10,9	165,1			
BT068_4462	3600	12,4	871,0			
BT068_4552	480	2,4	600,0			
BT068_4553	1920	10,9	528,4			
BT068_4549	480	6,5	221,5			
BT068_4550	1920	20,2	285,1			
BT073_4821	360	3,4	317,6			
BT073_4822	720	3,9	553,8			
BT073_4823	1200	9,6	375,0			
BT073 4794	360	3.1	348,4			

# Tabelle 13-16: Datentabelle und Berechnung des IDL für OHBT. Für Abkürzungen s. Tabelle 13-10.

# 13.6 Detektions- (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) der gesamten Analysenmethode

File #	conc	S/M	calc. cond	c [ng/L] bei		LOD	LOQ	
1 110 #	[ng/L]	0/11	S/N = 3	<i>S/N</i> = 10		[ng/L]	[ng/L]	
Ablauf								
	4405	07	05.4	447.0		007	400.4	
57_3226	1135	97	35,1	117,0	av	30,7	102,4	
57_3223	1375	115	35,9	119,5	sd	8,9	29,6	
57_3233	1211	92	39,5	131,7	n	9	9	
57_3215	456	77	17,8	59,3	Test auf Au	sreißer		
57_3231	1546	210	22,1	73,6	max	45,5		
57_3217	1408	166	25,5	84,8	min	17,8		
57_3225	1395	92	45,5	151,6	max-av	14,8		
57 3222	1303	147	26,6	88,6	av-min	12,9		
57 3213	1406	147	28,7	95,7	X*	45,5		
_					PW	1,661		
					GT <sub>95/n</sub>	2.110		
					Ausreißer?	nein		
Zulauf								
57 3084	1260	45	84,0	280,0	av	51,4	171,2	
57_3078	672	54	37,4	124,5	sd	24,0	79,9	
57_3076	692	25	83,0	276,8	n	10	10	
57 3066	1329	98	40,7	135,6	Test auf Au	sreißer		
57_3074	1162	133	26,2	87,4	max	84,6		
57 3067	2764	98	84.6	282.1	min	26.2		
57 3083	1350	84	48.2	160.7	max-av	33.3		
57 3068	1657	95	52.3	174.4	av-min	25.1		
57 3081	1380	148	28.0	93.3	x*	84.6		
57 3063	1870	193	29,1	96,9	PW	1,388		
			- 1 -	, -	GT	2 176		
					Ausreißer?	nein		

Tabelle 13-17: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von BTSA.

File #	conc [ng/L]	S/N	calc. cono S/N = 3	c [ng/L] bei <i>S/N</i> = 10	LOD LOQ [ng/L] [ng/L]
Ablau					
57_3214	1656	12	4,1	13,6	av 10,4 34,7
57_3226	1135	4	10,9	36,5	sd 5,7 19,0
57_3223	1375	7	10,3	34,3	n 10 10
57_3233	1211	5	19,0	63,5	Test auf Ausreißer
57_3215	456	5	3,9	13,1	max 19,1
57_3231	1546	18	3,2	10,6	min 3,2
57_3217	1408	5	19,1	63,6	max-av 8,7
57_3225	1395	8	11,6	38,7	av-min 7,2
57_3222	1303	6	12,6	41,8	x* 19,1
57_3213	1406	7	9,5	31,7	PW 1,522
					GT <sub>95/n</sub> 2,176
					Ausreißer? nein
Zulauf					
57 3084	224	13	51 7	172 3	av 42.8 142.8
57 3078	184	12	46.1	153 7	sd 77 258
57 3076	166	9	55.3	184.3	n 10 10
57 3066	98	8	36.9	123.0	Test auf Ausreißer
57 3074	157	13	36.2	120.7	max 55.3
57 3067	96	7	41,1	137,2	min 34,1
57 3083	208	17	36.8	122.6	max-av 12.4
57 3068	380	22	51,8	172,7	av-min 8,7
57 3081	125	11	34,1	113,8	x* 55,3
57 3063	204	16	38,3	127,6	PW 1,607
_			-		GT <sub>95/n</sub> 2,176
					Ausreißer? nein

Tabelle 13-18: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von MBT.

Tabelle 13-19: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von OHBT.

File #	conc	S/N	calc. cond	c [ng/L] bei	 	erste Na	äherung	LOD	LOQ
	[ng/L]	0,	S/N = 3	<i>S/N</i> = 10		LOD	LOQ	[ng/L]	[ng/L]
Ablauf									
57 3214	71	2	106	354	av	50	166	40	135
57_3226	32	2,9	33	111	sd	27	91	12	40
57_3223	43	3	43	145	n	7	7	6	6
57_3215	40	4	30	101	1. Test a	uf Ausrei	ßer	2.1	「est
57_3231	34	2	51	171	max	106		57	
57_3225	38	2	57	188	min	27		27	
57_3213	27	3	27	90	max-av	57		16	
					av-min	23		13	
					X*	106		57	
					PW	2,077		1,349	
					GT <sub>95/n</sub>	1,938		1,822	
					Ausreißer?	ja		nein	
<b>-</b>									
Zulaut		10	100						
57_3084	626	10	188	626	av	295	982		
57_3078	518	4	389	1296	sd	83	276		
57_3076	422	4	316	1054	n T	10	10		
57_3066	308	3	308	1025	Test au	t Ausreils	ber		
57_3074	305	5	183	610	max	415			
57_3067	757	12	189	631	min	183			
57_3083	326	3	326	1088	max-av	120			
57_3068	691	5	415	1382	av-min	112			
57_3081	450	4	338	1125	X*	415			
57_3063	492	5	295	984	PW	1,448			
					GT <sub>95/n</sub>	2,176			
					Ausreißer?	nein			

File #	conc	S/N	calc. con	c [ng/L] bei	LOD LOQ
	[ng/L]		S/N = 3	<i>S/N</i> = 10	[ng/L] [ng/L]
A h l = f					
Ablauf			<u> </u>	10.0	
58_3140	26	21	3,7	12,2	av 4,0 13,3
58_3149	16	19	2,6	8,6	sd 1,1 3,7
58_3152	18	13	4,3	14,2	n 10 10
58_3159	17	12	4,4	14,5	Test auf Ausreißer
58_3141	18	10	5,5	18,4	max 6,0
58_3157	24	28	2,6	8,5	min 2,6
58_3143	22	17	4,0	13,2	max-av 2,0
58_3151	22	11	6,0	19,9	av-min 1,4
58_3148	18	16	3,4	11,4	x* 6,0
58_3199	28	24	3,5	11,7	PW 1,783
					GT <sub>95/n</sub> 2,176
					Ausreißer? nein
Zulauf					
57 2986	41	9	13.8	45.9	av 18.5 61.7
57_3001	30	4	22,2	74,1	sd 4,3 14,4
57 2987	65	10	19,6	65.2	n 3 3
-			,		Test auf Ausreißer
					max 22,2
					min 13.8
					max-av 3.7
					av-min 4.7
					x* 13.8
					PW 1.098
					GT <sub>05/0</sub> 1 153
					Ausreißer? nein

Tabelle 13-20: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von ABT.

Tabelle 13-21: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von BT.

Filo #	conc	S/N	calc. cond	c [ng/L] bei		LOD	LOQ		
The #	[ng/L]	3/1	S/N = 3	S/N = 10		[ng/L]	[ng/L]		
Ablauf									
58 3149	231	35	19,8	65,9	av	12,6	41,9		
58_3152	266	39	20,5	68,3	sd	5,8	19,3		
58_3159	263	90	8,8	29,3	n	9	9		
58_3141	203	89	6,8	22,8	Test au	f Ausreiß	Ser		
58_3157	152	133	3,4	11,4	max	20,5			
58_3143	300	54	16,7	55,6	min	3,4			
58_3151	267	68	11,8	39,3	max-av	7,9			
58_3148	205	43	14,3	47,7	av-min	9,1			
58_3199	259	70	11,1	37,0	Х*	3,4			
					PW	1,580			
					GT <sub>95/n</sub>	2,110			
					Ausreißer?	nein			
Zulauf									
57_2996	858	36	71,5	238,4	av	55,7	185,7	44,8	149,3
57_2994	686	58	35,5	118,3	sd	35,2	117,4	13,8	46,0
57_2985	780	77	30,4	101,2	n	9	9	8	8
57_2992	619	56	33,1	110,5	1. Test a	uf Ausre	ißer	2	Гest
57_2986	962	50	57,7	192,4	max	143,1		71,5	
57_3001	781	58	40,4	134,6	min	30,4		30,4	
57_2987	1049	22	143,1	476,9	max-av	87,4		26,7	
57_2999	647	43	45,1	150,5	av-min	25,3		14,4	
57_2982	743	50	44,6	148,6	Х*	143,1		71,5	
					PW	2,481		1,938	
					GT <sub>95/n</sub>	2,110		2,032	
					Ausreißer?	ja		nein	

File #	conc	C/M	calc. cond	c [ng/L] bei		LOD	LOQ		
File #	[ng/L]	5/N	S/N = 3	S/N = 10		[ng/L]	[ng/L]		
Ablauf									
58_3140	334	97	10,3	34,5	av	13,7	45,8		
58_3149	365	60	18,2	60,8	sd	4,2	13,9		
58_3152	315	66	14,3	47,8	n	10	10		
58_3159	251	45	16,7	55,8	Test a	uf Ausreiß	ber		
58_3141	216	51	12,7	42,4	max	21,4			
58_3157	169	63	8,0	26,8	min	8,0			
58_3143	366	81	13,6	45,2	max-av	7,6			
58_3151	385	54	21,4	71,3	av-min	5,7			
58_3148	147	49	9,0	29,9	Х*	21,4			
58_3199	293	67	13,1	43,7	PW	1,833			
					GT <sub>95/n</sub>	2,176			
					Ausreißer?	nein			
Zulauf									
57_3002	304	41	22,2	74,1	av	20,6	68,8	17,9	59,7
57_2996	196	13	45,2	150,7	sd	9,0	29,9	2,6	8,7
57_2994	185	27	20,6	68,6	n	10	10	9	9
57_2985	140	24	17,4	58,2	1. Test	auf Ausre	ßer	2. 1	est
57_2992	157	31	15,2	50,6	max	45,2		22,2	
57_2986	286	48	17,9	59,6	min	15,2		15,2	
57_3001	175	32	16,4	54,5	max-av	24,6		4,3	
57_2987	185	27	20,5	68,4	av-min	5,5		2,7	
57_2999	103	20	15,5	51,7	Х*	45,2		22,2	
57_2982	98	19	15,5	51,8	PW	2,738		1,66	
—					GT <sub>95/n</sub>	2,176		2,110	
					Ausreißer?	ja		nein	

Tabelle 13-22: Berechnung von Detektionslimit (LOD) und Quantifizierungslimit (LOQ) von MTBT.



#### 13.7 Metabolisierung von MBT

Abbildung 13-2: MS-scan-Spektren aus der Inkubation von MBT mit Rhodococcus rhodochrous OBT18.

# 13.8 Benzothiazolgehalte in unbehandeltem und behandeltem Abwasser

Tabelle 13-23: Konzentrationen von Benzothiazolen im Zulauf von kommunalen Kläranlagen. Angegeben sind Konzentrationen in µg/L, sowie die Anzahl der Proben in denen Gehalte > LOQ, < LOQ und < LOD gemessen wurden. Ist die Probenanzahl, die aus der Tabelle hervorgeht, kleiner als die Gesamtprobenzahl, (n<sub>ges</sub>, Kopfzeile), wurden in den restlichen Proben keine positiven Befunde detektiert.

		<i>Ruhl1-raw</i> (n <sub>ges</sub> = 20)	F (	Ruhl2-raw (n <sub>ges</sub> = 9)	Beij-raw (n <sub>ges</sub> = 3)		
Substanz	av	dol⊃n n <loq n<loq< td=""><td>av</td><td>sq n<lod n<loq n<loq< td=""><td>av sd sd av</td></loq<></loq </lod </td></loq<></loq 	av	sq n <lod n<loq n<loq< td=""><td>av sd sd av</td></loq<></loq </lod 	av sd sd av		
BTSA	1,70	0,75 (20/ / )	1,21	0,20 (9/ / )	4,75 2,69 (3/ / )		
BT	0,85	0,20 (20/ / )	0,74	0,24 (9/ / )	22,87 2,43 (3/ / )		
OHBT	0,50*	0,16 ( / 20/ )	0,16*	(0/ 3/ 1)	2,29* 1,64 (2/ 1 / )		
MTBT	0,17	0,06 (20/ / )	0,44	0,39 (9/ / )	0,53 0,15 (3/ / )		
MBT	0,19*	0,07 (15/ 5/ )	0,02*	(/2/2)	1,12 1,26 (3/ / )		
ABT	0,03*	0,02 ( 1/ 12/ 7)	0,03*	0,02 (1/ 5/ 3)	0,04* < 0,01 ( / 3 / )		
Sum	3,44	0,92	2,60	0,46	31,6 0,45		
DOC [mg/L]	58,1	12,7	n.b.	n.b.	n.b. n.b.		

Physikalische Einheiten generell in µg/L; außer DOC: mg/L

av : Mittelwert (average)

sd : Standardabweichung (standard deviation)

n : Anzahl Proben

n.b. : nicht bestimmt

\* : Mittelwert aus allen Werten (incl. Werte < LOQ bzw. < LOD)

Tabelle 13-24: Benzothiazolgehalte [µg/L] im Ablauf von drei Klärwerken.

Angegeben sind Konzentrationen in µg/L, sowie die Anzahl der Proben in denen Gehalte > LOQ, < LOQ und < LOD gemessen wurden. Ist die Probenanzahl, die aus der Tabelle hervorgeht, kleiner als die Gesamtprobenzahl, (n<sub>ges</sub>, Kopfzeile), wurden in den restlichen Proben keine positiven Befunde detektiert.

	Ruhl1-CAS (n <sub>ges</sub> = 20)	Ruhl2-CAS (n <sub>ges</sub> = 9)	Beij-CAS (n <sub>ges</sub> = 4)	Schö-CAS (n = 1)	
Substanz	OO ⊂OO N-L OO av sd av	QOJ>⊓ N−LOQ av sq n>L	av sd Sd COJ>u	conc 001<⊓	
BTSA	2,10 0,48 (20/ / )	0,99 0,39 (9/ / )	2,25 1,16 (4/ / )	1,76 (1/ / )	
BT	0,55 0,19 (20/ / )	0,28 0,08 (9/ / )	2,26 0,27 (4/ / )	0,07 (1/ / )	
OHBT	0,14 0,08 (7/13/)	0,20 0,06 (9/ / )	1,54 0,66 (4/ / )	0,27 (1/ / )	
MTBT	0,44 0,09 (20/ / )	0,36 0,06 (9/ / )	0,55 0,13 (4/ / )	0,40 (1/ / )	
MBT	0,02 0,03 (3/8/9)	0,01 0,01 ( / 1/ 5)	0,04 0,01 (4/ / )	0,01 (/1/)	
ABT	0,02 < 0,01 (16/ 4/ )	0,02 0,01 (8/ 1/ )	0,02 < 0,01 (4/ / )	0,02 (1/ / )	
Sum	3,27 0,56	1,86 0,32	6,66 2,28	2,54	
DOC [mg/L]	14,0 2,2	n.b. n.b.	n.b. n.b.	n.b.	

Physikalische Einheiten von "av" und "sd" in  $\mu$ g/L; DOC in mg/L

Tabelle 13-25: Benzothiazolkonzentrationen im Permeat zweier Membranbioreaktoren. Angegeben sind Konzentrationen in µg/L, sowie die Anzahl der Proben in denen Gehalte > LOQ, < LOQ und < LOD gemessen wurden. Ist die Probenanzahl, die aus der Tabelle hervorgeht, kleiner als die Gesamtprobenzahl, (n<sub>ges</sub>, Kopfzeile), wurden in den restlichen Proben keine positiven Befunde detektiert.

		<i>Ruhl1-MBR1</i> (n <sub>ges</sub> = 20)	Ruhl2 (n <sub>ges</sub>	- <i>MBR1</i> s = 8)	<i>Ruhl1-MBR2</i> (n <sub>ges</sub> = 20)	Ruhl2-MBR2 (n <sub>ges</sub> = 10)		
substance	av	sd n <loq n<loq n<loq< td=""><td>av sd</td><td>n<lod n<loq n&gt;LOQ</loq </lod </td><td>av sq an sq ar</td><td>QO1&gt;n sq sq n<lod< td=""></lod<></td></loq<></loq </loq 	av sd	n <lod n<loq n&gt;LOQ</loq </lod 	av sq an sq ar	QO1>n sq sq n <lod< td=""></lod<>		
BTSA	1,52	0,40 (20/ / )	1,10 0,29	(8/ / )	1,33 0,26 (20/ / )	1,17 0,25 (10/ / )		
ВТ	0,29	0,07 (20/ / )	0,28 0,05	(8/ / )	0,23 0,09 (20/ / )	0,25 0,05 (10/ / )		
OHBT	0,05	0,02 (/ 9/11)	0,24 0,04	(8/ / )	0,08 0,10 (6/ 2 12)	0,21 0,07 (9/ 1/ )		
MTBT	0,28	0,07 (20/ / )	0,17 0,10	(7/ 1/ )	0,51 0,18 (19/ / 1)	0,32 0,15 (10/ / )		
MBT	0,02	0,01 (1/16/3)	0,01 0,01	(/ 2/ 2)	0,01 0,01 ( / 5/ 15)	< 0,01 < 0,01 ( / / 4)		
ABT	0,02	0,01 (20/ / )	0,01 <0,01	(3/ 5/ )	0,01 < 0,01 (10/ 10/ )	0,02 < 0,01 (2/ 8/ )		
Sum	2,18	0,45	1,80 0,25		2.17 0,38	1,96 0,35		
DOC [mg/L]	11,9	1,57	n.b.		11,8 1,43	n.b.		

Physikalische Einheiten von "av" und "sd" in µg/L; DOC in mg/L

## 13.9 Auftreten von Benzothiazolen im Nordgraben

Proben- bezeichnung	Fließ- kilometer	BTSA	MTBT	OHBT	ABT	MBT	BT	sum
#1_NG1	0,7	1,76	0,40	0,27	0,02	0,01	0,07	2,53
#2_NG2	6,3	1,80	0,39	0,20	0,02	0,01	0,06	2,47
#3_NG3	10,1	2,41	0,48	0,29	0,02	0,01	0,12	3,34
#7_NG7	16,3	1,39	0,32	0,15	0,02	0,02	0,07	1,97
#6_NG6	16,6	2,37	0,43	0,27	0,02	0,01	0,30	3,40
	av [µg/L]	1,99	0,41	0,23	0,02	0,01	0,14	2,79
	sd [µg/L]	0,49	0,07	0,06	0,00	0,01	0,11	0,70
	rsd [%]	25	17	28	17	44	83	25

Tabelle 13-26: Konzentrationen [µg/L] von sechs Benzothiazolen im Nordgraben.

# 13.10 Benzothiazole in Straßenablauf

			Abfluß			Ber	nzothiazo	lkonzenti	rationen	in µg/L		
Probe												
Nr.	Uhrzeit	Minuten	[m <sup>3</sup> ]	[m <sup>3</sup> ges]	[m <sup>3</sup> /h]	ABT	BT	MTBT	BTSA	MBT	OHBT	total
	06:30		2	2								
1	06:40	0	25	27	151	0,4	4,0	1,5	55,6	0,2	12,0	74
2	06:50	10	36	63	215	0,4	3,1	0,6	27,6	0,3	10,0	42
3	07:00	20	57	119	340	0,4	1,4	0,3	33,5	0,2	9,9	46
4	07:10	30	25	145	151	0,3	3,0	0,9	24,6	0,3	7,7	37
5	07:20	40	19	163	113	0,3	1,6	0,3	22,8	0,1	7,5	33
6	07:30	50	19	182	113	0,3	1,6	0,2	16,4	0,1	6,6	25
7	07:40	60	25	208	151	0,2	1,3	0,2	20,9	0,1	6,3	29
8	07:50	70	19	226	113	0,3	1,6	0,2	16,0	0,2	7,2	25
9	08:00	80	19	245	113	0,2	2,2	0,2	14,0	0,1	6,3	23
10	08:10	90	13	258	76	0,3	2,4	0,2	13,2	0,1	6,0	22
11	08:20	100	25	283	151	0,2	1,1	0,2	12,6	0,2	6,0	20
12	08:30	110	13	296	76	0,2	1,5	0,2	15,4	0,1	6,4	24
13	08:40	120	25	321	151	0,2	2,3	0,2	12,8	0,2	6,2	22
14	09:00	140	32	352	94	0,3	2,4	0,2	13,9	0,2	7,0	24
15	09:20	160	44	397	132	0,2	2,1	0,2	12,7	0,2	5,9	21
16	09:40	180	44	441	132	0,2	2,1	0,2	12,5	0,2	5,7	21
17	10:00	200	19	460	57	0,2	2,2	0,2	14,4	0,2	5,9	23
18	10:30	230				0,2	2,2	0,3	11,6	0,1	5,1	19
19	11:00	260				0,2	2,8	0,3	10,6	0,2	5,4	20

### 13.11 Benzothiazole in häuslichem Abwasser

	Probe #	ABT	вт	МТВТ	BTSA	MBT	ОНВТ	sum
	1	0,13	0,81	0,17	0,69		0,56	2,36
4	2	0,01	0,47	0,10	0,86		0,31	1,74
200	3	0,00	0,16	0,03	0,72		0,10	1,02
uar								
Janı	av [µg/L]	0,05	0,48	0,10	0,76		0,32	1,71
-	sd [µg/L]	0,07	0,32	0,07	0,09		0,23	0,67
	rsd [%]	145	67	67	12		72	39
ugust 2004	1 2 3 4 5	0,18 0,04 0,01 0,01 0,03	0,61 0,67 0,45 0,85 1,37	0,07 0,08 0,06 0,06 0,07	0,96 0,58 0,50 1,40 1,17		0,74 0,19 0,16 0,28 0,49	2,55 1,56 1,19 2,60 3,13
Ā	av [µg/L]	0,06	0,79	0,07	0,92		0,37	2,21
	sd [µg/L]	0,07	0,35	0,01	0,38		0,24	1,05
	rsd [%]	127	45	12	42		65	48

Tabelle 13-28: Konzentration [µg/L] von Benzothiazolen in rein häuslichem Abwasser.

## 13.12 Auf Benzothiazole untersuchte Haushaltsprodukte

Tabelle 13-29: Haushaltprodukte, die auf Benzothiazole untersucht wurden:

#	Produkt
1	Sofix - Parkettpflege
2	Sodasan ÖKJ - Geschirr
3	Abli Klarspüler (Akuta)
4	Emsal Bodenplege Laminat (Pflegereiniger und Imprägnierer - Erdal Rex)
5	Frosch Orangen Universalreiniger (Erdal Rex)
6	Henkel Sidolin Streifenfrei "Cristal"
7	Febreze Classic Extra
8	Sagrotan Hygienespüler
9	Pril
10	Frosch Neutralreiniger
11	Calgonit Klarspüler
12	Calgonit Spülmaschinenmittel
13	Frosch Essig WC-Reiniger
14	Fairy von Dawn
15	Luhns Neutralreiniger
16	Sodasan Orangenuniversalreiniger Konzentrat
17	Sodasan Bio-Essigreiniger
18	Allzweck Reiniger Ultra Konzentrat (Lidl) Meeresfrische
19	Frosch Spülmittel
20	Frosch Sodareiniger
21	Frosch Zitronenreiniger
22	Pril
23	Kristall Fenster Hochglanz Konzentrat - S. Frye (Bad Pyrmont)
24	Domol Edelstahlreiniger - Rossmann GmbH (Burgwedel)
25	Clinär WC-Reiniger Gel - Stolberg (Aldi)
26	Scheuermilch - Wittol Chemie GmbH Wittenberg
27	Ajax Allzweckreiniger - Colgate Palmolive GmbH Hamburg
28	AZ70 Allzweckreiniger - tana Werner & Mertz
29	SR13 Allzweckreiniger - tana Werner & Mertz
30	igefa Glasreiniger Bremen
31	Ajax Glasreiniger Colgate Palmolive GmbH Hamburg
32	Prorein Spinnrad Maschinenspülmittel
33	dela Silberreinigungsmittel mit Glanzschutz Rheinbreitbach

#### 13.13 Untersuchung von Klärschlamm auf Benzothiazole

Folgende drei Versuche mit Mischschlamm wurden durchgeführt:

- (a) BT070: Inkubation von Mischschlamm unter aeroben und anaeroben Bedingungen und nach vorheriger Zugaben von HgCl<sub>2</sub>
- (b) BT071: Extraktion von Primärschlamm aus Ruhleben mit MeOH und Aceton (StdAdd; gleicher Schlamm wie in BT070)
- (c) BT075: Extraktion von Schlamm aus MBR-Pilotanlage (p-Three-Projekt) mit MeOH und Aceton (StdAdd)

Tabelle 13-30: Extraktion von Schlamm aus der biologischen Abwasserbehandlung. Detaillierte Darstellung der Extraktion

	BT075					
	Mischschlamm*		Schlamm aus M	BR-Pilotanlage		
	misch			mbr III	mbr IV	
Trockenmassebest ·						
TS [g/L]**	37,5	18,95	19,86	17,76	17,12	
abfiltrierbare TS [g/L]***		17,85	19,47	13,54	16,98	
Versuchsansätze:						
Einsatz Schlamm [mL]	2.5	10	10	10	10	
Masse über TS [mg]	94	190	199	178	171	
Extraktion:	Extraktion des zusar	mmengerollten G	F-Filters im Zent	rifugengläschen	:	
10 mL M MeOH at v	eOH; 10 Min. Ultraschallbad; onehmen und mit 800 $\mu$ L H <sub>2</sub> O ersetzen (Fraktion 1)	5 mL MeOH/Aceton (6/4); 10 Min. Ultraschallbad; 10 Min zentrifugieren; Überstand abnehmen				
5 mL Me Ultrasc	OH zum Filter geben; 10 Min. shallbad; MeOH abnehmen	5 mL MeOH/Aceton (6/4); 10 Min. Ultraschallbad; 10 Min zentrifugieren; Überstand abnehmen				
5 mL Ace Ultrasc	ton zum Filter geben; 10 Min. hallbad; Aceton abnehmen	Überstände vereinigen, 500 µL H₂O zugeben und auf genau 2 mL einengen				
MeOH (prim3) v 8	und Aceton aus (prim2) und ereinigen (Fraktion 2) und mit 00 µL H₂O versetzen	weitere 500 µL H₂O zugeben (➔ Endvolumen 2,5 mL)				
Lösung abzieh Endvo "Minisa	StdAdd mit 450 µL Extrakt + 50 µL H₂O 450 µL Extrakt + 50 µL dot1 450 µL Extrakt + 50 µL dot2 450 µL Extrakt + 50 µL dot3					
500 500 500 restlich	StdAdd mit µL Extrakt + 50 µL dot1 µL Extrakt + 50 µL dot2 µL Extrakt + 50 µL dot3 er Extrakt ohne Zugabe von H <sub>2</sub> O als dot0					

\* : Mischschlamm, aus Primärschlamm (Vorklärung) und Sekundärschlamm (Absetzbecken d. Nachklärung). \*\* : Trockensubstanz (TS): Rückstand nach eindampfen im Tiegel.

\*\*\* : abfiltrierbare Trockenmasse aus Filtration über Glasfaserfilter (GF-Filter) und Trocknung der Filter.

Tabelle 13-31: In 50 µL Dotierlösung (dot1, dot2, dot2) enthaltene Menge Benzothiazol [n	<b>g</b> ].
Lösungen zur Dotierung von Extrakten für das Standard-Additions-Verfahren.	

[ng]	ABT	BT	MTBT	BTSA	MBT	OHBT
dot1	0,1	0,8	1,0	1,0	0,4	10,0
dot2	0,5	4,0	6,0	6,0	2,0	60,0
dot3	1,5	14,0	18,0	18,0	7,0	180,0



Abbildung 13-3: Standard-Additions-Geraden für BT, MTBT und MBT von Extrakten von MBR-Schlamm (links) und der reinen Dotierlösungen (entsprechend mit Wasser verdünnt) und Blindwert-Extrakte (rechts)

y = a*x + b [AU]	а	b	R2	x bei y = 0 Konz. im Vial	Konzentration gebundener Analyte in der Suspension	Konzentration bezogen auf die Schlammtrockenmasse
	[AU/(µg/L)]	[AU]		[µg/L]	[µg/L]	[µg/kg]
ВТ	_					
Schlamm I	78,3	387,0	0,9999	4,22	1,17	65,6
Schlamm II	63,8	461,4	0,9998	6,51	1,81	92,8
Schlamm III	56,3	340,7	0,9991	5,32	1,48	109,2
Schlamm IV	54,3	278,8	0,9991	4,41	1,22	72,1
Mittelwert					1,42	84,9
MTBT	_					
Schlamm I	540	12447	0,997	21,33	5,92	331,9
Schlamm II	418	13054	0,9996	29,51	8,20	420,9
Schlamm III	426	8667	0,9998	18,62	5,17	382,9
Schlamm IV	415	12421	0,9985	28,21	7,83	461,4
Mittelwert					6,78	399,1
MBT	_					
Schlamm I	21,6	93,91	0,997	4,35	1,21	67,7
Schlamm II	18,4	121,01	0,9989	6,58	1,83	93,8
Schlamm III	18,7	63,453	0,9998	3,39	0,94	69,6
Schlamm IV	22,5	98,693	0,9979	4,39	1,22	71,8
Mittelwert					1,30	75,7

Tabelle 13-32: Geradengleichungen der Standard-Additions-Geraden aus Abbildung 13-3 und Berechung der Benzothiazolkonzentration.

Nährmedium zur aeroben, anaeroben und inaktivierten Inkubation der von Schlamm (nach EN ISO 7827 : 1995):

Lösung a)	KH₂PO	48,5 g				
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,75 g				
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	33,4 g				
	NH4CI	0,5 g				
	Salze auf 1000 mL Wasser (pH sollte 7,4 betragen)					
Lösung b)	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	22,5 g	auf 1000 mL Wasser			
Lösung c)	CaCl <sub>2</sub>	27,5 g	auf 1000 mL Wasser			
Lösung d)	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,25 g				
	auf 1000 mL Wasser (Lösung kurz vor Gebrauch ansetzen; Zugabe von einem					
	Tropfen HCl konz. oder 0,4 g EDTA macht diese Lösung haltbarer.					

Für 1 L Nährmedium werden 500 mL Wasser vorgelegt und 10 mL Lösung a) und je 1 mL der Lösungen b), c) und d) zugegeben; mit Wasser auf 1000 mL auffüllen.