

Abschlussbericht

an das



Ministerium für
Umwelt und Naturschutz,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz
des Landes Nordrhein-Westfalen

NRW.

zum Projekt

**„Einträge und Quellen von Tris(2-chlorpropyl)-phosphat und
Tris(2-chlorethyl)-phosphat in Oberflächen- und Abwässern“**

Aktenzeichen IV - 9 – 042 526 vom 29.01.2002

Sachbearbeiter:

Dr. Kai Bester

INFU

Jens Meyer

INFU

Dr. Wolfram Föllmann

Institut für Arbeitsphysiologie

Universität Dortmund

Univ.-Prof. Dr. M. Spittler

Campus Nord

Otto-Hahn-Straße 6

Chemiegebäude C2-06

44221 Dortmund

Tel. (0231) 7554080

e-mail: spittler@infu.uni-dortmund.de

Januar 2004

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
2 Organophosphate in Oberflächenwässern am Beispiel der Ruhr	6
2.1 Einleitung	11
2.2 Analytik	11
2.3 Ergebnisse	11
2.3.1 Halogenierte Flammschutzmittel	11
2.3.2 Nicht-halogenierte Organophosphate	12
2.4 Zusammenfassung	13
3 Organophosphate in Kläranlagen am Beispiel der Kläranlagen in Köln-Stammheim	14
3.1 Einleitung	14
3.2 Analytik	14
3.3 Ergebnisse	14
3.4 Zusammenfassung	15
4 Analysenmethoden	16
4.1 Festphasenextraktion	17
4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion	17
5 Toxikologische Daten	19
5.1 Einleitung	19
5.2 Zytotoxizitätsassay: Neutralrot (NR)-Aufnahme-Assay	19
5.3 Genotoxizitäts-Assay: Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)	20
5.4 Mutagenitätsassay: <i>Salmonella typhimurium</i> Mutagenitätsassay (Ames-Test)	22
5.4.1 Durchführung	23
5.5 Östrogene Aktivität: Rekombinanter Hefeassay	25
5.5.1 Durchführung	26
5.6 Östrogene Aktivität: Stimulierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen	26
5.6.1 Durchführung	27

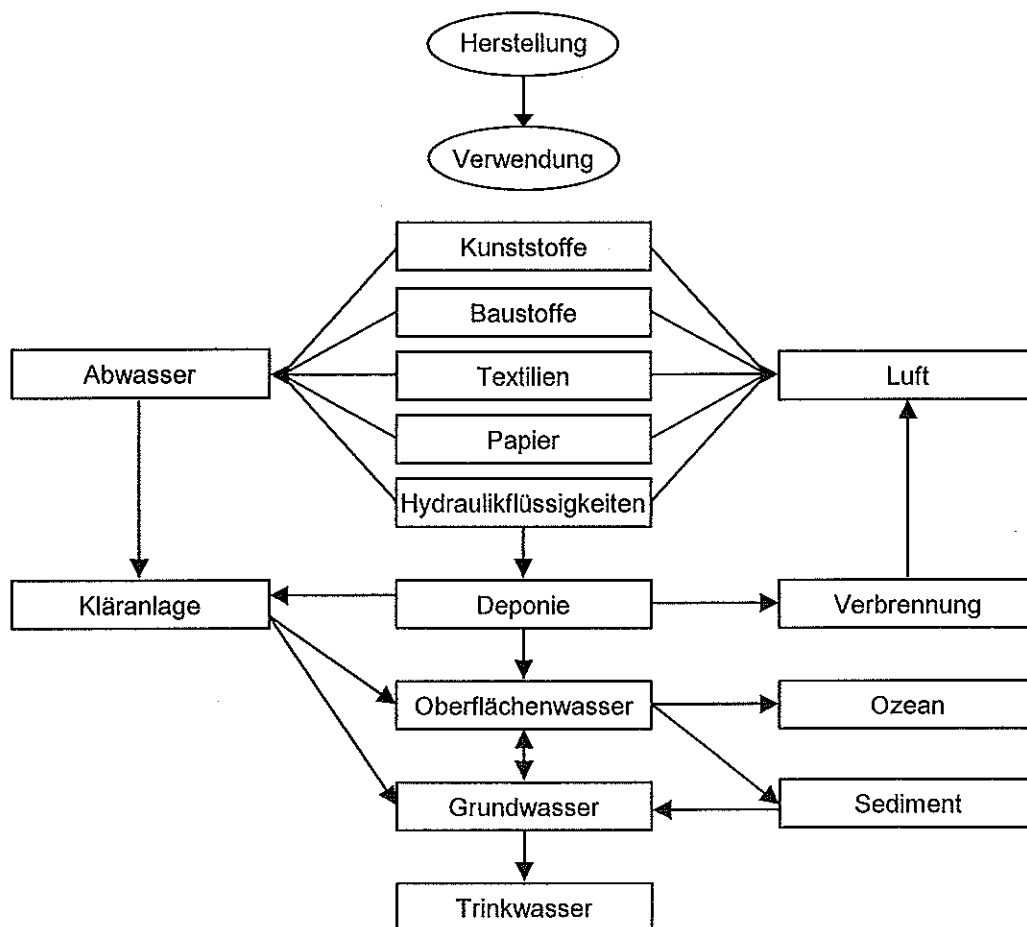
5.7	Ergebnisse	27
5.8	Zusammenfassung	28
6	Gesamtergebnis	30
7	Literatur	32
8	Abbildungen und Tabellen	36
Tabelle 1	Probennahmeorte entlang der Ruhr	36
Tabelle 2	Daten zur Qualitätssicherung	36
Tabelle 3	Übersicht über die Konzentrationen in den Zulaufproben	37
Tabelle 4	Übersicht über die Konzentrationen in den Ablaufproben	38
Tabelle 5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zu- und Ablaufproben	39
Tabelle 6	Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zuläufe von Zwischen- und Nachklärung	39
Tabelle 7	Methodenparameter für die Festphasenextraktion	39
<i>Abbildung 1</i>	<i>Vergleich des Chromatogramms von TCPP aus einer Standard- lösung mit dem Chromatogramm aus einer Wasserprobe</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 2</i>	<i>Vergleich der Chromatogramme von TCPP aus einem Klärwerkszulauf und einem Standard</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 3</i>	<i>Konzentrationen von Tris(2-chlorpropyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 4</i>	<i>Konzentrationen von Tris(chlorethyl)phosphat und Tris(dichlorpropyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 5</i>	<i>Konzentrationen von Tri-n-butylphosphat und Triphenylphosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 6</i>	<i>Konzentrationen von Tri-iso-butylphosphat und Tris(butoxyethyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 7</i>	<i>Graphische Darstellung der mittleren Konzentrationen der Zu- und Ablaufproben</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 8</i>	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TiBP über die gesamte Projektdauer</i>	<i>46</i>

Abbildung 9	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TnBP über die gesamte Projektdauer</i>	47
Abbildung 10	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TCEP über die gesamte Projektdauer</i>	48
Abbildung 11	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TCPP über die gesamte Projektdauer</i>	49
Abbildung 12	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TDCP über die gesamte Projektdauer</i>	50
Abbildung 13	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TBEP über die gesamte Projektdauer</i>	51
Abbildung 14	<i>Graphische Darstellung der Konzentrationen von TPP über die gesamte Projektdauer</i>	52
Abbildung 15	<i>Kartenübersicht der einzelnen Probenahmestellen entlang der Ruhr</i>	53
Abbildung 16	<i>Zytotoxizität von TCPP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem</i>	54
Abbildung 17	<i>Zytotoxizität von TCPP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem</i>	55
Abbildung 18	<i>Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCPP in V79-Zellen Median der Tail-Länge o, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)</i>	56
Abbildung 19	<i>Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCEP in V79-Zellen Median der Tail-Länge o, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)</i>	57
Abbildung 20	<i>Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects</i>	58
Abbildung 21	<i>Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects</i>	59
Abbildung 22	<i>Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects</i>	60
Abbildung 23	<i>Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects</i>	61

<i>Abbildung 24</i>	<i>Östrogene Wirkung von TCPP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 25</i>	<i>Östrogene Wirkung von TCPP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 26</i>	<i>Östrogen Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 27</i>	<i>Östrogene Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 28</i>	<i>Alkalische Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen</i>	<i>66</i>

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden Alkyl- und Arylphosphate weltweit untersucht und nachgewiesen, wie Studien und Veröffentlichungen aus Japan [Otoka et al. 2001; Kawagoshi et al. 1999], Australien [NICNAS 2001], den USA [Aston et al. 1996; Thruston et al. 1991], Schweden [Nilsson et al. 2001; Carlsson et al. 2000], Frankreich [Deroux et al. 1996], den Niederlanden [Stee, van et al. 1999; Hankemeier et al. 1999] und Deutschland [Fries und Püttmann 2001; Prösch et al. 2000; Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe 2000] zeigen. Alkylphosphate, hier insbesondere chlorierte Spezies, und Arylphosphate werden hauptsächlich als Flammschutzmittel in Kunststoffen, Baustoffen, Textilien, Papier, Hydraulikflüssigkeiten, sowie als Weichmacher in Polyurethanschäumen und Kunststoffen verwendet [Hansen et al. 2001; Sagunski et al. 1997; Ingerowski et al. 1997; Leisewitz et al. 2000]. Unten stehende Abbildung veranschaulicht mögliche Eintragungspfade der Analyten in die Umwelt.



Eintragungspfade von Alkyl- und Arylphosphaten in die Umwelt [Grundmann 2000]

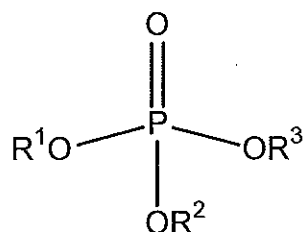
Die Analyten sind mit bis zu 20 Gew - % [Friedle 1999] in den Zielprodukten enthalten. Sie können während der Produktion und nach Fertigstellung der Zielprodukte freigesetzt werden. Sowohl die Freisetzung in die Innenraumluft [Hansen et al. 2001; Nilsson et al. 1997] als auch der Austrag in Abwasser [Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe 2000; Metzger und Mühle 2001] ist nachweisbar. Über das Abwasser können die Analyten in Oberflächen-, Grund- und auch ins Trinkwasser gelangen. Erste Untersuchungen in der Elbe und deren Nebenflüssen bestätigen das Vorkommen der Analyten in schwebstoffbürtigen Sedimenten [Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe].

Das wachsende Interesse an Alkyl- und Arylphosphaten kann auf den steigenden Einsatz dieser Substanzen, insbesondere als Flammschutzmittel, zurückgeführt werden. Allein in Deutschland wurden 1997 rund 95.000 t Flammschutzmittel verwendet. Ca. 15% dieser Menge wird durch halogenierte und nicht halogenierte, organische Phosphatverbindungen repräsentiert. Der internationale Weltmarkt, der 1996 bei geschätzten 800.000 t lag, wird mit rund 38% Verbrauch (ca. 316.000 t) von den USA dominiert, gefolgt von Europa und Asien mit jeweils rund 30% Verbrauch (ca. 255.000 t). Auslöser des stetig steigenden Verbrauchs an Flammschutzmitteln war ein höheres Sicherheitsbedürfnis besonders in öffentlichen Räumen, sowie der Ersatz von früher verwendeten, toxikologisch und ökotoxikologisch bedenklichen Flammschutzmitteln wie z.B. bromierten Substanzen [Ljung 1996]. Für die Zukunft sind die Konzentrationen der Analyten in unterschiedlichen Wässern, sowie deren Quellen bzw. Eintragspfade von besonderem Interesse. Ferner gilt es, die toxische und ökotoxische Wirkung der Analyten zu ermitteln, die zum Großteil noch unzureichend untersucht wurden.

Chlorierte Alkyl- und Arylphosphate finden hauptsächlich als Flammschutzmittel in Kunststoffen, Baustoffen, Textilien, Papier, Hydraulikflüssigkeiten sowie als Weichmacher in Polyurethanschäumen und –kunststoffen Anwendung [Leisewitz et al. 2000a], [Leisewitz et al. 2000b], [Ljung 1996], [Friedle 2001], [Kawagoshi 1996], [Ingerowski 2001]. Die Produkte können bis zu 20% organische Phosphate enthalten.

Der vielfältige Einsatz der Flammschutzmittel führt dazu, dass die organisch substituierten Trisphosphate ubiquitär nachweisbar sind. Für Deutschland liegen für die hessischen Fließgewässer und Kläranlagenabläufe umfangreichere Untersuchungen für die vier Verbindungen Trimethyl-, Triethyl-, Tributyl- und Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) aus den Jahren 1992 und 1994 bis 1996 vor [Fooken, Gühr et al 1997]. Eine Kontamination durch Trimethylphosphat lag nur in einem untersuchten Kläranlagenablauf mit 0,6 µg/l vor (Bestimmungsgrenze: 0,5 µg/l). Triethylphosphat wurde in Konzentrationen <0,1 –0,4 µg/l gefunden. Nur in einem industriellen Kläranlagenablauf wurden einmalig 6 µg/l nachgewiesen. Für Tributylphosphat wurden in der Regel Werte im Bereich < NG und 1 µg/l gefunden. Tris(2-chlorethyl)-phosphat wurde in den untersuchten kommunalen Kläranlagenabläufen mit 0,2-4,7 µg/l gefunden, dagegen in industriellen Kläranlagen mit Spitzenwerten bis 150 µg/l detektiert. In den Fließgewässern lagen die Werte zwischen 0,1-1,3 µg/l. Die Werte, die in Hessen für die vier Verbindungen analysiert wurden, sind vergleichbar mit Werten aus Nordrhein-Westfalen [Fooken, Gühr et al., 1997]. Aus dem Jahr 2001 liegen Werte zu dem Vorkommen verschiedener phosphororganischer Flammschutzmittel in 21 Kläranlagen aus Baden-Württemberg vor [Metzger und Möhle 2001]. Hier wurden vor allem auch Tris(2-chlorethyl)-phosphat (MW 1,9 µg/l), Tris(2-chloro-1-methylethyl)-phosphat (TCPP, MW 2,29 µg/l) und Tris(2-chloro-1-(chloromethyl)-ethyl)-phosphat (TDCEP, MW 0,03 µg/l) detektiert. Bei Kläranlagen mit einem erhöhten industriellen Schmutzwasseranteil wurde Tris(2-butoxyethyl)-phosphat (TBEP), das nicht als Flammschutzmittel sondern als Weichmacher Verwendung findet, in Konzentrationen bis 11,56 µg/l gefunden.

Chemische und physikalische Eigenschaften



Allgemeine Strukturformel für die organisch substituierten Trisphosphate.

- Tri-n-butylphosphat (TBP)	R ¹ , R ² , R ³	- C ₄ H ₉
- Triphenylphosphat (TPP)	R ¹ , R ² , R ³	- C ₆ H ₅
- Tris(2-butoxyethyl)-phosphat (TBEP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH ₂ CH ₂ O(CH ₂) ₃ CH ₃
- Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH ₂ CH ₂ Cl
- Tris (1,3-dichlorisopropyl)-phosphat (TDCP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH(CH ₂ Cl)CH ₂ Cl
- Tris (2-chlorisopropyl)-phosphat (TCPP)	R ¹ , R ² , R ³	- CHCH ₂ ClCH ₃

In unten stehender Tabelle sind die wichtigsten Kenndaten bedeutender Trisphosphate aufgeführt.

Kenndaten zu einigen organisch substituierten Trisphosphaten

	Summenformel	CAS-Nr.	Molare Masse [g/mol]	Siedepunkt [°C]	Log P _{ow} *	Löslichkeit in Wasser
TBP	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P	126-73-8	266,164	180-183°/22mm	3.82	6 g/l (20 °C)
TPP	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	115-86-6	326,07	244 °/10 mm	4.70	1mg/l (25 °C)
TBEP	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P	78-51-3	398,242	215-228°/4mm	3.00	2mg/l (25 °C)
TCEP	C ₆ H ₁₂ Cl ₃ O ₄ P	115-96-8	283,953	192°/10 mm	1.63	0,9 g/l (25 °C)
TDCP	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P	13674-87-8	430,91	236°/5mm	3.65	<0,1g/l (20 °C)
TCPP	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	13674-84-5	327,55	218°	2.89	1,6 g/l (20 °C)

* log P_{ow} berechnet nach [Hansch, 1995]

TBP wird als Lackbestandteil und ebenso wie TPP als Weichmacher von plastischen Massen eingesetzt. TCEP wurde vor allem als Weichmacher und Viskositätsregulator mit flammhemmenden Eigenschaften eingesetzt (Produktblatt Hoechst Reg.-Nr. 6.2.). Zu über 80% wird es als Weichmacher mit flammhemmenden Eigenschaften in Polyurethanen eingesetzt, ebenso wie TDCP.

Heute wird TCEP, welches in Verdacht steht neurotoxisch zu wirken, weitestgehend durch TCPP ersetzt. Polyurethanschaum findet in der Textil-, Bau- und Möbelindustrie und im Innenausbau der Automobilindustrie Verwendung.

TBEP wird nicht als Flammschutzmittel eingesetzt, sondern findet Verwendung als Weichmacher.

Ökotoxikologische Daten phosphororganischer Flammschutzmittel

Organisch substituierte Trisphosphate wirken teilweise schon in geringen Konzentrationen auf aquatische Organismen toxisch [Kuhlmann, 1991]. Dies spiegelt sich in der Einstufung in die Wassergefährdungsklassen wieder, z.B. ist Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) in der Klasse 2 – wassergefährdend – eingestuft. TCEP wird mit 4000 – 5000 t pro Jahr in Deutschland produziert [Weißer et al., 1992]. TCEP ist besonders problematisch, da es eine hohe Langzeitstabilität aufweist.

Zur Wirkung von TCEP auf den Menschen liegen noch keine gesicherten Ergebnisse vor. Die Aufnahme der Triphosphate nach Emission aus Primärquellen kann sowohl inhalativ, oral als auch resorptiv erfolgen. Im Tierexperiment mit Ratten konnten eine krebserzeugende Wirkung und Neurotoxizität von TCEP festgestellt werden [Industrie B.d.c., 1995]. In der Gefahrstoffliste 1998 vom Berufsgenossenschaftlichen Institut für Arbeitssicherheit wird TCEP inzwischen als ein Stoff mit möglicher krebserregender Wirkung und als ein Stoff, der wegen möglicher Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit des Menschen zur Besorgnis Anlass gibt, aufgeführt. Eine toxikologische Bewertung von TCEP liegt als Programm zur Verhütung von Gesundheitsschädigungen durch Arbeitsstoffe von der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie vor [Industrie B.d.c., 1995]. Im Februar 1998 wurde von der SPD im Bundestag ein Antrag (13/10853) gestellt, der das Verbot von TCEP auf EU-Ebene in verbrauchsnahe Produkten fordert.

Triphenylphosphat (TPP) kann zu Atembeschwerden führen und wird als hochgiftig für im Wasser und im Boden lebende Organismen angesehen. TPP wirkt bereits in Konzentrationen, die unterhalb der Wasserlöslichkeit liegen, toxisch. Bereits ab Konzentrationen von 1 mg wirkt TPP tödlich auf Goldfische [Ahrens, 1978]

Eine umfassendere Literaturstudie zum Auftreten und Verhalten von Triarylphosphaten und Trialkylarylphosphaten in Gewässern findet sich im Abschlussbericht an das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen [Möhle, E. 2003].

2 Organophosphate in Oberflächenwässern am Beispiel der Ruhr

2.1 Einleitung

Die Ruhr wurde als Probennahmegebiet ausgewählt, da sie zu einem der bestgeschützten Gewässern Europas zählt und sie die Hauptversorgungsquelle mit Trinkwasser für ca. 7 Millionen Menschen im Ruhrgebiet darstellt. Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob sich bestimmte Eintragsquellen feststellen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Gehalte dieser Verbindungen in Abläufen von Kläranlagen und in Nebenflüssen der Ruhr bestimmt. Eine Aufstellung der Probennahmeorte liefert Tabelle 1. Abbildung 15 zeigt die Probenahmestationen im Ruhrverlauf.

2.2 Analytik

An den einzelnen Probenahmestellen wurden jeweils 1l Proben gezogen und analysiert. Die Probennahme erfolgte Mitte September 2002 in einer Periode ohne Niederschläge. Aufgearbeitet wurden die Proben per Flüssig-Flüssig-Extraktion mit TnBP_{D27} als internem Standard. Anschließend erfolgte die Messung per GC-MS. Da die Wiederfindungsraten für TCEP bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sehr niedrig sind, wurden parallel drei Proben per Festphasenextraktion analysiert. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Die Identifikation der Analyten erfolgt über die Retentionszeit und die Masse m/z des ausgewählten Massenfragments. Tabelle 2 zeigt die Validierungsdaten für die verwendeten Methoden, Abbildung 1 zeigt am Beispiel von TCPD die Identifizierung.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Halogenierte Flammschutzmittel

Die gemessenen Konzentrationen der chlorierten Flammschutzmittel (TCEP, TCPD und TDCP) liegen im unteren ppb-Bereich. Wie erwartet waren die Gehalte in der Nähe der Quelle bei Niedersfeld im Sauerland sehr niedrig. Sie lagen dort bei <12ng/l für TCEP, 4,9ng/l für TCPD und <14ng/l TDCP. Stromab der Ruhr nahmen diese Werte kontinuierlich zu bis zu einem Maximalwert von 80ng/l für TCEP, 140ng/l für TCPD und 60ng/l TDCP. In den Abläufen der beprobten Klärwerke konnten deutlich höhere Konzentrationen ermittelt werden. Hier lagen die Höchstwerte bei

150ng/l für TCEP, 380ng/l für TCPP und 120ng/l für TDCP. Auffällig ist, dass nicht alle beprobten Klärwerke gleichermaßen zu der Belastung der Ruhr mit halogenierten Flammschutzmitteln beitragen. Nur bei zwei Kläranlagen (Hagen und Bochum) konnte eine zusätzliche Verschmutzung der Ruhr festgestellt werden. Die übrigen Kläranlagen scheinen dabei keine Rolle zu spielen. Überraschenderweise tragen Nebenflüsse wie Lenne und Möhne, von denen bisher angenommen wurde, dass sie von Kläranlagen kaum beeinflusst werden, deutlich zur Kontaminierung bei. Dieser Effekt ist am deutlichsten beim TCPP erkennbar, während er beim TCEP bzw. DCP nur schwach ausgeprägt ist (vergleiche Abbildung 3).

2.3.2 Nicht-halogenierte Organophosphate

Die gemessenen Konzentrationen der nicht-halogenierten Organophosphate liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der chlorierten Flammschutzmittel. In der Nähe der Quelle in Niedersfeld wurden folgende Gehalte bestimmt: TiBP <6,3ng/l, TnBP <6,0ng/l, TBEP <6,4ng/l und TPP <5,5ng/l. Diese Gehalte stiegen stromab auf bis zu 100ng/l TnBP, 160ng/l TiBP, 200ng/l TBEP und 40ng/l TPP. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen in den Abläufen von Kläranlagen deutlich höher liegen. Hierbei wurden folgende Werte ermittelt: 110ng/l TnBP, 1900ng/l TiBP, 480ng/l TBEP. Für das TPP liegen die Werte generell niedriger. Hier lag der maximale Gehalt, der in einem Kläranlagenablauf gemessen wurde, bei 22ng/l. Auch bei den nicht halogenierten Organophosphaten zeigt sich, dass Nebenflüsse ebenfalls zur Belastung der Ruhr mit diesen Verbindungen beitragen. Im Unterschied zu den chlorierten Organophosphaten spielen bei der Verschmutzung der Ruhr neben Lenne und Möhne auch noch andere kleinere Nebenflüsse eine Rolle, wie z.B. Henne und Gebke beim TnBP. Hier konnten Gehalte bis 100ng/l festgestellt werden (siehe hierzu auch Abbildung 5 und Abbildung 6).

Bei der Betrachtung der Gehalte für die verschiedenen Flammschutzmittel fällt auf, dass unterschiedliche Kläranlagen auch unterschiedlich zur Belastung der Ruhr mit den verschiedenen Organophosphaten beitragen. Beispielsweise trägt das Klärwerk Bochum-Ölbachtal deutlich zur Belastung der Ruhr mit halogenierten Organophosphaten wie TCPP bei, während es für die Belastung mit den nicht halogenierten Organophosphaten wie TBEP kaum eine Rolle spielt. Hier liegen die

Gehalte in den anderen beprobten Kläranlagenabläufen deutlich höher. Dies deutet darauf hin, dass der Eintrag von den unterschiedlichen Verbindungen eher auf Punktquellen zurückzuführen ist, als auf den diffusen Eintrag durch Verbraucher, wie er z.B. bei Personal Care Produkten gegeben ist.

2.4 Zusammenfassung

Die verschiedenen hier betrachteten halogenierten sowie nicht-halogenierten Organophosphate stellen bedeutende Kontaminanten in den Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens dar. Dies gilt insbesondere auch für besser geschützte Flüsse wie die Ruhr, deren Wasser zur Trinkwassergewinnung genutzt wird. Auch hat sich gezeigt, dass Kläranlagen deutlich zur Belastung beitragen und beim Eintrag dieser Verbindungen wahrscheinlich überwiegend Punktquellen von Bedeutung sind, während der Eintrag von Personal Care Produkten durch Verbraucher im Hintergrund steht.

3 Organophosphate in Kläranlagen am Beispiel der Kläranlagen in Köln-Stammheim

3.1 Einleitung

In der Untersuchung wurde das Großklärwerk Köln-Stammheim über einen Zeitraum von 6 Wochen (16.02.03 – 26.03.03) beprobt. Ziel war es, die Abbauleistung des Klärwerks in Bezug auf die zu untersuchenden Organophosphate zu untersuchen. Im Rahmen der Untersuchung wurden hierzu 11 Proben vom Zu- bzw. Ablauf des Klärwerks gezogen. Das Abwasser in diesem Klärwerk wird in einem zweistufigen biologischen Prozess gereinigt. Neben Proben vom Zu- und Ablauf wurden auch Proben vom Ablauf der Zwischenklärung bzw. der Nachklärung analysiert, um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, auf welcher Stufe des Reinigungsprozesses die Organophosphate eliminiert werden.

3.2 Analytik

Von den Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Extraktion der Organophosphate erfolgte per Festphasenextraktion. Nach einem clean-up über Kieselgel erfolgte die Messung per GC-MS. Die Einzelverbindungen werden anhand der Retentionszeit und dem jeweiligen Massenfragment identifiziert. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Methodenparameter.

Abbildung 2 zeigt am Beispiel von TCPP die Identifizierung.

3.3 Ergebnisse

In allen Proben des Großklärwerks Köln-Stammheim konnten die Flammschutzmittel in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze detektiert werden.

Tabelle 3 und Tabelle 4 geben die ermittelten Werte für die Zu- und Abläufe bzw. für die Zuläufe von Zwischen- und Nachklärung über den Beprobungszeitraum wieder. Um die Eliminierungsraten der einzelnen Organophosphate zu ermitteln, wurden zunächst die mittleren Konzentrationen der Zu- und Abläufe bestimmt (siehe Abbildung 7). Bei Betrachtung der Durchbruchsraten fällt auf, dass ein großer Unterschied in der Abbauleistung des Klärwerks zwischen chlorierten und nicht-chlorierten Organophosphaten besteht. Während die nicht-halogenierten

Flammschutzmittel Durchbruchraten von 12 – 77% bzw. Eliminierungsraten von 88 – 23% ermittelt wurde, wird bei den chlorierten Flammschutzmitteln eine scheinbare Zunahme der Konzentration beobachtet. Vergleicht man jedoch die jeweiligen Maximalwerte von Zu- und Abläufen, stellt man fest, dass die Zulaufkonzentration über bzw. in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die Ablaufkonzentrationen liegen. Dies deutet darauf hin, dass chlorierte Flammschutzmittel bei der Abwasserreinigung nicht eliminiert werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 5.

Wie eingangs erwähnt, wurden auch Proben vom Zulauf der Zwischen- bzw. der Nachklärung auf Organophosphate untersucht. Allgemein lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse aus der Bestimmung der Konzentrationen der Flammschutzmittel in den Zu- bzw. Abläufen bestätigt wird. Auch hier ist eine Eliminierung der chlorierten Organophosphate nicht festzustellen. Bei den nicht-halogenierten Flammschutzmitteln zeigt sich schon eine Eliminierung mit der ersten Reinigungsstufe. Hierbei liegen die Durchbruchraten bei 19 – 39% (Eliminierungsraten von 81 – 61%) für die nicht-halogenierten Flammschutzmittel. Im Vergleich zu den Eliminierungsraten über den Gesamtreinigungsprozess und dem Teilprozess fällt auf, dass die Eliminierungsraten für TiBP und TBEP im Teilprozess leicht über denen des Gesamtprozesses liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Filtration vor der Einleitung des gereinigten Abwassers in den Vorfluter ebenfalls einen Reinigungseffekt aufweist. Eine Zusammenfassung der Daten des Teilreinigungsprozesses liefert Tabelle 6.

3.4 Zusammenfassung

Die Studie hat vor allem gezeigt, dass sich die halogenierten Flammschutzmittel und die nicht-halogenierten Flammschutzmittel beim Klärwerksprozess deutlich voneinander unterscheiden. Während die nicht-halogenierten Organophosphate Eliminierungsraten zwischen 23% und 88% aufweisen, werden die halogenierten Flammschutzmittel nicht aus dem Abwasser entfernt. Auch hat sich gezeigt, dass ein erster Reinigungseffekt bereits auf der ersten Verfahrensstufe zu beobachten ist. Ein zusätzlicher reinigender Effekt der abschließenden Filtration des gereinigten Abwasserstroms lässt sich nur beim TiBP und TBEP feststellen.

4 Analysenmethoden

Mit der vorliegenden Methode werden die folgenden Flammschutzmittel aus Oberflächenwassern bestimmt: Tris(2-chlorpropyl)phosphat (TCPP), Tris(chlorethyl)phosphat (TCEP), Tris(dichlorpropyl)phosphat (TDCP), Tri-isobutylphosphat (TiBP), Tri-n-butylphosphat (TnBP), Tris(butoxyethyl)phosphat (TBEP) und Triphenylphosphat (TPP) erfasst.

Chemikalien: Methanol (suprasolv), Toluol (suprasolv), tert. Butylmethylether (suprasolv), n-Hexan (suprasolv), Aceton (p.a.), Ethylacetat (p.a.) von Merck Darmstadt, Wasser (HPLC grade) von J.T. Baker Griesheim

TDCP, TCPP (technisch) von Akzo Nobel Amersfoort (NL), TnBP (99%), TiBP (97%), TBEP (94%), TPP (98%), TCEP (97%) von Sigma-Aldrich Steinheim, TnBP-d₂₇ (99,7%) und Malathion-d₆ (99,9%) Dr. Ehrensdorfer Augsburg
Kieselgel 60 von Merck Darmstadt, H₂O-Phobic-DVB Festphasenmaterial von J.T. Baker Griesheim

Geräte: GC (Thermoquest Trace 2000), MS (Trace MS), BEST PTV-Injektor, AS 2000-Autosampler von Thermo Finnigan Egelsbach

Säule: DB5-MS von J&W

GC- Bedingungen: 90 °C [2min] → 10 °C/min → 280 °C [15min]

Probenlagerung: Die Proben wurden, sofern sie nicht sofort bearbeitet werden konnten, im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

4.1 Festphasenextraktion

Probenaufbereitung: Die Extraktion der Analyten erfolgt mittels Festphasenextraktion (Divinylbenzol-Festphasenmaterial 500mg) aus 1l Proben mit einem Fluss von 200ml/min. Anschließend werden die Analyten mit 8ml Toluol und tert. Butylmethylether eluiert. Den vereinten organischen Phasen werden 100ng der internen Standards (TnBP-d₂₇ bzw. Malathionl-d₆) zugesetzt. Nach Trocknung der organischen Phase erfolgt ein clean-up über Kieselgel. 1g Kieselgel wird mit n-Hexan konditioniert. Nach Aufgabe der Probe wird mit n-Hexan nachgespült. Die Elution erfolgt mit 8ml Ethylacetat. Nach Einengen der Probe auf 1ml erfolgt die Messung per GC- MS.

Quantifizierung: Die Quantifizierung erfolgt über eine interne Kalibrierung mit TnBP-d₂₇ und Malathion-d₆ als internen Standards.

4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Probenaufbereitung: 1l der Probe wird mit 10ml Toluol und einem Aliquot der internen Standards (jeweils 100ng TnBP-d₂₇ bzw. Malathion-d₆) versetzt und 30min gerührt. Nach Phasentrennung wird die organische Phase abgenommen und getrocknet. Nach Einengen auf 1ml erfolgt die Messung per GC- MS.

Quantifizierung: Die Quantifizierung erfolgt über eine interne Kalibrierung mit TnBP-d₂₇ und Malathion-d₆ als internen Standards.

Beide beschriebenen Methoden eignen sich gleichermaßen zur Bestimmung von Flammschutzmitteln aus Oberflächengewässern. Die Festphasenextraktion ist bei der Bestimmung von TCEP vorzuziehen, da hier die Wiederfindungsraten etwas besser sind (vgl. hierzu auch Tabelle 2 und Tabelle 7).

Auswertung und Berechnung:

Die Kalibrierung liefert folgende Funktion:

$$\frac{C_A}{C_{IS}} = m \frac{Area_A}{Area_{IS}} + b \quad (3.1)$$

C_A und C_{IS} sind dabei bekannt:

$$C_A = M_A \cdot V_A \quad C_{IS} = M_{IS} \cdot V_{IS}$$

Bildung des Quotienten liefert:

$$\frac{C_A}{C_{IS}} = \frac{M_A \cdot V_A}{M_{IS} \cdot V_{IS}} \quad (3.2)$$

Da $V_A = V_{IS}$ gilt: (3.3)

$$\frac{C_A}{C_{IS}} = \frac{M_A}{M_{IS}} \quad (3.3)$$

Gleichung 3.3 in 3.1 liefert:

$$M_A = M_{IS} \left[m \frac{Area_A}{Area_{IS}} + b \right] \quad (3.4)$$

Die Konzentration der Flammschutzmittel im Wasser berechnet sich nach

$$C_W = \frac{M_A}{V_W}$$

mit:

Area_A: Fläche Analyt

Area_{IS}: Fläche interner Standard

C_A: Konzentration Analyt [ng/l]

C_{IS}: Konzentration interner Standard [ng/l]

C_W: Konzentration im Wasser [ng/l]

b: Achsenabschnitt

V_W: Probenvolumen [l]

V_A: Volumen Analyt [ml]

V_{IS}: Volumen interner Standard [ml]

M_A: Menge des Analyten [ng/l]

M_{IS}: Menge Interner Standard [ng/l]

m: Steigung

5 Toxikologische Daten

5.1 Einleitung

Mit Hilfe ausgewählter in-vitro Prüfsysteme wurden zytotoxische, genotoxische und mutagene Effekte sowie mögliche hormonelle Wirkungen von Tris (2-chlorpropyl)-phosphat und Tris (2-chlorethyl)-phosphat untersucht. Diese Daten werden u. a. für eine toxikologische Charakterisierung und Bewertung dieser Substanz benötigt

Zur Ermittlung des zytotoxischen Potentials wurde der Neutralrot-Aufnahme-Assay eingesetzt. Genotoxische Effekte wurden mit Hilfe des Einzelzell-Gelelektrophorese-Assays (Comet-Assay) in Säuger-Zellkulturen untersucht. Mit diesem Test kann eine Induktion von DNA-Strangbrüchen aufgezeigt werden. Ein mögliches mutagenes Potential wurde in einem Bakterien-Testsystemen, dem Salmonella typhimurium Mutagenitätsassay (Ames-Assay) untersucht.

Die Frage, ob die Substanzen eine hormonartigen Wirkung aufweisen, wurde ein Screening auf östrogene/antiöstrogene Effekte mit Reportergensystemen durchgeführt. Ausgehend von den ermittelten Daten wurde eine vorläufige toxikologische Bewertung von Tris (2-chlorpropyl)-phosphat und Tris (2-chlorethyl)-phosphat erstellt.

5.2 Zytotoxizitätsassay: Neutralrot (NR)-Aufnahme-Assay

Der NR-Assay wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Babich und Borenfreund (1992) durchgeführt.

Die verwendeten V79-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie vom Chinesischen Hamster) wurden in 96-Well Mikrotiterplatten (10.000 Zellen pro Well, in Kulturmedium DMEM-Medium mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS) für 48 Stunden kultiviert. Am Versuchstag wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen und mit den in Kulturmedium gelösten Testsubstanzen für 24 Stunden inkubiert. Im Test wurden auch eine Mediumkontrolle (ohne Testsubstanz), eine Lösemittelkontrolle (Medium mit 0,5% DMSO) und eine Wachstumskontrolle (ohne Medium) mitgeführt.

Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, durch Neutralrot-Medium (12,5 µl mit 0,05 % Neutralrot in Kulturmedium pro ml Medium) ersetzt und die Zellen wurden für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde das Neutralrot-Medium abgenommen

und die Zellen 5 x mit warmen PBS (37 °C) gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Fixierlösung (1 % Eisessig, 50 % Ethanol in Aqua bidest.) pro Well zugegeben und die Platten für 20 min auf einem Plattenschüttler bewegt. Es folgte eine Extinktionsbestimmung in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Modell 340 ATC, SLT-Labinstruments) bei einer Wellenlänge von 540 nm. Für die anschließende Proteinbestimmung wurden die Zellen nochmals 5 x mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 10 µl 0,1 % Triton-X-100 in 0,9 % NaCl pro Well lysiert und über Nacht bei -70 °C eingefroren.

Für die Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (PIERCE BCA Protein Assay Reagent), dem die Methode nach Bradford (1976) zugrunde liegt, verwendet. Als Eichstandard dienten BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2 mg/ml und 0,2 mg/ml. In 96-Well Mikrotiterplatten werden 200 µl des Reagenzgemisches A:B (Mischungsverhältnis 50:1) pro Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend auf einem Plattenschüttler für 30 s vorsichtig geschüttelt und anschließend für mindestens 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

5.3 Genotoxizitäts-Assay: Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)

Die Durchführung des Comet -Assay beruht auf der Methode von Singh et al. (1988) und wurde mit V79-Zellen (siehe oben) durchgeführt.

Glasobjektträger wurden vor der Beschichtung für 1 h in eine Diethylether/Ethanol (70%)- Mischung (1:2 v/v) gelegt und danach für 30 min in Ethanol (70 %) entfettet. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie kurz in eine etwa 60 °C heiße normal melting point (NMP) Agaroselösung (1,5%) getaucht, wobei das Beschriftungsfeld etwa bis zur Hälfte benetzt wurde. Die Unterseite der Objektträger wurde abgewischt und die Objektträger in horizontaler Lage bei Raumtemperatur getrocknet. Die so präparierten Objektträger können für mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden.

Für den Einsatz im Comet-Assay wurden die V79-Zellkulturen für 72 h in 6-Well-Platten kultiviert. Für die 3-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Kulturmedium durch FCS-freies Medium, welches die Testsubstanz (gelöst in DMSO, Endkonzentration 0,1%) enthielt, ersetzt. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die Zellsuspension wurde dann bei 50 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem PBS resuspendiert, die Zellzahl auf 2 Mio./ml eingestellt und 20 µl der Zellsuspension wurden in 500 µl low melting point (LMP) Agarose (37 °C) gegeben. Die Agaroselösung wurde auf einen gekühlten, vorbeschichteten Objektträger gebracht und mit einem Deckglas (60 x 40 mm²) abgedeckt. Nach 4-5 min wurden die Deckgläschen seitlich abgezogen und die Objektträger für mindestens 2 h bei 4 °C in Lysepuffer-Gebrauchslösung gestellt.

Lysepuffer Stammlösung:

46,1 g/l NaCl, 37,2 g/l EDTA, 1,2 g/l TRIZMA, 10 g/l (1:10 verdünnt in den Puffer geben) N-Lauroylsarcosyl, 8-12 g/l NaOH, pH 10;

Lysepuffer Gebrauchslösung:

78 ml Lysepuffer Stammlösung, 20 ml DMSO, 2 ml Triton X-100)

Nach der Lyse der Zellen wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest. getaucht und mit der Agaroseschicht nach oben auf die Plattform einer Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer wurde mit 8 °C kaltem Elektrophorese-Puffer (12,0 g/l NaOH, 0,372 g/l Na₂EDTA in Aqua bidest.) gefüllt, so dass die Objektträger ca. 2-3 mm hoch mit Puffer überdeckt waren. Für die Alkalidenaturierung und Entwindung der DNA wurden die Proben für 30 min im Puffer belassen. Um keine UV-induzierten DNA-Schäden zu induzieren, wurden die Alkalidenaturierung und die anschließende Elektrophorese ohne direkten Lichteinfall durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 25 mV, 300 mA und 8 °C.

Die Objektträger kamen nach der Elektrophorese für 15 min in Neutralisationspuffer (0,4 M Tris in Aqua bidest., pH 7,5) und wurden anschließend mit Hilfe einer Ethanolreihe (50%, 75% und 100%, jeweils 5 min) entwässert. Die entwässerten Objektträger können bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Für die Analyse der Zellkerne wurde die DNA mit Ethidiumbromid (EB) (50 µg/ml in Aqua bidest.) angefärbt. Hierzu wurden 50 µl EB auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (DMRB, Leica) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Von jeder Konzentration wurden jeweils 100 Kerne von zwei Objektträgern ausgewertet und zwar nur Kerne, die nicht im Randbereich des Objektträgers lagen, nicht verklumpt waren oder nicht zu dicht nebeneinander lagen. Die Bildanalyse erfolgte mit der Bildanalysesoftware Comet Assay II von Perceptive Instruments, Suffolk, England.

Für die Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (PIERCE BCA Protein Assay Reagent), dem die Methode nach Bradford (1976) zugrunde liegt, verwendet. Als Eichstandard dienten BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2 mg/ml und 0,2 mg/ml. In 96-Well Mikrotiterplatten wurden je 10 µl Zellsuspension jeder Probe in Doppelbestimmung mit 200 µl des Reagenzgemisches A:B (Mischungsverhältnis 50:1) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend auf einem Plattenschüttler für 30 s vorsichtig geschüttelt und anschließend für mindestens 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

5.4 Mutagenitätsassay: *Salmonella typhimurium* Mutagenitätsassay (Ames-Test)

Der Ames-Test, der in diesen Untersuchungen verwendet wird, dient zum Nachweis von Genmutationen und ist für die Abschätzung des mutagenen Potenzials von chemischen Stoffen geeignet (Maron and Ames 1983). Es werden Histidin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium* verwendet, mit deren Hilfe sich chemisch induzierte Basensubstitutions- und Leserastermutationen erfassen lassen. Die Mangelmutanten sind durch eine DNA-Mutation im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, die für die Bakterien lebensnotwendige Aminosäure Histidin zu synthetisieren. Dabei kann die genetische Information für unterschiedliche Enzyme des Histidin-Biosyntheseweges fehlerhaft sein, so dass es verschiedene Stämme von *Salmonella typhimurium* mit einer charakteristischen Histidin-Mangelmutation gibt.

Im Ausgangszustand sind diese Bakterien auf einem Histidin-freien Minimalnährboden nicht überlebensfähig. Durch Zusatz einer mutagenen Chemikalie kann eine Rückmutation zum Wildtyp ausgelöst werden, welche die Bakterien dann in die Lage versetzt, sich auf diesem Nährboden doch zu vermehren und als Kolonie zu wachsen. Diese Bakterienkolonien sind detektierbar und werden als Revertanten bezeichnet. Eine Substanz wird dann als mutagen im Ames-Test bezeichnet, wenn die Revertanzahl gegenüber einer Kontrolle konzentrationsabhängig auf mindestens die doppelte Anzahl angestiegen ist, dieses Ergebnis in einem Stamm auftritt und sich reproduzieren lässt [OECD-4711983, 1997].

Als externes enzymatisches Metabolisierungssystem wird S9-Mix zugegeben, welches verschiedene Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, Cytochrom-P450-Reduktasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, Epoxidhydrolasen, Acetyl-, Sulfo- und Glutathiontransferasen enthält [Andrae 1996].

Bei der Bewertung von 501 Veröffentlichungen, die innerhalb des „Gene-Tox-Programms“ der Vereinigten Staaten von Amerika durchgeführt wurden, konnte der Ames-Test eine Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität mit einer durchschnittlichen Übereinstimmung von 80 % erzielen [Göggelmann 1993]. In bestimmten chemischen Klassen findet man jedoch eine große Zahl von falsch-negativen Ergebnissen, die u.a. auf Unzulänglichkeiten des metabolischen Aktivierungssystems oder auf toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz beruhen können [Göggelmann 1993]. Zudem werden im Ames-Test nur Substanzen erfasst, die Basensubstitutions- oder Leserastermutationen induzieren. Dagegen werden Chemikalien, die Chromosomen- oder Genommutationen verursachen, nicht erkannt.

5.4.1 Durchführung

Für diesen Assay wurden acht verschiedene *Salmonella*-Stämme eingesetzt. Die Stämme TA 1535 und TA 100 detektieren Basensubstitutionen, die Stämme TA 1537, TA 1538 und TA 98 detektieren Leseraster-Mutationen und die Stämme TA 102 und TA 104 reagieren besonders empfindlich auf oxidierend wirkende Mutagene [Marnett 1985].

Es werden 100 µl Salmonellen-Suspension eines Stammes mit einer Zelldichte von 10^7 bis 10^9 KBE/ml 9 h in einer Nährlösung bestehend aus Fleischextrakt, Pepton und NaCl (Nutrient-Bouillon) bei 37 °C im Schüttelwasserbad angezchtet. Am Testtag werden 500 µl Phosphatpuffer oder frisch angesetzter S9-Mix

(Unterscheidung der Untersuchung mit und ohne metabolische Aktivierung), 100 µl der angezüchteten Bakteriensuspension und 100 µl der zu untersuchenden Probe in ein Probengefäß pipettiert. Der Ansatz wird 20 min bei 37 °C im Wasserbad präinkubiert. Anschließend wird der Ansatz in 2 ml Weich-Agar (Top-Agar) gegeben, der in einem Wasserbad bei 42 °C flüssig gehalten wird. Dieser Oberschichtagar enthält Spuren von Histidin und Biotin. Damit wird erreicht, dass die Bakterien sich wenige Male teilen können und sich eine Mutation manifestieren kann. Der Ansatz wird gleichmäßig auf einer Agarplatte mit einem Selektivnährboden (Minimal-Agar-Platte) verteilt. Die Platten werden 72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das im Top-Agar vorhandene Histidin erlaubt den plattierten Bakterien einige Zellteilungen. Dadurch entstehen mikroskopisch kleine Kolonien, die einen milchigen Grauschleier im Plattenhintergrund bilden. Wenn das Histidin verbraucht ist, wachsen nur noch die rückmutierten Bakterien zu sichtbaren Kolonien. Diese können mit einem automatischen Zählgerät ausgewertet werden. Nach der Auswertung wurden die Platten mikroskopiert und der Plattenhintergrund bewertet. Bei einer Erhöhung der Revertanzahl und einem gleichmäßigen Plattenhintergrund ist von einem mutagenen Effekt auszugehen. Ist die Revertanzahl gegenüber der Spontanrate stark erniedrigt und der Plattenhintergrund sehr aufgelockert, liegt ein cytotoxischer Effekt vor und die Bakterien sind vor der ersten Teilung abgestorben. Die Durchführung des Testes ist unten dargestellt.

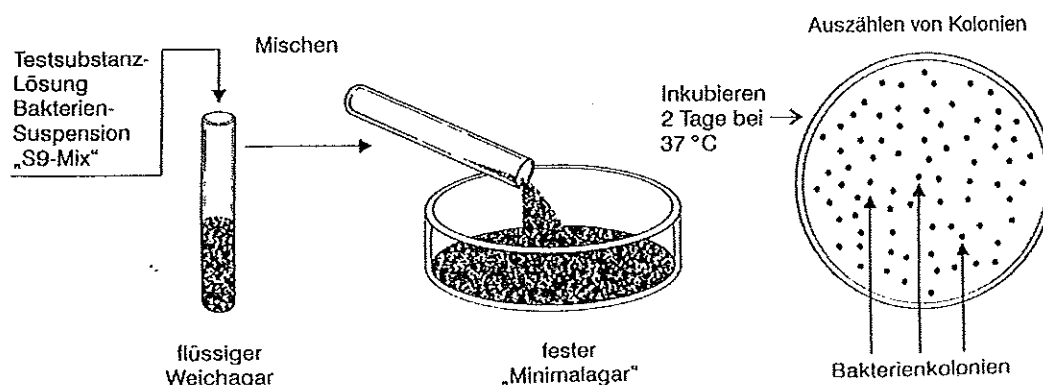


Abbildung: Durchführung des Ames-Testes [Andrae 1996]

Bei jeder Testdurchführung wurden Stammkontrollen sowie Negativ-Kontrollen mit dem verwendeten Lösemittel und Positiv-Kontrollen mit einem Referenzmutagen für

den jeweiligen Stamm anstelle der Probe mitgeführt. Zudem wurde jede Probe pro Stamm dreifach mit einer unabhängigen Testwiederholung getestet.

Tab.: Referenzmutagene für die verwendeten Stämme (± metabolische Aktivierung)

Testprotokoll	Positivkontrolle	Lösemittel	Konzentration
TA 98 und TA 1538 ohne S9	2-Nitrofluoren	DMSO	50 µg/Platte
TA 100 und TA 1535 ohne S9		H ₂ O	20 µg/platte
TA 97a und TA 1537	Aminoacridin	DMSO	50 µg/Platte
TA 102 ohne S9	Mitomycin C	H ₂ O	20 µg/Platte
TA 104 ohne S9	Methylglyoxal	H ₂ O	100 µg/Platte
alle Stämme mit S9	2-Aminoanthracen	DMSO	5 µg/Platte

5.5 Östrogene Aktivität: Rekombinanter Hefeassay

Dieser einfache biologische Screening-Assay ermöglicht es, Substanzen aus der Umwelt auf hormon-ähnliche Effekte hin zu untersuchen (Routledge & Sumpter 1996).

Es können zwei Aspekte untersucht werden:

1. Besitzt eine Probe östrogene bzw. antiöstrogene Aktivität?
2. Wie ist ihre relative Wirkstärke (EC₅₀) im Vergleich zu einer Referenzsubstanz, z. B. 17β-Östradiol?

Des Weiteren kann in Kombination mit Östradiol auch eine mögliche antiöstrogene Aktivität der Testsubstanz untersucht werden.

Den zur Prüfung genutzten Glaxo Era-Hefen wurde durch stabile Transfektion der humane Östrogenrezeptor- α (ER α) und ein Reporter gen, das aus einem Östrogen-responsiven Promotorelement und dem für die β -Galactosidase kodierenden LacZ-Gen besteht. Mit diesem Test kann eine östrogene Aktivität in einem Farbttest einfach und recht schnell dargestellt werden. Gemessen wird dabei die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase als Rotfärbung der Zellen. Über diese Enzymaktivität ist nun ein direktes Maß der ER-vermittelten Aktivität der Testsubstanz errechenbar.

5.5.1 Durchführung

Eine aufgetaute Hefe-Stammkultur wird als Übernachtskultur in 52 ml Wachstumsmedium bei 28 °C für 24 h unter Schütteln angezogen. Am nächsten Morgen werden für die Testkultur 0,5 ml der Übernachtskultur mit einer optischen Dichte (OD) von 1 entnommen und in 52 ml Wachstumsmedium plus CPRG-Enzymsubstrat gegeben.

In die Wells einer 96-Mikrotiterplatten werden jeweils 1 bis 2 µl der in Ethanol gelösten Probe bzw. des Standards pipettiert und bis zum Trocknen unter dem Abzug stehen gelassen. Als Standardsubstanz dient 17β-Östradiol.

Nun wird das Gemisch von Hefen und Testmedium vorsichtig aufgeschüttelt und mit einer Multikanalpipette werden jeweils 200 µl der Testkultur in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und bei 32 °C für 2 bis 3 Tage inkubiert.

An jedem Tag wird die Platte für 2 min stark bzw. ständig leicht geschüttelt. Nach der 2 bis 3-tägigen Inkubation wird die Färbung bei 540 nm und die Trübung bei 690 nm gemessen.

In jedem Versuchsansatz werden Standards (Östradiol im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-12} M) mitgeführt und die Aktivität der Probe darauf bezogen. Die Extinktion wird um die Trübung korrigiert. [Aktivität = Probe E540nm/Probe E620nm]. Unter Berücksichtigung der testbedingten Verdünnung der Probe (1:20) beträgt die Aufkonzentrierung bei der Untersuchung des unverdünnten Proben-Extraktes AF = 100.

5.6 Östrogene Aktivität: Stimulierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in

Ishikawa-Zellen

Es ist bekannt, dass bei Behandlung mit Östradiol in Ishikawa-Zellkulturen eine Zunahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AlkP) nachweisbar ist, die etwa nach drei Tagen ihr Maximum erreicht (Holinka et al., 1986).

Die Substanzen TCPP und TCEP wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-5} – 10^{-8} M) hinsichtlich ihrer Östrogenität in diesem Testsystem untersucht. Als Negativkontrolle wurden entsprechende Volumina Ethanol zugegeben, als Positivkontrolle diente Östradiol in einer Konzentration von 10^{-6} M. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente als Doppelbestimmungen durchgeführt.

5.6.1 Durchführung

Die Ishikawa Zelllinie (human endometrial carcinoma cell line) wurde in DMEM/ Ham's F12-Medium (1:1) ohne Phenolrot, 5 % DCC-behandeltes FKS (DCC = dextran-coated charcoal), 4 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Insulin, 33 µg/ml Gentamycin, 100 U/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin, 2 mM Na-Pyruvat kultiviert.

Die Zellen wurden in 12 Well-Platten mit einer Dichte von 125.000 Zellen pro Well ausgebracht und mit den zu untersuchenden Substanzen (s.o.) inkubiert.. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet (Trypsin/EDTA) und im Enzymreaktionspuffer (s.u.) mittels Ultraschalldesintegration aufgeschlossen.

AlkP-Aktivitätsbestimmung:

Puffer: 100 mM CAPS, 274 mM Mannitol, 4 mM MgCl₂, (pH 10.4)

Substrat: 4 mM p-Nitrophenylphosphat

Messung: spektrophotometrisch, bei $\lambda = 405$ nm

Für die Proteinbestimmung wurde ein BCA[®] Kit (Sigma) verwendet.

5.7 Ergebnisse

Zytotoxizität

Die in Abbildung 16 und Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zur zytotoxischen Wirkung von TCPD und TCEP belegen, dass beide Substanzen als wenig zytotoxisch einzustufen sind. Erst bei Konzentrationen von >1 mM kommt es zu schwachen zytotoxischen Effekten. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Behandlung mit und ohne Zusatz eines externen enzymatischen Metabolisierungssystems (S9-Mix).

Genotoxizität

Im Comet-Assay konnte keine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCPD und TCEP in V79-Zellen detektiert werden (Abbildung 18 und Abbildung 19). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer Behandlung mit und ohne Zusatz eines externen enzymatischen Metabolisierungssystems (S9-Mix).

Mutagenität

Der Ames-Assay wurde mit acht verschiedenen *Salmonella*-Stämmen durchgeführt. Unter keiner der hier angewendeten Bedingungen zeigten die beiden Testsubstanzen mutagene Wirkungen (Abbildung 20-Abbildung 23). Die jeweiligen Positiv- und Lösemittelkontrollen zeigen dabei an, dass die Testdurchführung ordnungsgemäß verlief.

Östrogene Wirkung

Der Screening-Assay in Glaxo ERa-Hefen zeigte weder für TCPP noch für TCEP einen östrogenen Effekt. Im Gegensatz zur Positivkontrolle mit 17 β -Östradiol wurde durch die beiden Testsubstanzen keine β -Galactosidase-Aktivität induziert.

Auch in Ishikawa-Zellen zeigten weder TCPP noch TCEP in den untersuchten Konzentrationen eine östrogene Wirkung (Abbildung 28). Während Östradiol eine deutliche Induktion der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase induziert, bleibt die Aktivität nach TCPP oder TCEP-Behandlung im Bereich der Kontrolle.

5.8 Zusammenfassung

Die hier untersuchten Substanzen Tris (2-chlorpropyl)-phosphat (TCPP) und Tris (2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) zeigten in keinem der angewendeten toxikologischen Assays einen adversen Effekt. Eine schwache Zytotoxizität gegenüber V79 Zellen trat erst bei sehr hohen Konzentrationen auf. Es ist nicht auszuschliessen, dass andere, primäre Zellkulturen möglicherweise empfindlicher reagiert hätten. Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen konnte in V79 Zellen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Im Ames-Assay mit acht verschiedenen Teststämmen wurden keine mutagenen Wirkungen von TCPP und TCEP nachgewiesen. Es ergaben sich also keine Hinweise auf ein mutagenes Potential oder andere genotoxische Schäden (DNA-Strangbrüche).

Die Verwendung des externen Metabolisierungssystems (S-9 Mix) zeigte in allen Testsystemen keine Modulation des toxischen Effektes. Daher ist davon auszugehen, dass auch keine stärker toxischen Metabolite gebildet werden.

Für die beiden Testsubstanzen lagen bislang keine Daten zu möglichen hormonellen Wirkungen in der Literatur vor. Daher wurde im Rahmen dieses Vorhabens erstmals ein Screening auf östrogene Wirkung der Substanzen durchgeführt. In zwei verschiedenen Assays (mit Hefen und Säugerzellen) waren keine östrogenen Wirkungen nachweisbar. .

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Die in den hier verwendeten Assays ermittelten Daten zeigen, dass die Substanzen Tris (2-chlorpropyl)-phosphat (TCPP) und Tris (2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) keine adversen Effekte ausüben.

Es wird darauf hingewiesen, dass die eingesetzten Testsysteme nur Aussagen für die von ihnen erfassten Mechanismen zulassen. Dies lässt noch keine allgemeine Bewertung der Substanzen im Sinne einer umfassenden Risikoabschätzung zu.

6 Gesamtergebnis

Die beiden Untersuchungsreihen über die Ruhr und das Klärwerk Köln-Stammheim haben gezeigt, dass die hier betrachteten Organophosphorverbindungen relevante Umweltkontaminanten darstellen. Obwohl die Ruhr als Hauptquelle zur Trinkwasserversorgung des Ruhrgebiets genutzt wird und eines der bestgeschützten Gewässer Europas ist, konnten die Organophosphate schon wenige Kilometer nach der Quelle nachgewiesen werden. Deutlich zu erkennen ist, dass die Konzentrationen stromab bis zur Mündung in den Rhein stark zunehmen. Als Eintragsquellen für diese Verbindungen konnten Klärwerke identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Klärwerke auch unterschiedlich zu der Verschmutzung beitragen. Beispielsweise tragen die Klärwerke Bochum Ölachtal und Hagen deutlich zum Eintrag von den chlorierten Flammschutzmitteln bei, während sie für den Eintrag der nichthalogenierten Organophosphate eine untergeordnete Rolle spielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Nebenflüsse der Ruhr wie Möhne und Lenne, von denen man bisher annahm, dass sie kaum von Kläranlagen beeinflusst werden, ebenfalls zur Verschmutzung der Ruhr beitragen.

Als Ergebnis der Probenserie im Großklärwerk Köln-Stammheim lässt sich festhalten, dass sich die halogenierten und nichthalogenierten Organophosphate in ihrem Abbauverhalten deutlich unterscheiden. Während sich bei den nichthalogenierten Flammschutzmitteln wie TBEP und TBP Eliminierungsraten bis zu 88% über den gesamten Abwasserreinigungsprozess feststellen ließen, wurde eine Verringerung der Konzentrationen an den halogenierten Verbindungen wie TCPP und TCEP nicht festgestellt. Eine stichprobenartige Untersuchung von Proben aus einem Teilprozess der Abwasserreinigung hat gezeigt, dass die Konzentrationen der nichthalogenierten Flammschutzmittel im Abwasser bereits mit der ersten Reinigungsstufe deutlich reduziert werden.

Aufgrund der beachtlichen Kontaminationen der aquatischen Umwelt wurden Untersuchungen auf die Zytotoxizität, Genotoxizität, Mutagenität sowie auf die östrogene Wirkung von TCPP und TCEP vorgenommen. Die toxikologischen Untersuchungen zeigen, dass allenfalls bei sehr hohen Konzentrationen, die keine Umweltrelevanz besitzen, schwache Effekte z.B. bei der Zytotoxizität auftraten. Hinweise auf eine mutagene Wirkung von TCPP oder TCEP liegen ebenso nicht vor

wie Effekte möglicher toxischer Metabolite. Auch eine östrogene Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, durch technische Maßnahmen in der Betriebsführung von Kläranlagen eine bessere Abbaubarkeit der Organophosphate zu erreichen. Hierzu ist es notwendig, detaillierte Untersuchungen der einzelnen Behandlungsschritte in den Kläranlagen durchzuführen.

7 Literatur

Ahrens, V.D. (1993) A Water extractable toxic compound in vinyl upholstery fabric. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 418-422

Andrae, U (1996) Genotoxizitätstests *in vitro*. In: *Toxikologie* (eds. Greim, H und Deml, E), VCH-Verlag, Weinheim, Germany

Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe (2000) Ausgewählte organische Spurenverunreinigungen in der Elbe und Elbenebenflüssen im Zeitraum 1994 – 1999

Aston, L.S., Noda, J., Seiber, J.N. und Reece (1996) Organophosphate Flame Retardants in Needles of *Pinus ponderosa* in the Sierra Nevada Foothills, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57, 859-866

Babich H, Borenfreund E (1992) Neutral Red assay for toxicology *in vitro*. In: *In vitro Methods of Toxicology* (ed. RR Watson), chapter 17, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp 237-251

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72,248-254

Charlsson, H., Nilsson, U. und Östman, C. (2000) Video Display Units: An Emission Source of the Contact Allergenic Flame Retardant Triphenyl Phosphate in the Indoor Environment, Environ. Sci. Technol. 34, 3885-3889

Deroux, J. M., Gonzalez, C., Le Cloirec, P. und Kovacsik, G. (1996) Analysis of extractable organic compounds in water by gas chromatography mass spectrometry : applications to surface water, Talanta 43, 365-380.

Friedle, A. (1999) Umweltmonitoring organisch substituierte Trisphosphate, Umed – info, PMA Sindelfingen GmbH

Fries, E. und Püttmann, W. (2001) Occurrence of organophosphate esters in surface water and ground water in Germany, J. Environ. Monit. 3, 621-626

Göggelmann, W. (1993) Die Erfassung von Genmutationen in Bakterien. In:

Mutationsforschung und genetische Toxikologie (ed. Fahrig, R), Wiss Buchges, Darmstadt, Germany

Grundmann, A. (2002) Methodenentwicklung zur Bestimmung von Alkylphosphaten unter besonderer Berücksichtigung von Tris (2-chlorpropyl) phosphat und Tris (2-chlorethyl) phosphat aus wässrigen Proben, Diplomarbeit Universität Dortmund, Fachbereich Chemie, Institut für Umweltforschung (INFU)

Hankemeier, T., Steketeer, P.C., Vreuls, J.J. und Brinkman, U.A.T. (1999) At – line SPE – GC – MS of micropollutants in water using the PrepStation, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364, 106-112

Hansen, D., Volland, G. und Zöltzer, D. (2001) Bestimmung und Vorkommen von phosphororganischen Verbindungen in Hausstaub und Raumluft, *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 61, 13-17

Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurside E (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Res* 46, 2771-2774

Ingerowski, G., Friedle, A., Thumulla, J. und Sagunski, H. (1997) Tris(2-chlorisopropyl)-phosphat als Flammschutzmittel und Weichmacher im Wohninnenraum: Vorkommen und Risikoabschätzung, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 2, 233-235

Kawagoshi, Y., Fukunaga, I. and Itoh, H. (1999) Distribution of organophosphoric acid trimesters between water and sediment at a sea – based solid waste disposal site, *U. Mate, Cycles Waste Manag.* 1, 53-61

Leisewitz, A., Krause, H. und Schramm, E. (2000a) Erarbeitung von Bewertungsgrundlagen zur Substitution umweltrelevanter Flammschutzmittel, Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt Band I, ISSN 0722-186X

Leisewitz, A., Kruse H., Schramm, E. (2000b) Umweltforschungsplan des Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Berlin

Ljung, E. (1996) The flame retardants project – Final report, The Swedish National Chemicals Inspectorate, Stockholm, KEMI Report No. 5, ISSN 0284-1185

Marnett, L.J. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagen in Salmonella tester strain TA 104. *Mutat Res.*148, 25-34

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173-215

Metzger, J. W. und Möhle, E. (2001) Flammenschutzmittel in Oberflächenwässern, Grundwässern und Abwässern – Eintragspfade und Gehalte, Insitut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart – Lehrstuhl für Hydrochemie und Hydrobiologie, Förderkennzeichen: BWB 99012, Stuttgart

Möhle, E. (2003) Untersuchung zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen, Universität Dortmund, Fachbereich Chemietechnik, Lehrstuhl Umwelttechnik, Deutsche Projekt Union GmbH Köln, Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT, Oberhausen, Stadtentwässerungsbetrieb Düsseldorf und Stadtentwässerungsbetrieb Köln, AöR

NICNAS, Triphosphates (2001) Priority Existing chemical Assessment Report No. 17, ISBN 0 642-70984-X.

Nielsson, H., Carlsson, U., Becker, G. und Östman, C. (1997) Organophosphate Ester Flame Retardants and Plasticizers in the Indoor Environment: Analytical Methodology and Occurrence, *Environ. Sci. Technol.* 31, 2931-2036

Nilsson, K., Crescenzi, U., Möller, C. (2001) Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers for extracting hydrolysis products of organophosphate flame retardants, *J. Chromatogr. A* 938, 121-130

OECD 471 1983 (1997) OECD Guidelines for The Testing of Chemicals/ Section 4: Health Effects, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, Paris, France

Otoka, T.,Yoshinaga, J. und Yanagisawa, Y. (2001) Analysis of Organic Esters of Plasticizer in Indo Air by GC- MS and GC – FPD, *Environ. Sci. Technol.* 36, 3099-3102

Pösch, J., Puchert, W. und Gluschke, M. (2000) Vorkommen von Chloralkylphosphaten in den Abläufen kommunaler Kläranlagen des deutschen Ostsee–Einzugsgebietes, Vom

Wasser 95, 87-96

Routledge E, Sumpter JP (1996) Oestrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Tox Chem* 15, 241-248

Sagunski, H., Ingerowski, G., Muttulat, A. und Scheutwinkel, M. (1997) Tris(2-chlorethyl)-phosphat, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 2, 185-192

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191

Stee, L. L. P., Leonards, P.E.G., Vreuls, R. J.J. und Brinkman, U. A. T. (1999) Identification of non-target compounds using gas chromatography with simultaneous atomic emission and mass spectrometric detection (GC-AED/MS): analysis of municipal wastewater, *Analyst* 124, 1547

Thruston, A.D., Richardson, S.D., McGuire, J. M., Colette, T. W. und Trusty, C.D. (1991) Multispectral Identification of Alkyl and Chloroalkyl Phosphates from an Industrial Effluent, *J. Am. Mass Spectrom.* 3, 419-426

8 Abbildungen und Tabellen

Tabelle 1 Probennahmeorte entlang der Ruhr

Datum	Probenname	GPS-Daten	Ort	Wassertiefe	Besonderheiten
17.09.02	KB-F-23	N51°16,320 O08°31,118	Ruhr-Niedersfeld	40 cm	Kläranlage
17.09.02	KB-F-24	N51°16,301 O08°31,116	Ruhr-Niedersfeld	20 cm	Kläranlage
17.09.02	KB-F-25/26	N51°16,186 O08°31,158	Ruhr-Niedersfeld	20 cm	
17.09.02	KB-F-27	N51°19,837 O08°29,343	Ruhr-Olsberg	20 cm	Betonwerk
17.09.02	KB-F-28	N51°19,926 O08°29,280	Ruhr-Olsberg	20 cm	Betonwerk
17.09.02	KB-F-29	N51°19,776 O08°29,250	Neger-Olsberg	20 cm	Betonwerk
17.09.02	KB-F-30	N51°19,85 O08°29,275	Ruhr-Olsberg	20 cm	
17.09.02	KB-F-31	Blank			
17.09.02	KB-F-32	N51°21,755 O08°28,367	Ruhr-Olsberg	30 cm	
17.09.02	KB-F-33	N51°21,066 O08°19,496	Ruhr-Heinrichsthal	30 cm	Wehr
17.09.02	KB-F-34	N51°21,037 O08°19,447	Henne-Meschede	30 cm	
17.09.02	KB-F-35	N51°20,911 O08°16,671	Gebke-Meschede	15 cm	
17.09.02	KB-F-36	N51°20,988 O08°15,720	Ruhr-Meschede	30 cm	Kläranlage Meschede 1
17.09.02	KB-F-37	N51°20,964 O08°15,204	Ruhr-Meschede	30 cm	Kläranlage Meschede 2
17.09.02	KB-F-38	N51°27,335 O07°37,449	Möhne-Arnsberg	20 cm	
17.09.02	KB-F-39	N51°27,353 O07°57,247	Ruhr-Arnsberg	20 cm	
17.09.02	KB-F-40	N51°27,578 O07°57,332	Ruhr-Arnsberg	40 cm	
17.09.02	KB-F-41	N51°28,050 O07°46,003	Hönne-Fröndenberg	20 cm	
17.09.02	KB-F-42	N51°28,035 O07°45,859	Ruhr-Fröndenberg	30 cm	
17.09.02	KB-F-43	N51°28,038 O07°45,767	Ruhr-Fröndenberg	30 cm	Kläranlage Fröndenberg
17.09.02	KB-F-44	N51°28,108 O07°45,702	Ruhr-Fröndenberg	30 cm	Kläranlage Fröndenberg
17.09.02	KB-F-45	N51°28,116 O07°46,033	Ruhr-Fröndenberg	30 cm	
19.09.02	KB-F-46/47	N51°24,549 O07°29,582	Lenne-Hagen	30 cm	Autobahn
19.09.02	KB-F-48	N51°23,780 O07°30,233	Lenne-Hagen	30 cm	Kläranlage Hagen 1
19.09.02	KB-F-49	N51°23,836 O07°30,373	Lenne-Hagen	30 cm	
19.09.02	KB-F-50	N51°24,778 O07°30,723	Ruhr-Hagen/Schwerte	70 cm	
19.09.02	KB-F-51	N51°24,885 O07°29,517	Lenne-Hagen	30 cm	Kläranlage Hagen 2
19.09.02	KB-F-52/53/54	N51°25,079 O07°28,561	Ruhr-Hagen	50 cm	
19.09.02	KB-F-55	N51°23,117 O07°26,965	Volme-Hagen	50 cm	
19.09.02	KB-F-56	N51°25,509 O07°17,402	Ruhr-Bochum	30 cm	
19.09.02	KB-F-57/58/59	N51°26,341 O07°17,031	Ölbach-Bochum	1 m	Ablauf Schönungsteiche
19.09.02	KB-F-60	N51°26,189 O07°16,710	Kemnadersee-Bochum	1 m	
19.09.02	KB-F-61	N51°24,911 O07°15,188	Kemnadersee-Bochum	30 cm	
19.09.02	KB-F-62	N51°24,757 O07°15,048	Kemnadersee-Bochum	30 cm	
19.09.02	KB-F-63	N51°24,701 O07°03,763	Ruhr-Hattingen	50 cm	
19.09.02	KB-F-64	N51°24,603 O07°04,859	Ruhr-Essen	20 cm	
19.09.02	KB-F-65	N51°23,113 O07°00,024	Ruhr-Essen/Werden	30 cm	
19.09.02	KB-F-66	N51°24,111 O06°53,765	Ruhr-Mühlheim/Menden	20 cm	

Tabelle 2 Daten zur Qualitätssicherung

Analyt	RT [min]	Wiederfindung		RSD [%]	LOQ [ng/l]
		[%]			
TiBP	10,87	107		12	6,3
TnBP	11,95	98		19	6,0
TCEP (LLE)	13,47	31		33	12,0
TCEP (SPE)	13,47	67		15	12,0
TCPP	13,85	101		14	4,9
TDCP	18,92	95		3	14,0
TBEP	19,55	89		19	6,4
TPP	19,59	93		27	5,5

RT = Retentionszeit

RSD = relative Standardabweichung

LOQ = Bestimmungsgrenze

Tabelle 3 Übersicht über die Konzentrationen in den Zulaufproben

Probe MoB-	Referenz	Datum Eingang	Porbenart	Volumen[ml]	TiBP [ng/L]	TnBP [ng/L]	TCEP [ng/L]	TCPP [ng/L]	TDCP [ng/L]	TBEP [ng/L]	TPP [ng/L]
192	130302171	17.02.03	ZK Köln Ablauf	1056,2	1000	290	280	710	76	3100	68
193	130302171	17.02.03	ZK Köln Ablauf	1047,1	1000	240	270	690	76	2500	68
178	110302161	18.02.03	Köln Zulauf	780,7	860	200	140	520	52	2300	48
186	110302161	18.02.03	Köln Zulauf	927,0	1200	250	190	710	68	2500	62
213	130302181	19.02.03	ZK Köln Ablauf	1040,3	1800	300	380	5900	110	6100	140
215	130302181	19.02.03	ZK Köln Ablauf	992,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
221	110302231	25.02.03	Köln Zulauf	724,0	1000	320	250	840	78	3400	220
223	110302231	25.02.03	Köln Zulauf	867,8	820	260	210	660	56	2100	150
256	110302241	26.02.03	Köln Zulauf	884,0	1600	370	350	930	96	4500	160
262	110302241	26.02.03	Köln Zulauf	802,8	1400	320	300	820	76	3400	130
216	110302251	27.02.03	Köln Zulauf	870,9	2100	1600	630	2700	120	5900	280
217	110302251	27.02.03	Köln Zulauf	816,3	2200	1800	640	2900	140	6300	300
293	110303041	06.03.03	Köln Zulauf	838,1	1400	6200	270	5100	98	3000	180
295	110303041	06.03.03	Köln Zulauf	831,9	1000	4800	220	3900	74	2600	140
315	110303051	07.03.03	Köln Zulauf	856,0	1400	860	260	6000	99	4500	220
316	110303051	07.03.03	Köln Zulauf	864,3	1300	730	240	5500	89	4000	200
331	110303091	11.03.03	Köln Zulauf	897,1	740	260	170	590	80	2300	57
332	110303091	11.03.03	Köln Zulauf	1000,0	790	290	190	620	87	2400	62
300	110303101	12.03.03	Köln Zulauf	932,2	1300	390	380	1500	92	3300	110
303	110303101	12.03.03	Köln Zulauf	838,8	1400	400	400	1600	95	3100	100
340	110303111	13.03.03	Köln Zulauf	912,7	1100	960	330	1600	200	5000	150
345	110303111	13.03.03	Köln Zulauf	908,0	760	670	240	1100	150	3400	110
168	130303121	13.03.03	ZK Köln Ablauf	935,6	1200	4800	230	1700	190	3400	130
170	130303121	13.03.03	ZK Köln Ablauf	982,3	1100	4400	230	1600	170	3000	120
356	110303121	14.03.03	Köln Zulauf	1027,1	1300	2100	230	1500	120	3900	91
359	110303121	14.03.03	Köln Zulauf	1079,4	1600	2600	280	1900	150	4700	110
308	110303161	18.03.03	Köln Zulauf	913,8	550	360	65	270	41	1600	34
310	110303161	18.03.03	Köln Zulauf	780,2	1100	620	170	570	80	3200	59
366	130303171	17.03.03	ZK Köln Ablauf	994,8	970	270	200	600	85	2300	62
368	130303171	17.03.03	ZK Köln Ablauf	1039,8	950	260	200	590	85	2300	59
401	130303181	19.03.03	ZK Köln Ablauf	1028,6	2300	420	260	3300	80	4100	88
402	130303181	19.03.03	ZK Köln Ablauf	997,9	1300	240	150	1900	50	3000	56
383	130303201	21.03.03	ZK Köln Ablauf	1043,7	2100	480	170	2000	56	3100	68
385	130303201	21.03.03	ZK Köln Ablauf	1029,9	3100	620	270	3100	86	4300	83
410	130303241	26.03.03	Köln Zulauf	1003,2	1000	870	190	1900	60	3000	85
412	130303241	26.03.03	Köln Zulauf	837,2	1300	1400	320	3000	81	4200	126

Tabelle 3

Tabelle 4 Übersicht über die Konzentrationen in den Ablaufproben

Probe MoB-	Referenz	Datum Eingang	Porbenart	Volumen[ml]	TiBP [ng/l]	TnBP [ng/L]	TCEP [ng/l]	TCPP [ng/l]	TDCP [ng/l]	TBEP [ng/l]	TPP [ng/l]
196	140302171	17.02.03	NK Köln Ablauf	1023,4	180	95	190	1400	71	190	49
197	140302171	17.02.03	NK Köln Ablauf	1073,9	220	130	230	1700	86	210	59
179	120302161	18.02.03	Köln Ablauf	1059,8	120	110	260	2500	79	270	45
185	120302161	18.02.03	Köln Ablauf	1037,6	120	110	270	2500	81	310	58
210	140302181	19.02.03	NK Köln Ablauf	1026,5	810	340	700	9700	170	1500	110
211	140302181	19.02.03	NK Köln Ablauf	1058,7	372	150	330	4500	83	750	51
224	120302231	25.02.03	Köln Ablauf	1003,2	48	32	200	470	54	590	18
225	120302231	25.02.03	Köln Ablauf	983,7	290	590	410	4500	100	420	445
260	120302241	26.02.03	Köln Ablauf	774,2	140	190	320	2200	74	380	290
261	120302241	26.02.03	Köln Ablauf	756,6	150	310	330	2300	76	350	210
189	120302251	27.02.03	Köln Ablauf	823,2	200	270	420	1900	86	390	140
257	120302251	27.02.03	Köln Ablauf	998,2	170	180	360	1800	80	410	130
292	120303041	06.03.03	Köln Ablauf	917,1	210	2300	260	4800	180	330	92
294	120303041	06.03.03	Köln Ablauf	732,8	190	2300	230	5200	180	270	99
318	120303051	07.03.03	Köln Ablauf	848,0	200	1600	360	6400	170	330	81
319	120303051	07.03.03	Köln Ablauf	833,9	210	1600	380	6700	180	340	85
336	120303091	11.03.03	Köln Ablauf	1028,3	100	150	300	2800	160	330	37
337	120303091	11.03.03	Köln Ablauf	1026,7	100	170	320	2900	170	370	37
301	120303101	12.03.03	Köln Ablauf	964,8	110	120	360	2100	140	330	28
302	120303101	12.03.03	Köln Ablauf	997,3	110	140	380	2100	140	370	30
341	120303111	13.03.03	Köln Ablauf	974,9	160	170	360	1600	110	740	22
343	120303111	13.03.03	Köln Ablauf	922,4	170	160	400	1700	120	910	23
173	140303121	13.03.03	NK Köln Ablauf	1026,4	180	650	410	1500	170	540	46
175	140303121	13.03.03	NK Köln Ablauf	1036,4	190	690	410	1600	180	590	51
360	120303121	14.03.03	Köln Ablauf	1031,3	150	500	420	1700	150	770	32
361	120303121	14.03.03	Köln Ablauf	1006,7	140	480	400	1600	150	810	32
309	120303161	18.03.03	Köln Ablauf	929,3	130	160	350	2700	120	460	16
311	120303161	18.03.03	Köln Ablauf	989,8	150	170	420	3300	140	420	21
367	140303171	17.03.03	NK Köln Ablauf	990,3	350	230	320	2000	120	560	23
369	140303171	17.03.03	NK Köln Ablauf	991,5	350	250	350	2100	120	640	25
399	140303181	19.03.03	NK Köln Ablauf	994,3	350	190	410	3400	110	550	19
403	140303181	19.03.03	NK Köln Ablauf	989,1	360	230	450	3700	120	620	19
382	140303201	21.03.03	NK Köln Ablauf	995,6	310	170	320	2300	75	380	15
384	140303201	21.03.03	NK Köln Ablauf	1007,6	360	190	400	2700	86	500	20
411	140303241	26.03.03	Köln Ablauf	1050,7	140	180	370	2400	89	530	14
413	140303241	26.03.03	Köln Ablauf	1057,6	120	150	340	2300	85	520	13

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zu- und Ablaufproben

	Median Zulauf [ng/l]	Median Ablauf [ng/l]	Max. Zulauf [ng/l]	Max. Ablauf [ng/l]	Durchbruch [%]
TiBP	1300	160	2200	290	12
TnBP	1200	530	5500	2300	44
TCEP	290	350	640	410	121
TCPP	2000	3100	5800	6600	155
TDCP	100	130	180	180	130
TBEP	3700	440	6100	790	12
TPP	130	100	290	420	77

Tabelle 6 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zuläufe von Zwischen- und Nachklärung

	Mittel ZK [ng/l]	Mittel NK [ng/l]	Durchbruch [%]
TiBP	1600	300	19
TnBP	1100	260	24
TCEP	260	350	135
TCPP	2500	2600	104
TDCP	100	110	110
TBEP	3600	540	15
TPP	93	36	39

Tabelle 7 Methodenparameter für die Festphasenextraktion

	retention time	analytical ion [amu]	recovery rate [%]	RSD [%]	LOQ [ng/l]
TiBP	11.16	211	78	8	10
TnBP	12.81	211	87	11	10
TCEP	14.15	249	83	10	10
TCPP	14.47	277	80	5	10
TDCP	19.61	379	81	6	10
TBEP	20.20	199	90	9	10
TPP	20.26	325	75	13	10

Abbildung 1 Vergleich des Chromatogramms von TCPP aus einer Standardlösung mit dem Chromatogramm aus einer Wasserprobe

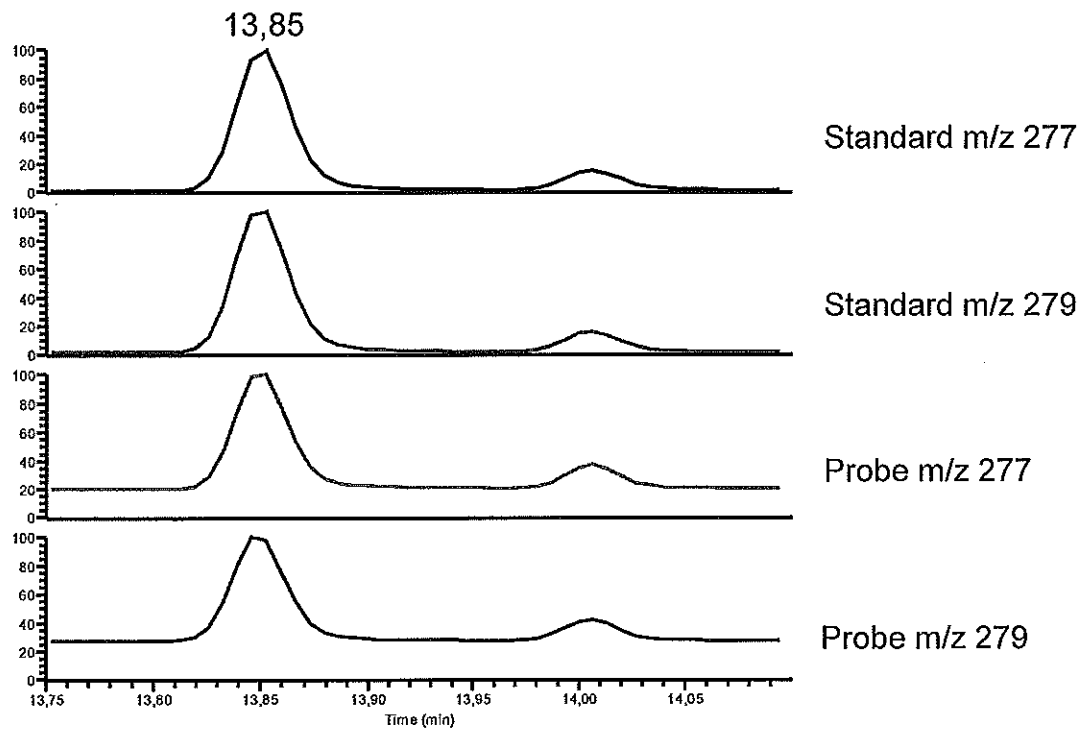


Abbildung 2 Vergleich der Chromatogramme von TCPP aus einem Klärwerkszulauf und einem Standard

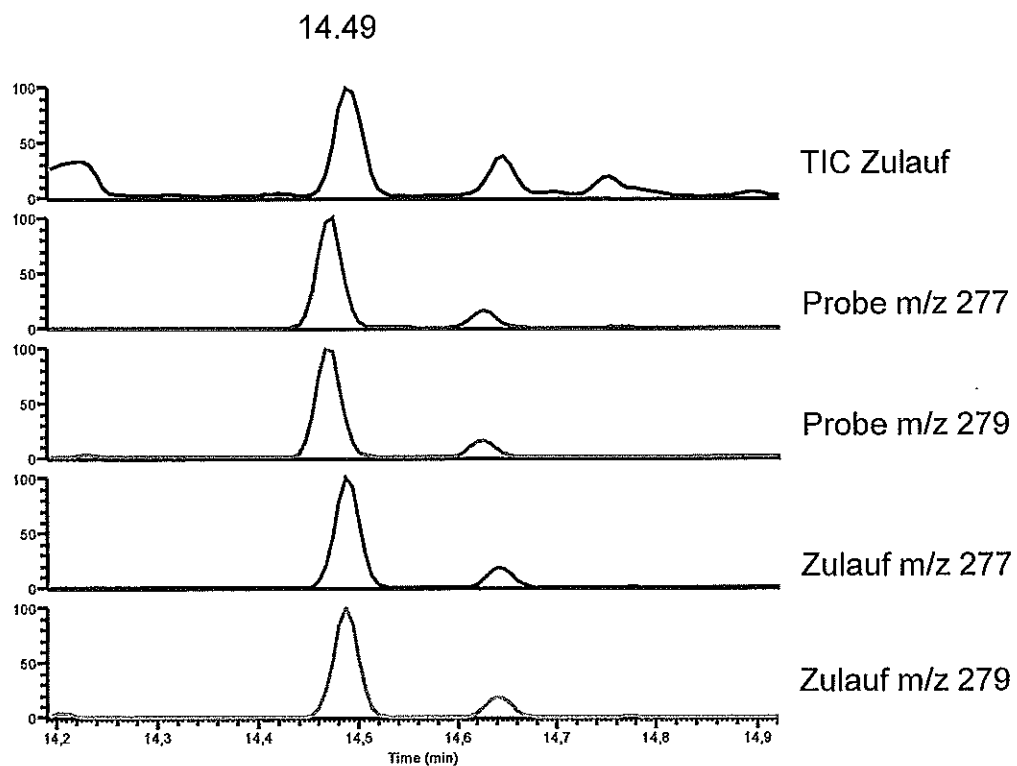


Abbildung 3 Konzentrationen von Tris(2-chlorpropyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l

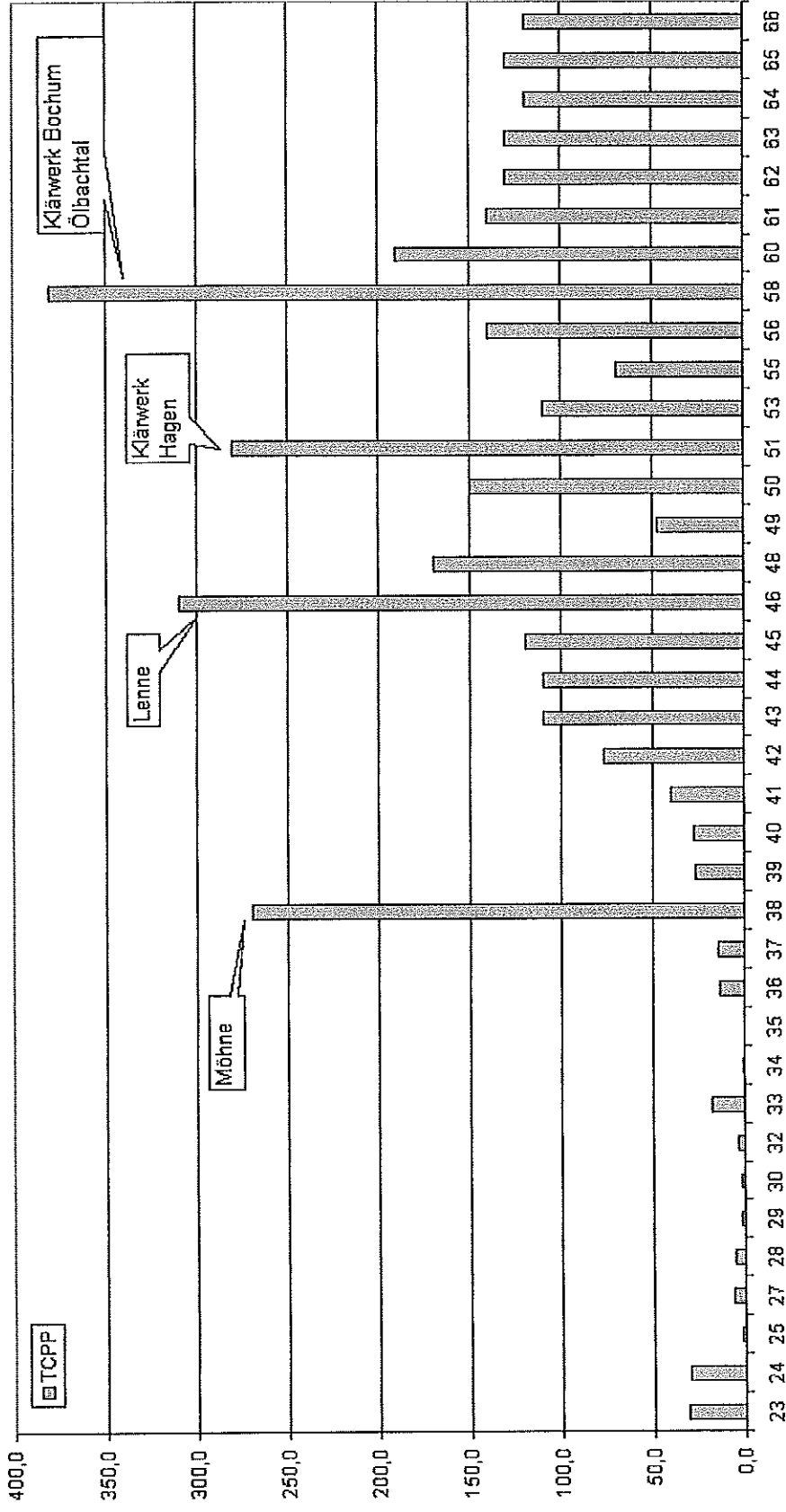


Abbildung 4 Konzentrationen von Tris(chlorethy)phosphat und Tris(dichlorpropyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l

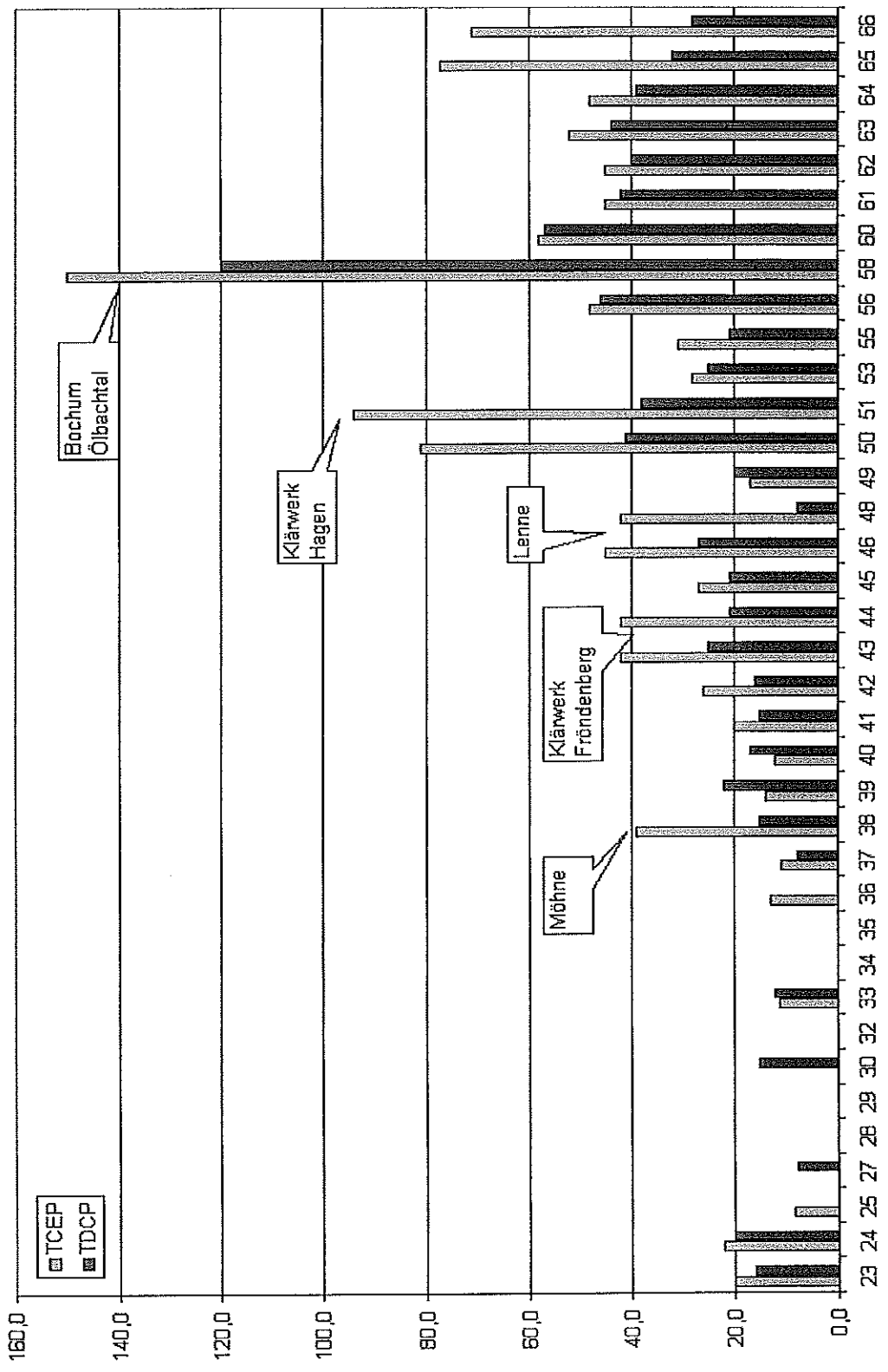


Abbildung 5 Konzentrationen von Tri-n-butylphosphat und Triphenylphosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l

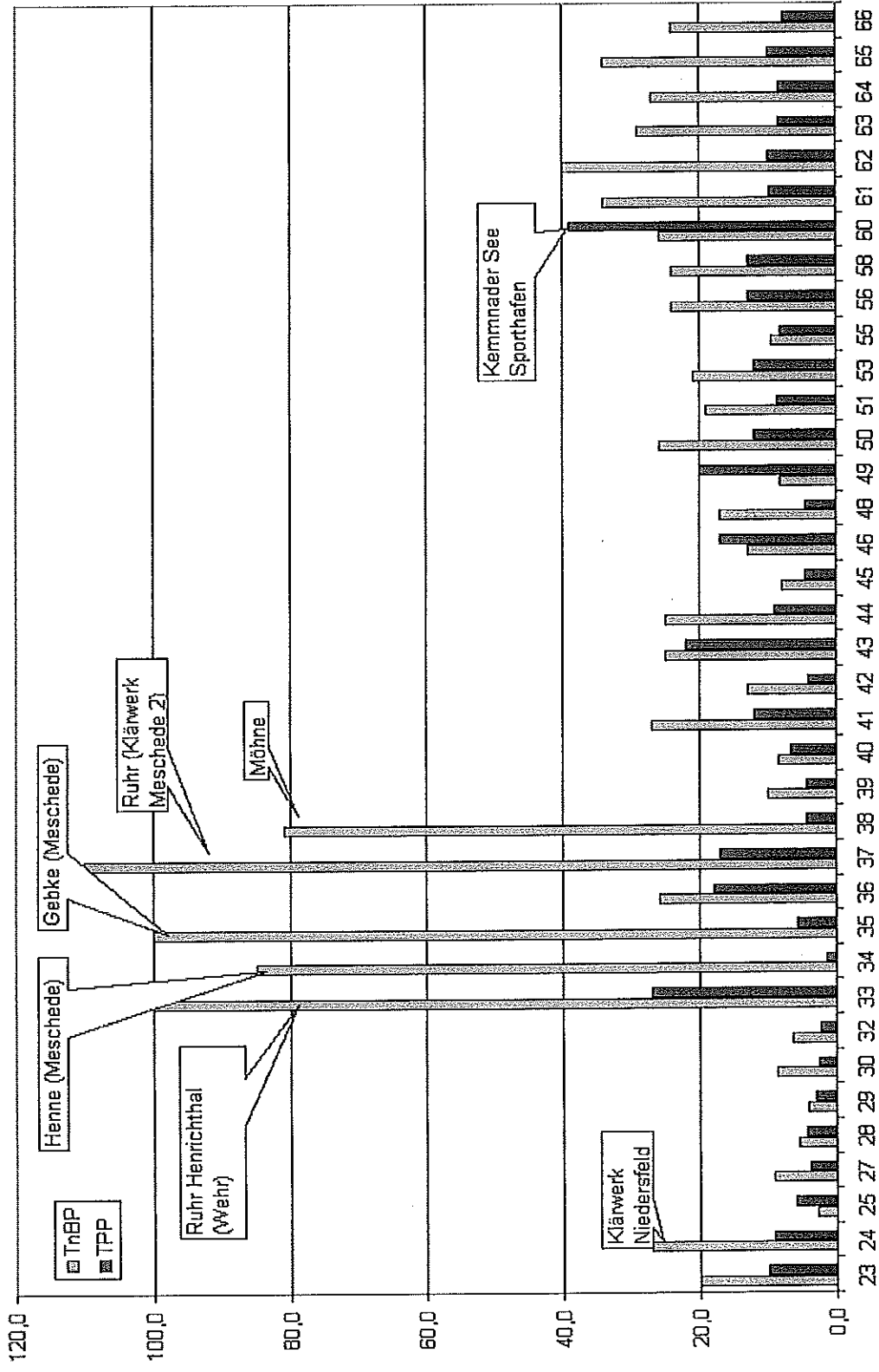


Abbildung 6 Konzentrationen von Tri-iso-butylphosphat und Tris(butoxyethyl)phosphat an den einzelnen Messpunkten in ng/l

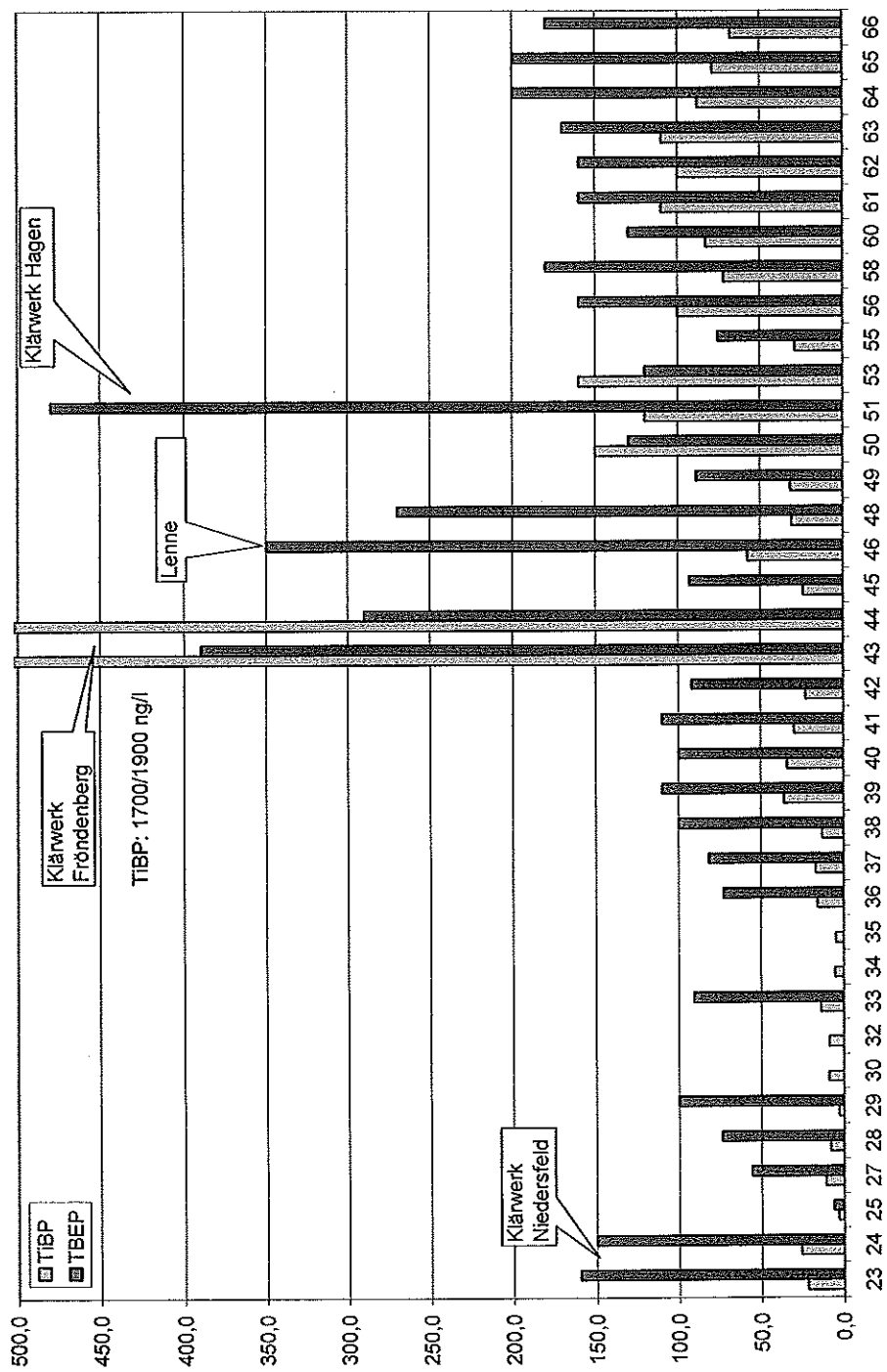


Abbildung 7 Graphische Darstellung der mittleren Konzentrationen der Zu- und Ablaufproben

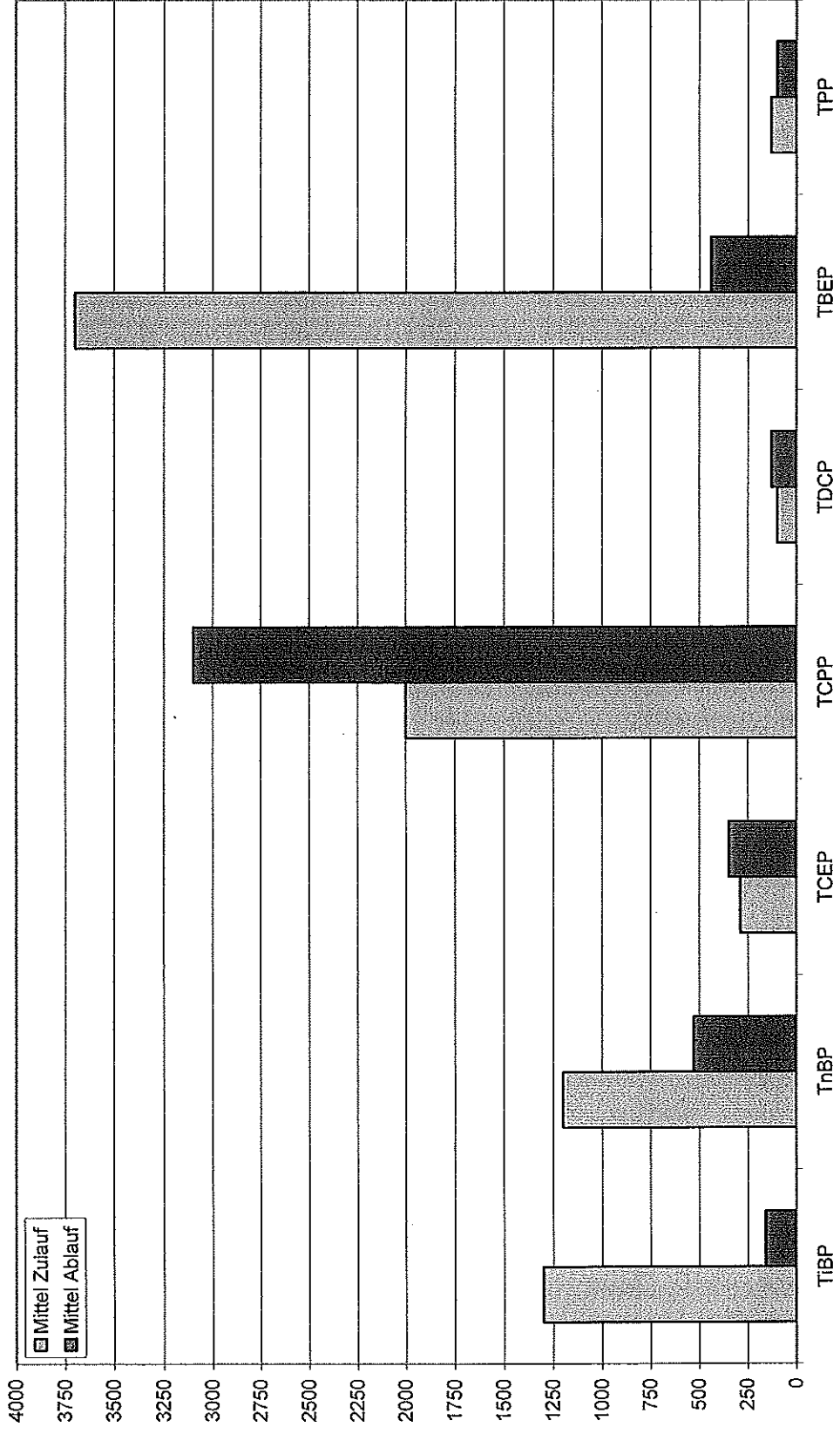


Abbildung 8 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TIBP über die gesamte Projektdauer

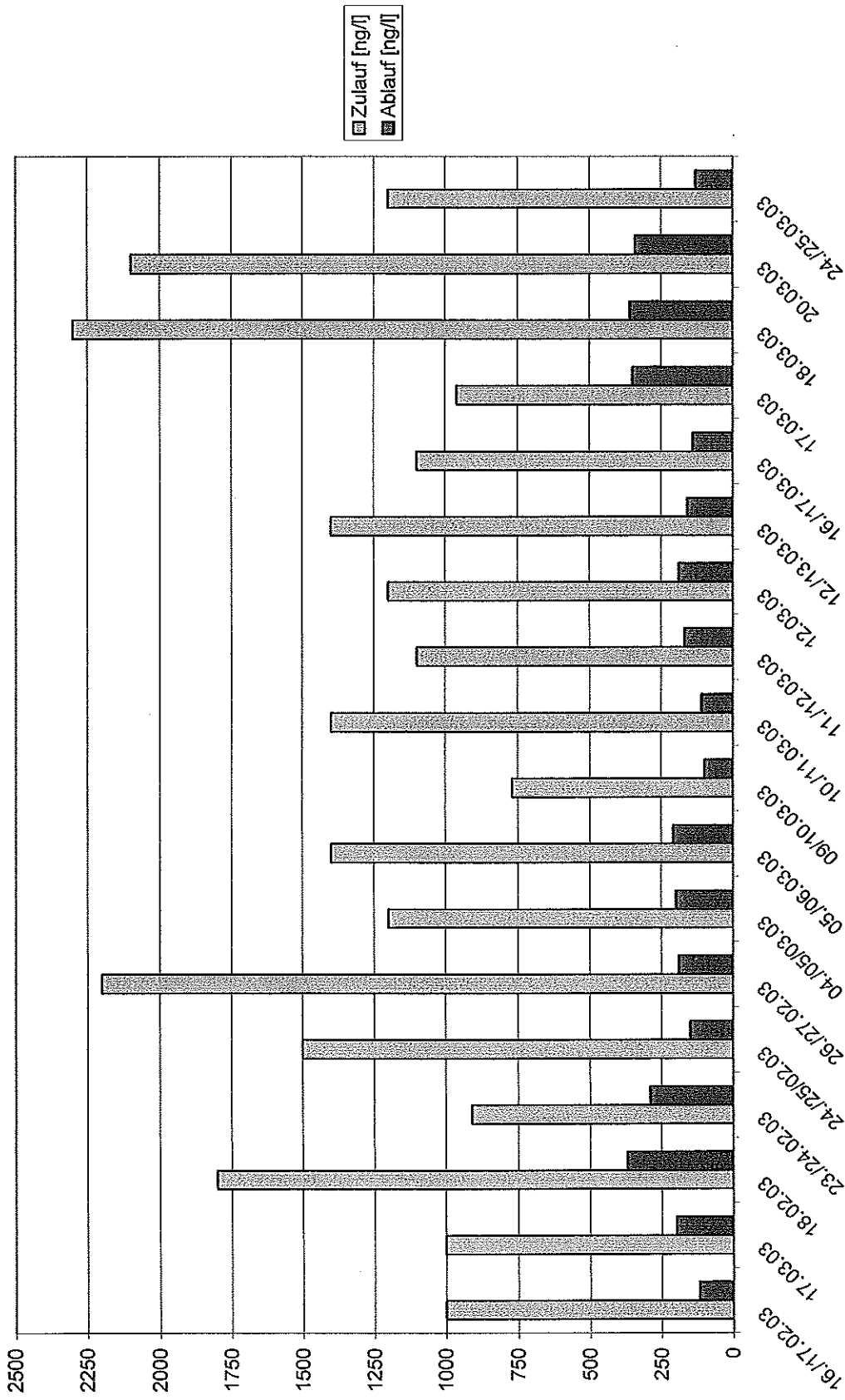


Abbildung 9 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TnBP über die gesamte Projektdauer

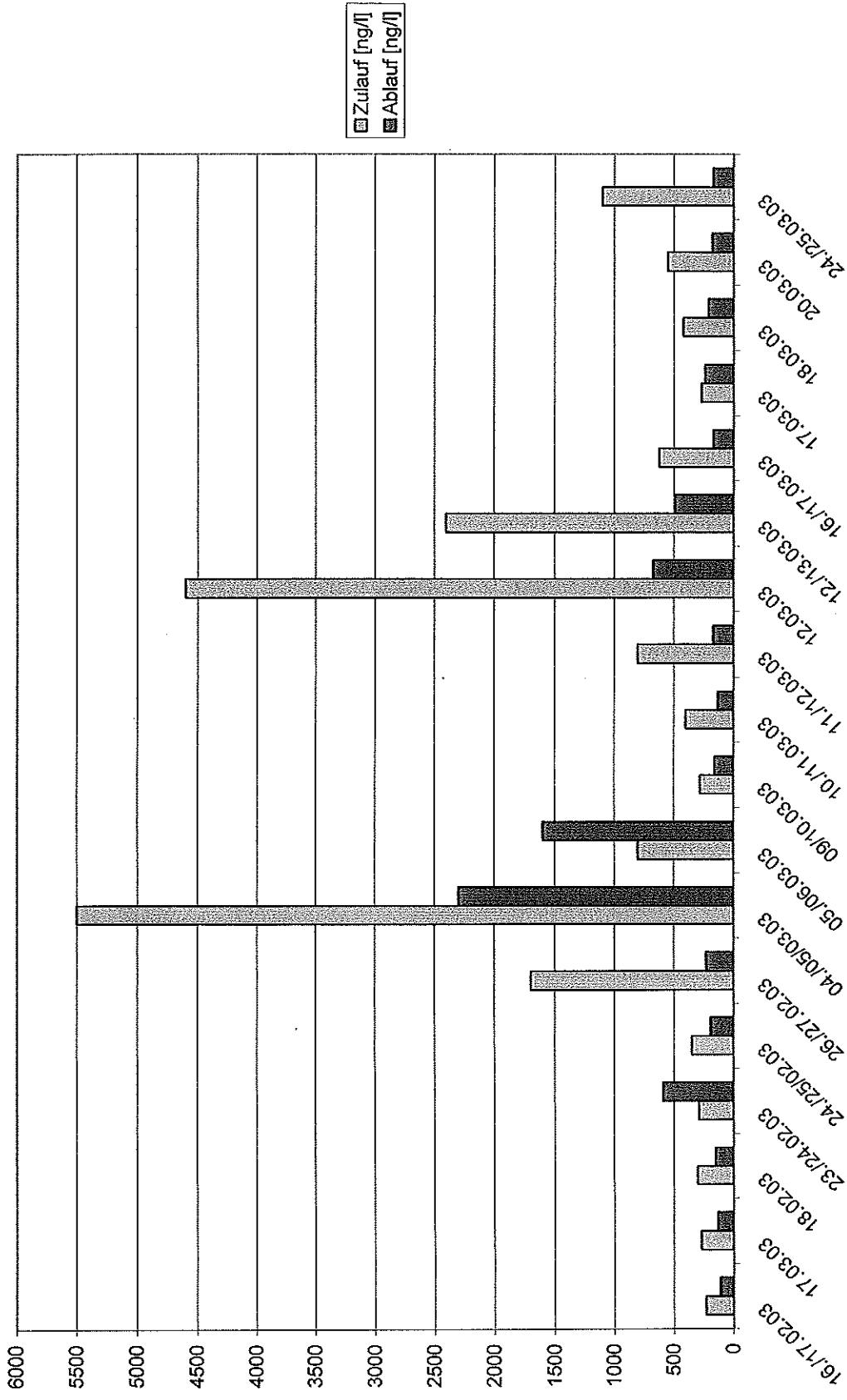


Abbildung 10 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TCEP über die gesamte Projektdauer

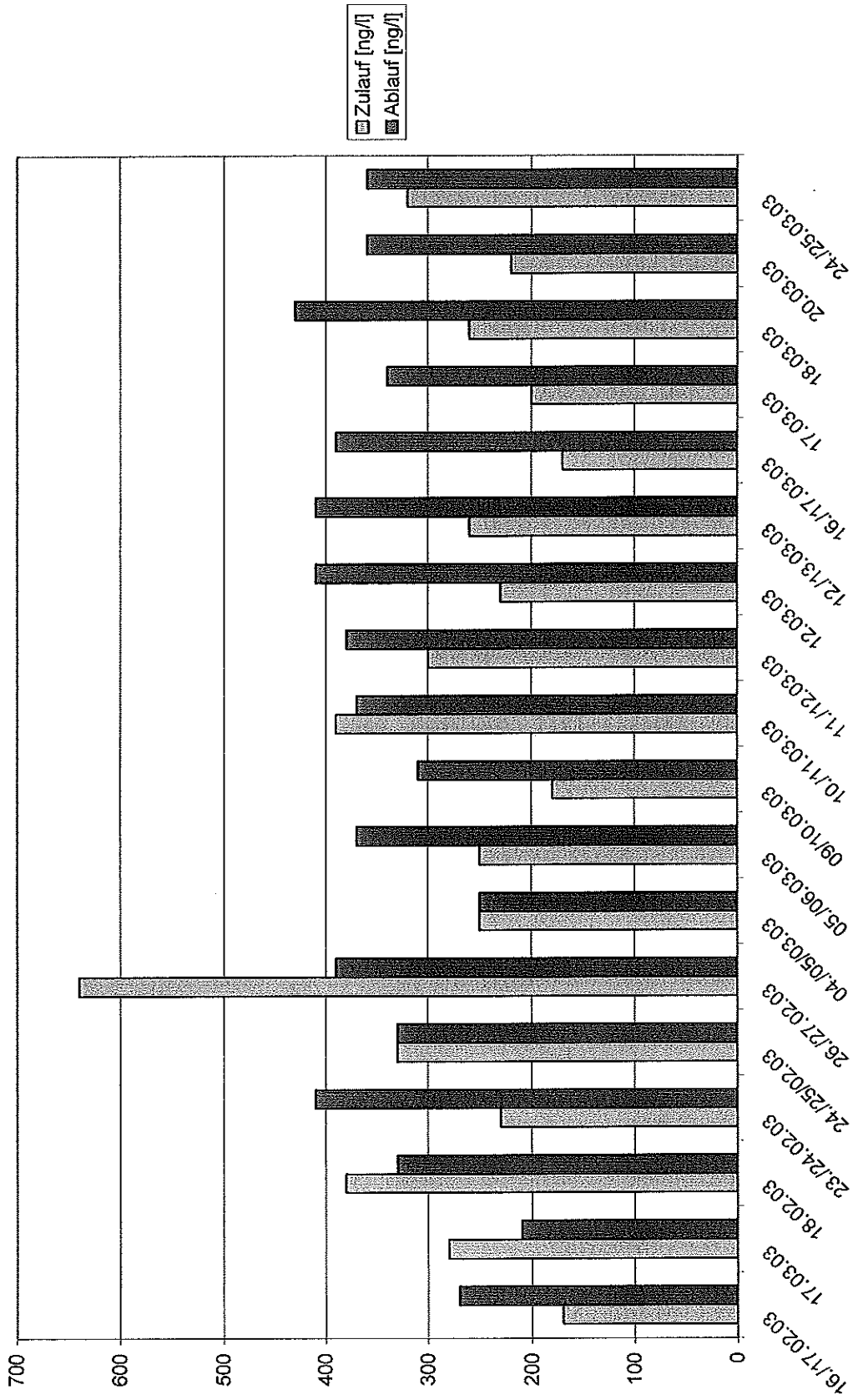


Abbildung 11 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TCPF über die gesamte Projektdauer

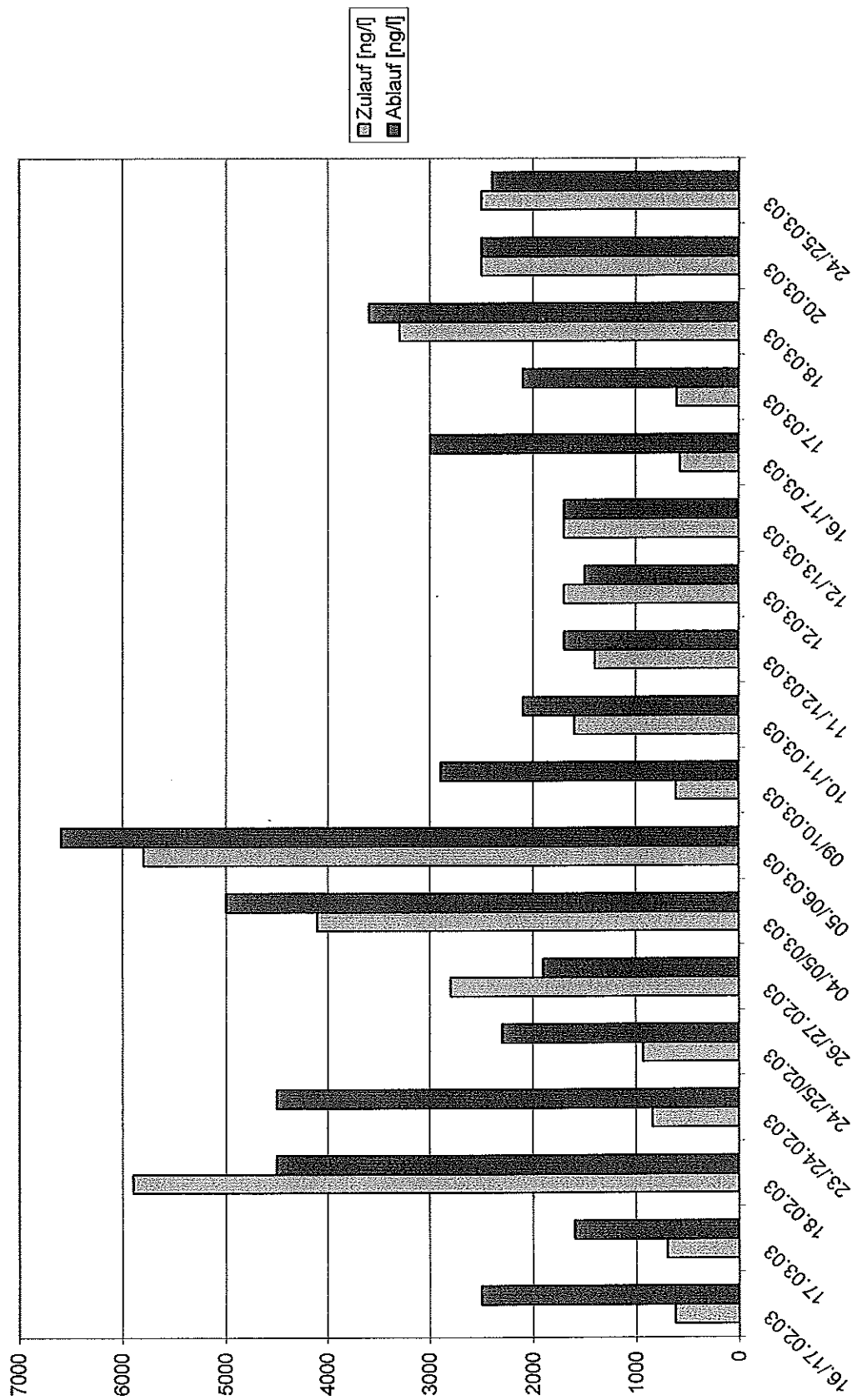


Abbildung 12 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TDCP über die gesamte Projektdauer

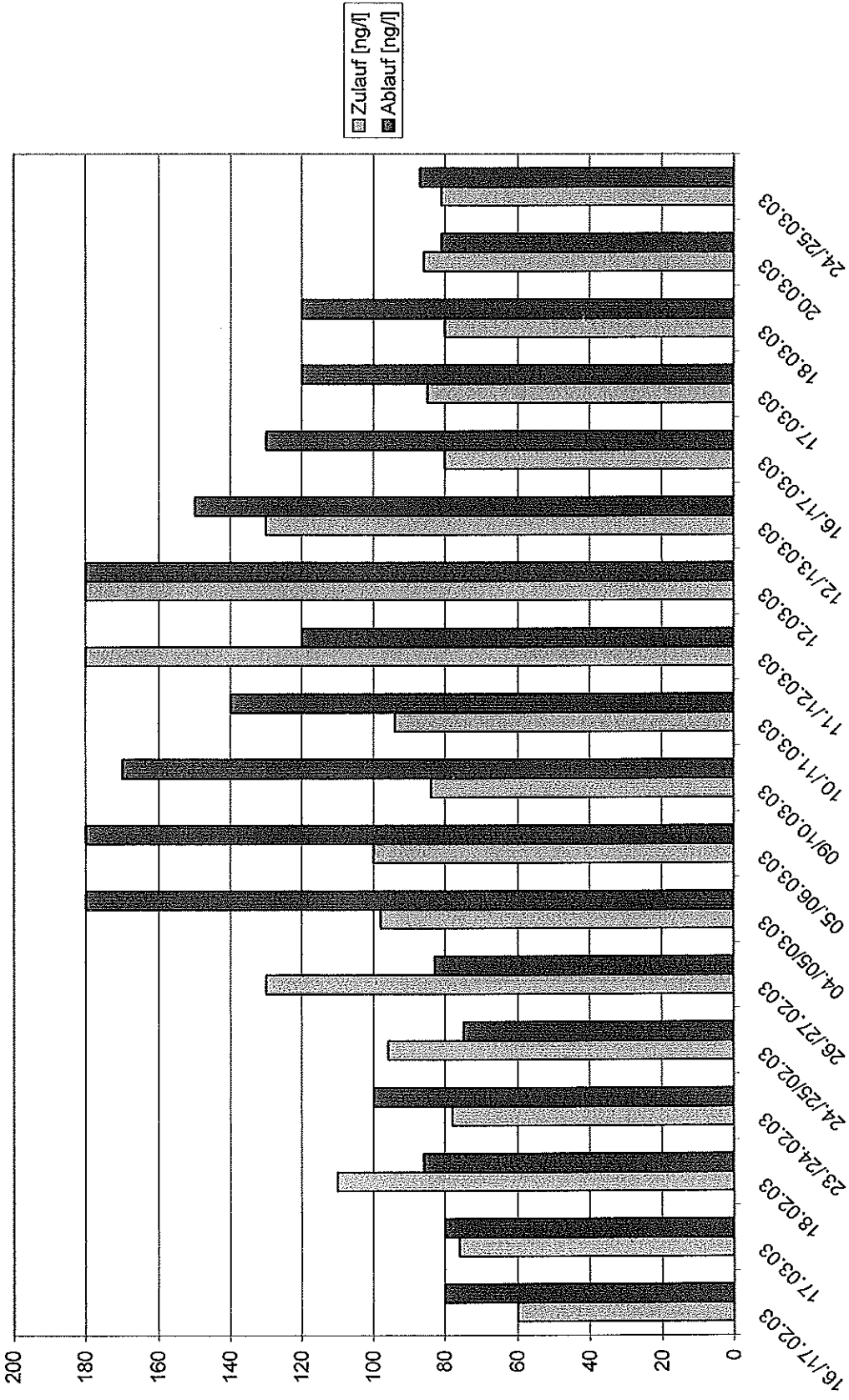


Abbildung 13 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TBEP über die gesamte Projektdauer

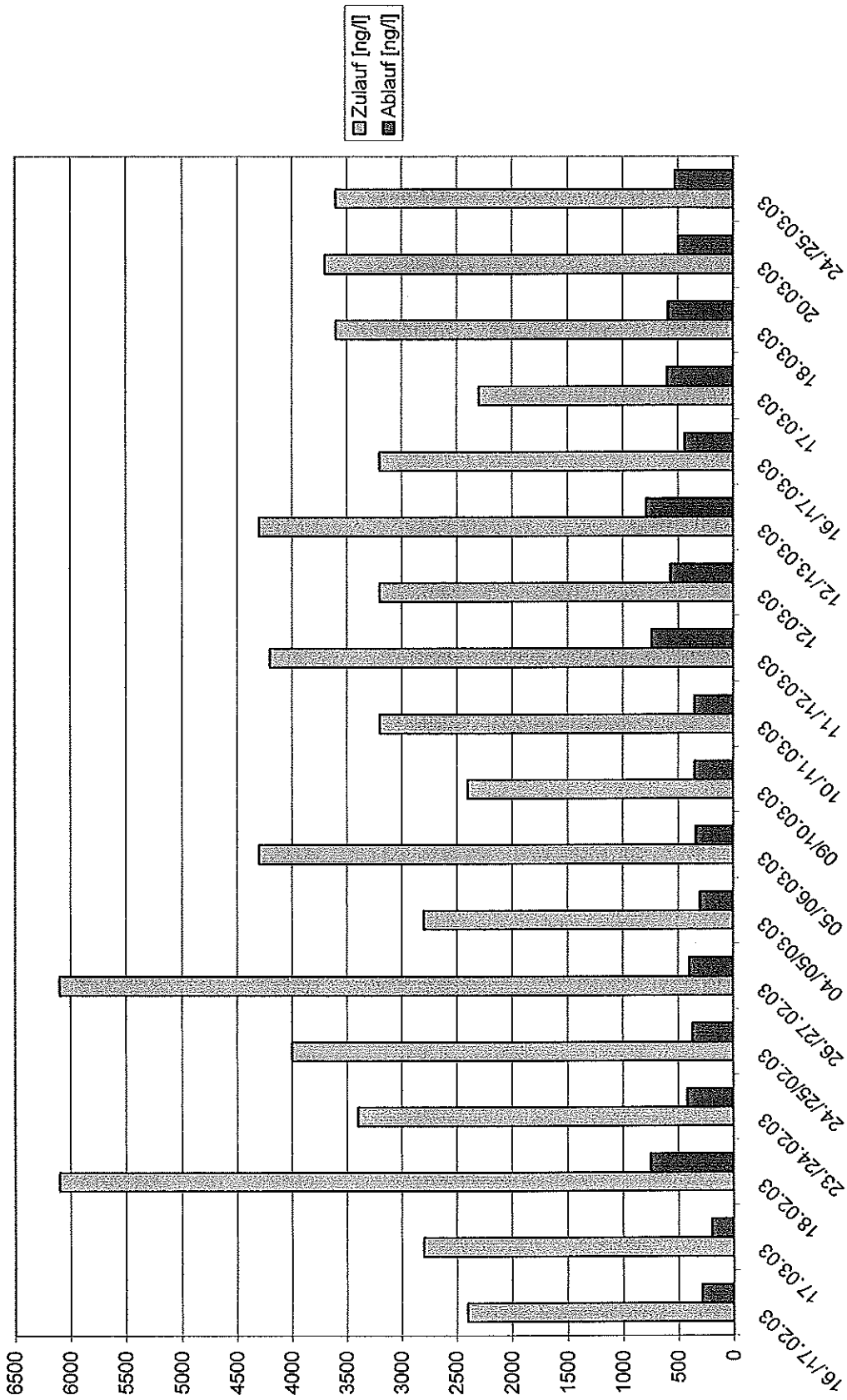


Abbildung 14 Graphische Darstellung der Konzentrationen von TPP über die gesamte Projektdauer

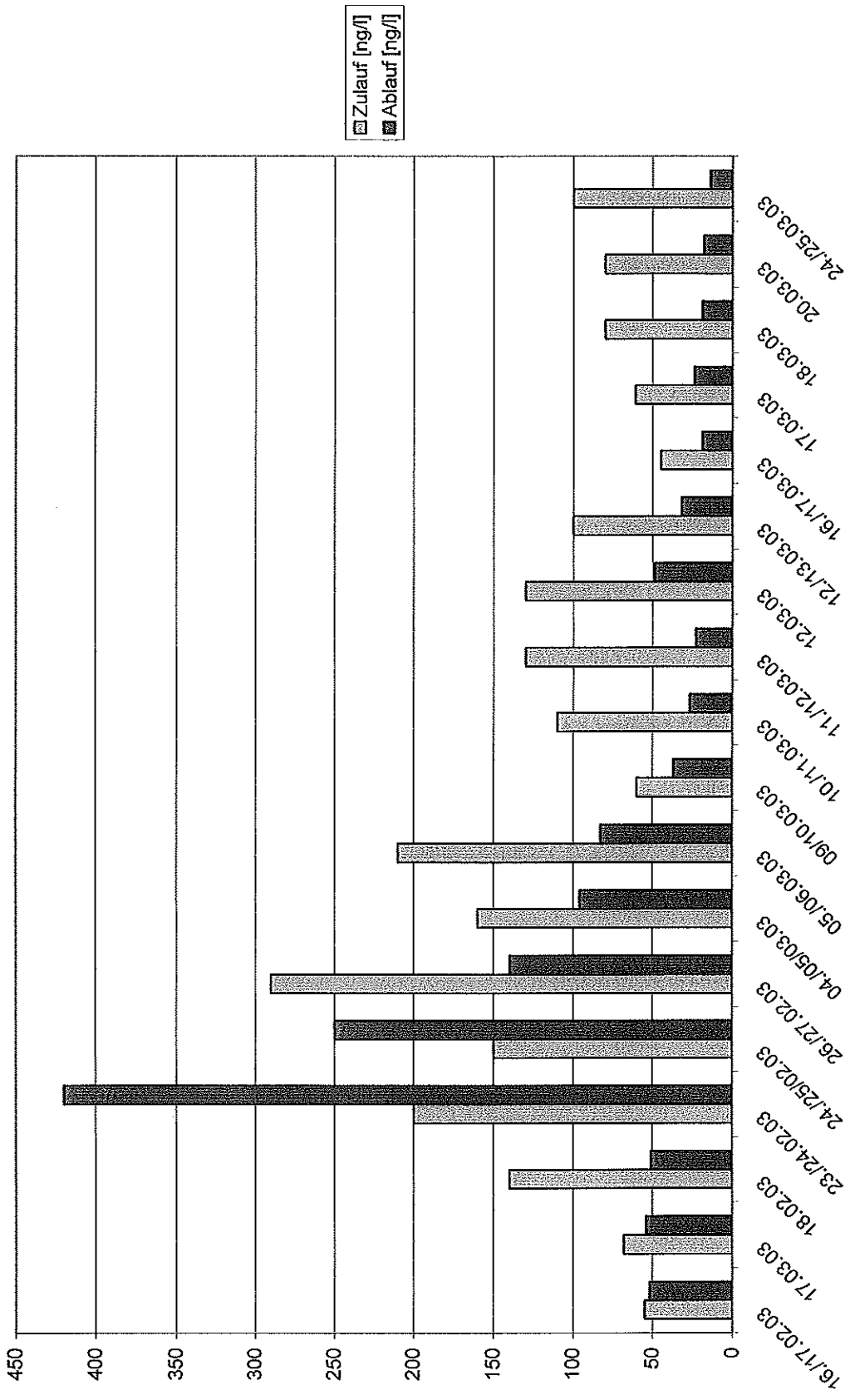


Abbildung 15 Kartenübersicht der einzelnen Probenahmestellen entlang der Ruhr

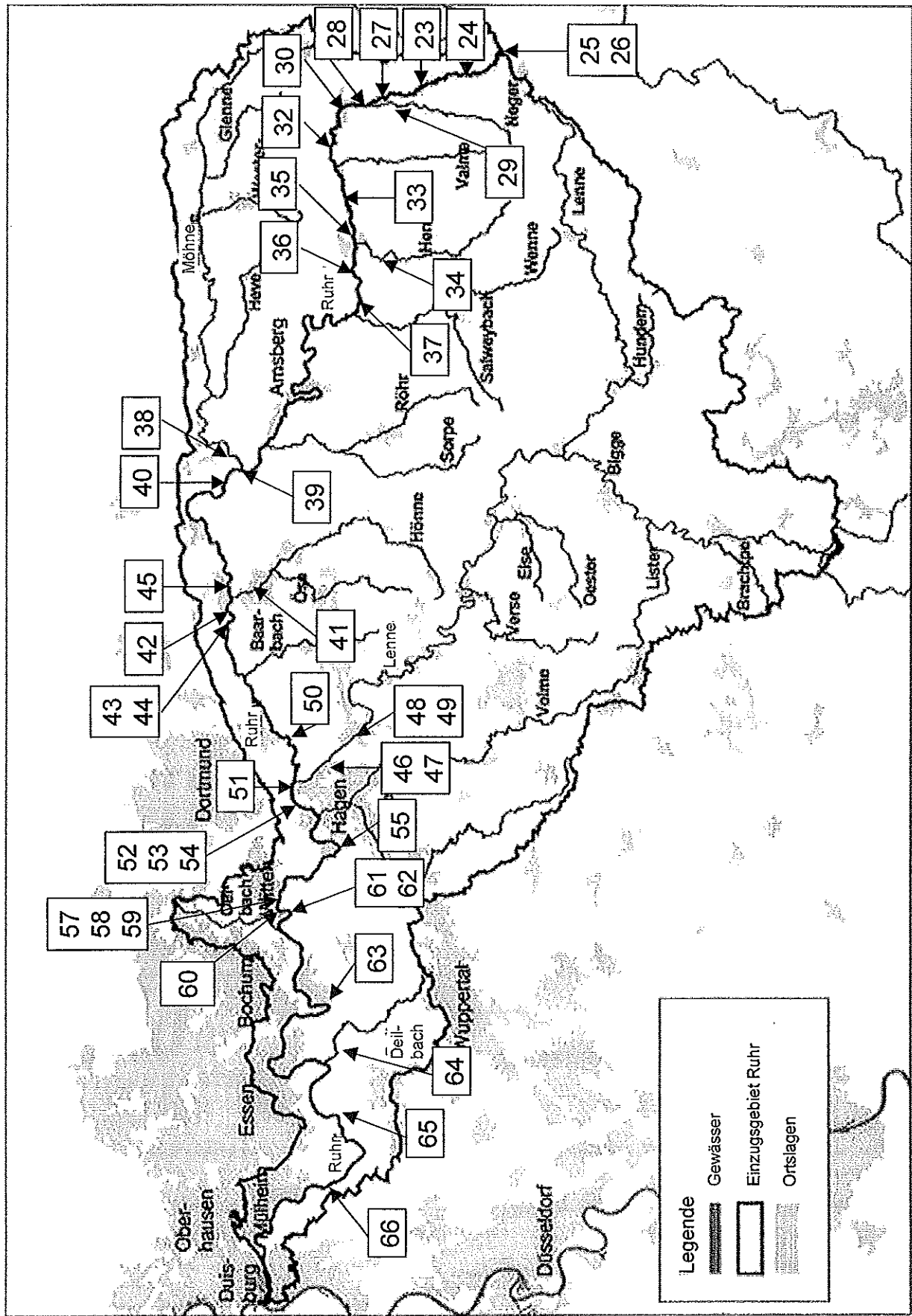


Abbildung 16 Zytotoxizität von TCP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem

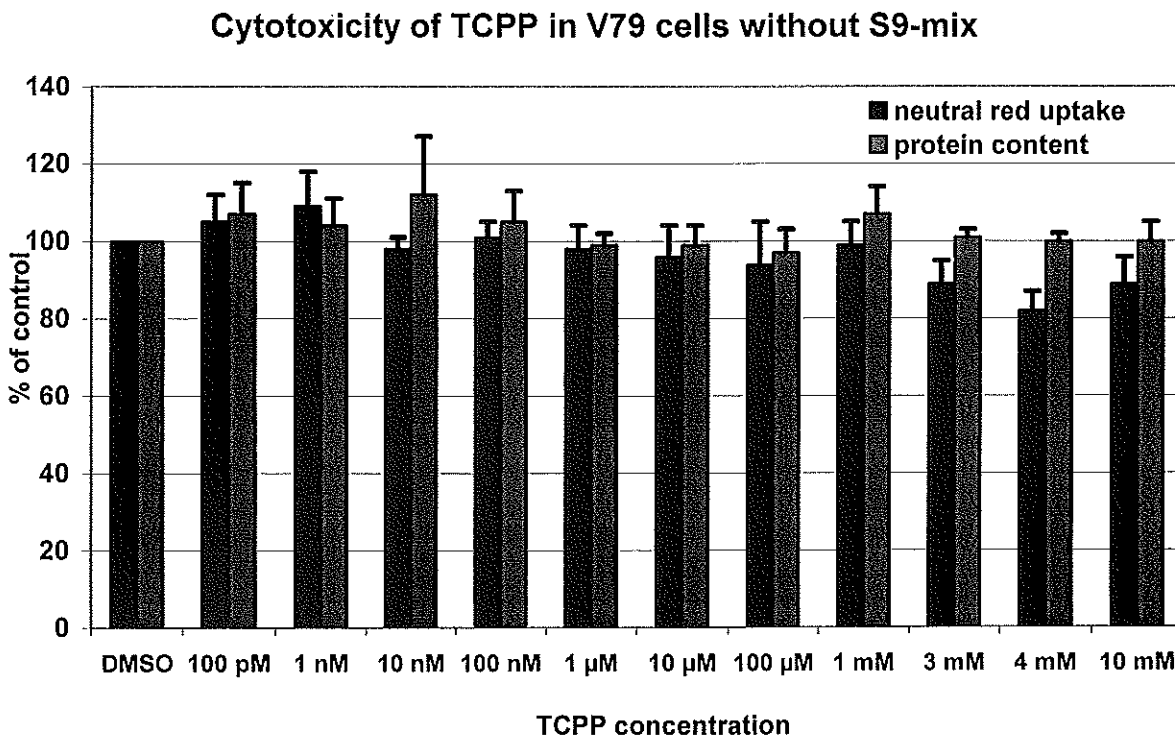
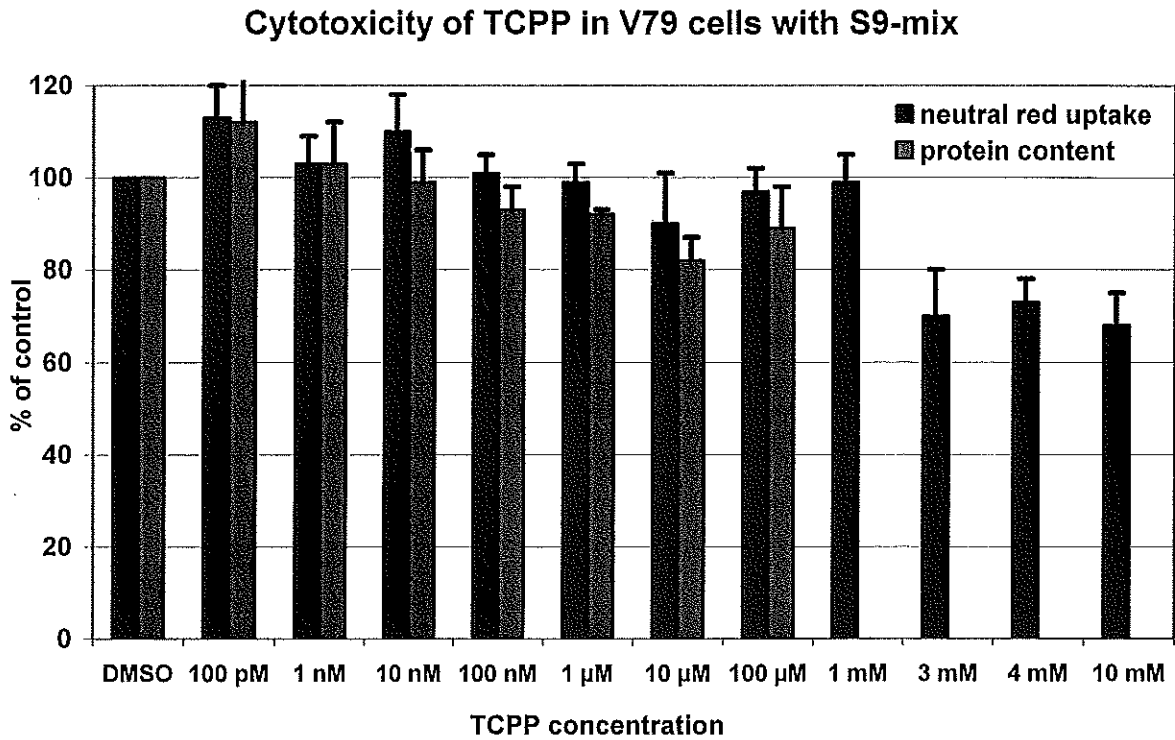
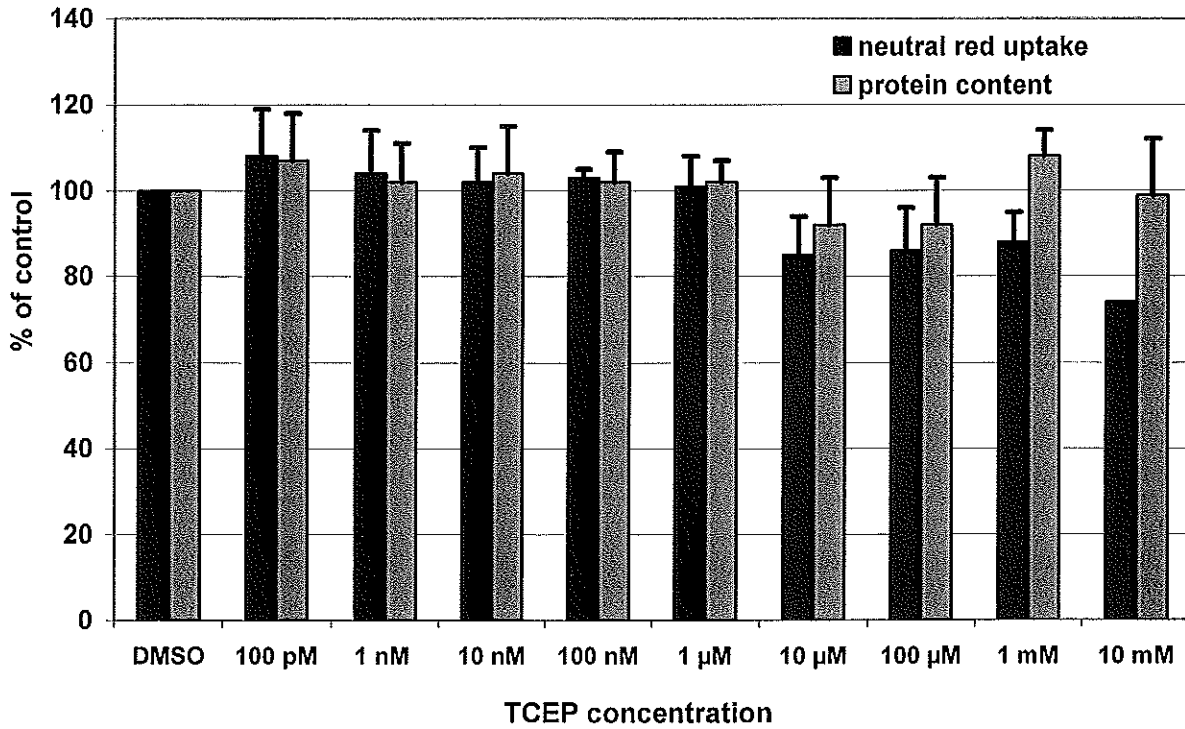


Abbildung 17 Zytotoxizität von TCEP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem

Cytotoxicity of TCEP in V79 cells with S9-mix



Cytotoxicity of TCEP in V79 cells without S9-mix

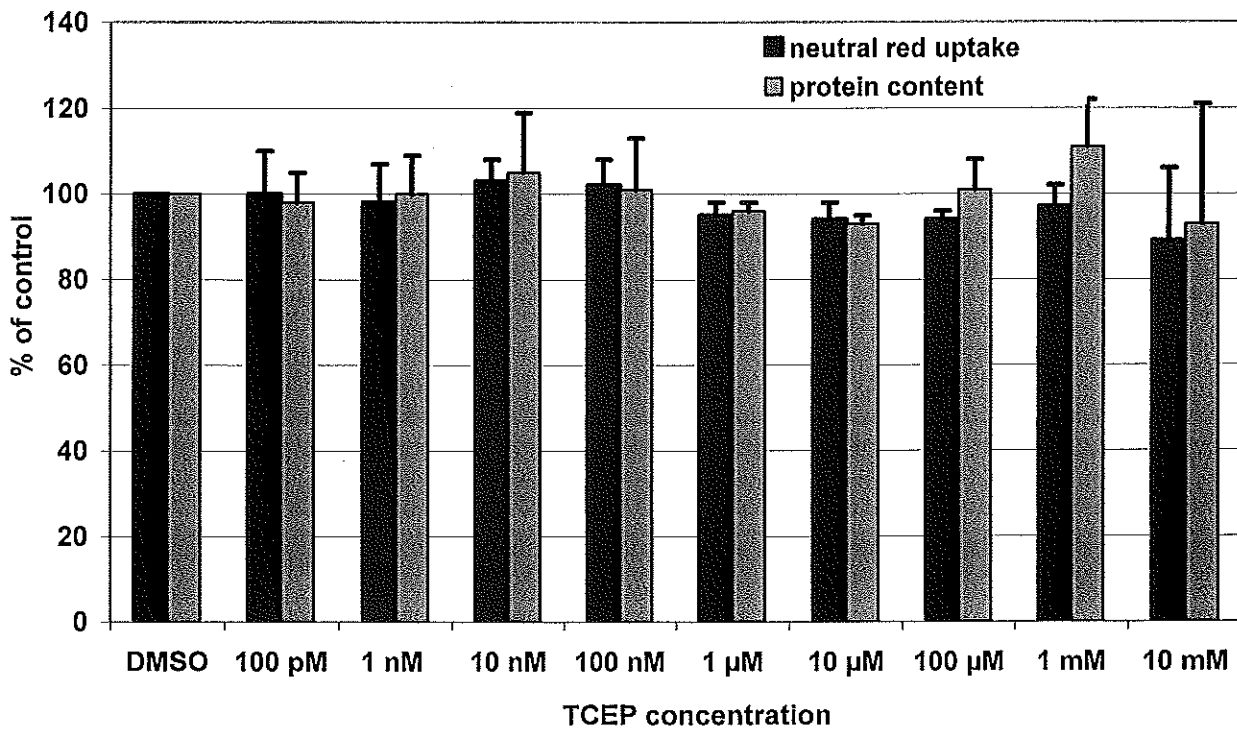


Abbildung 18 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCPP in V79-Zellen Median der Tail-Länge o, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)

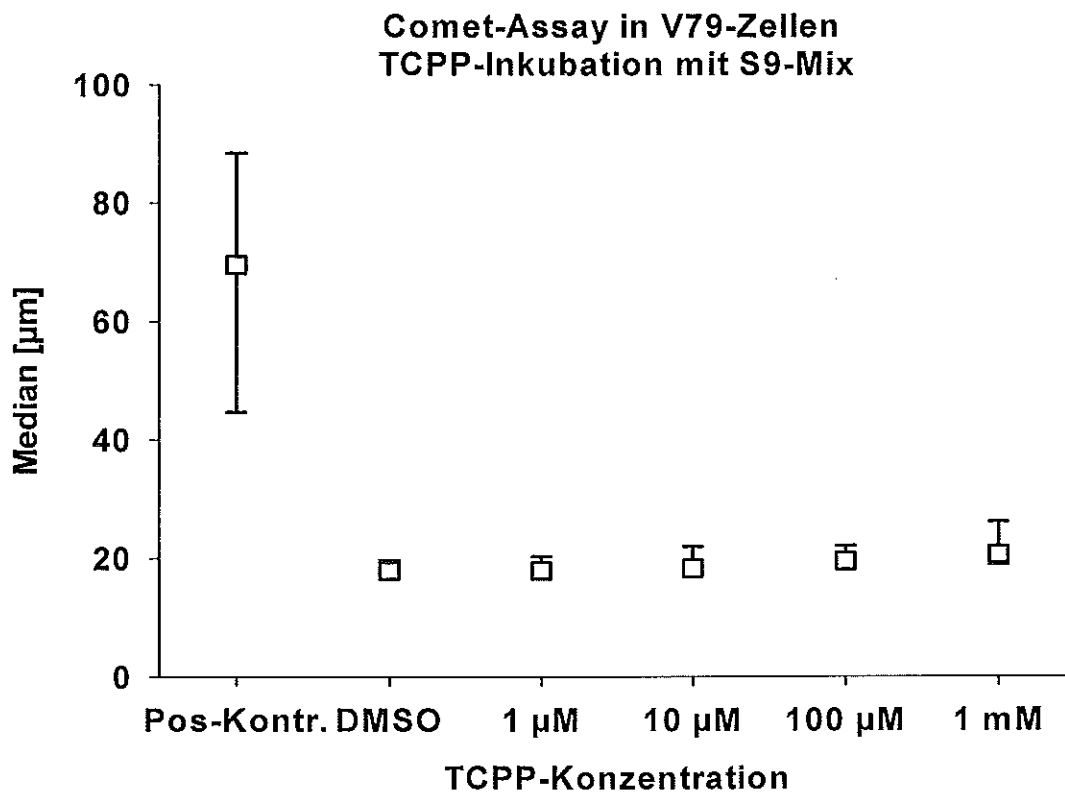
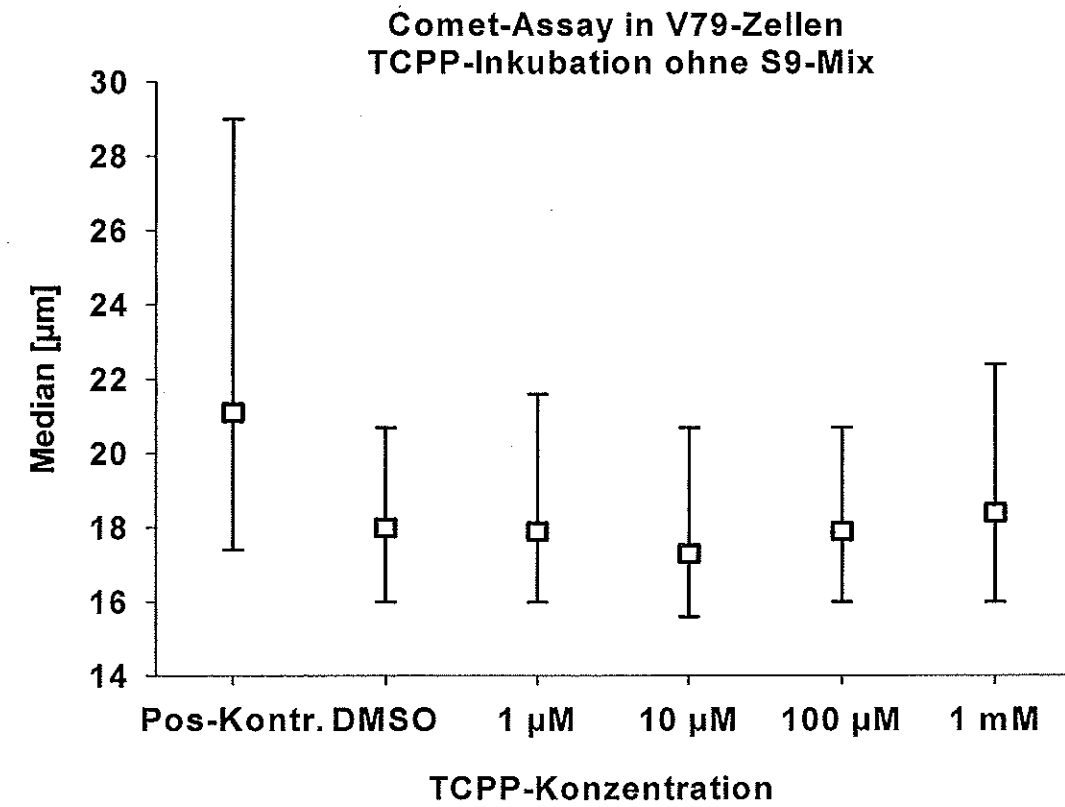


Abbildung 19 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCEP in V79-Zellen Median der Tail-Länge o, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)

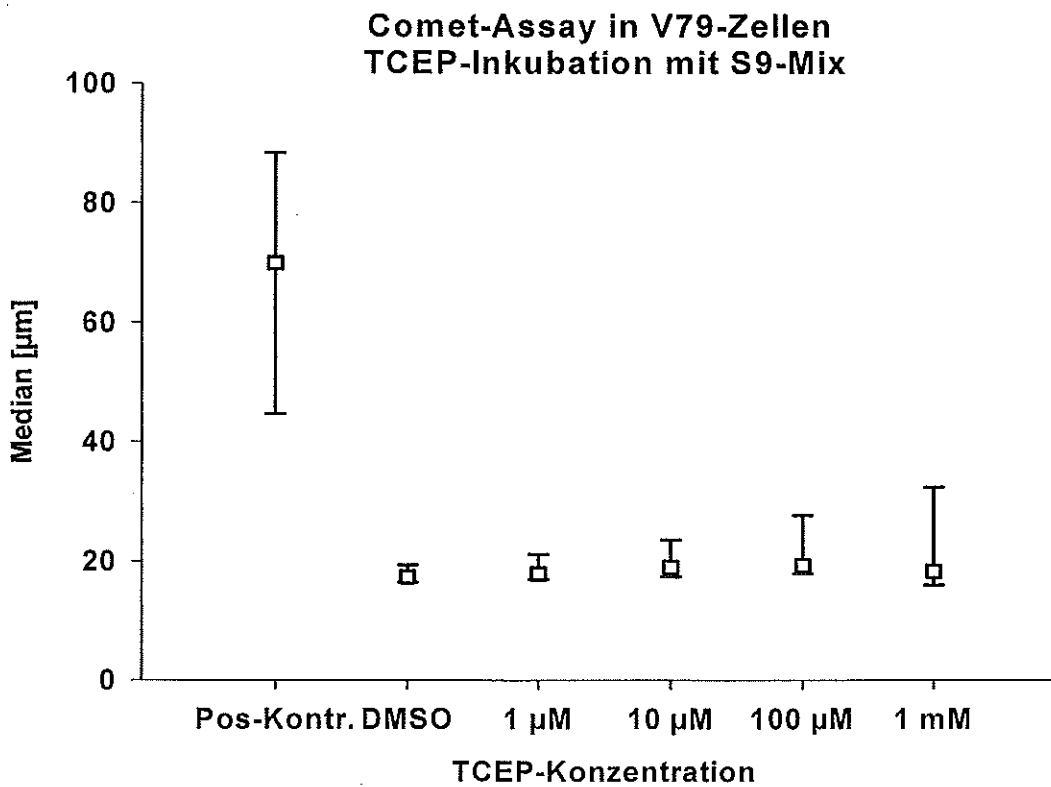
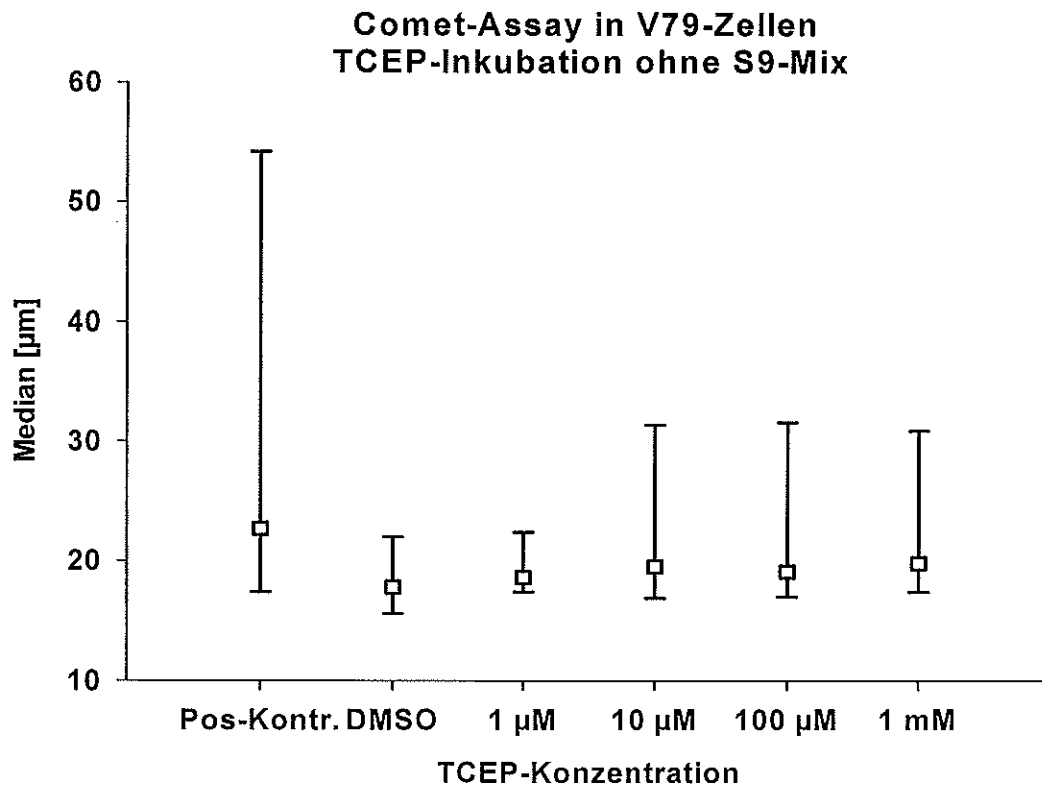


Abbildung 20 Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects

Incubation with Tris(2-chloropropyl)-phosphate = Fyrol PCF, Abbr. TCPF
with S9-mix addition

strain	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	186	8	43	3	196	4	394	23
positive control	1378	13	2751	227	2965	60	2580	290
DMSO control	161	40	40	3	192	6	438	18
100 nM TCPF	130	9	42	8	198	10	418	33
1 µM TCPF	152	20	47	7	193	16	377	30
10 µM TCPF	149	29	36	2	199	18	376	27
100 µM TCPF	94	20	39	5	203	10	423	49
1 mM TCPF	25	9	39	12	185	9	511	11
strain	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	519	42	12	3	11	2	13	1
positive control	1826	41	188	21	758	38	2066	81
DMSO control	509	37	10	2	15	3	16	3
100 nM TCPF	556	44	11	3	9	3	14	3
1 µM TCPF	489	37	10	2	10	4	16	4
10 µM TCPF	506	25	10	1	9	2	14	4
100 µM TCPF	497	60	11	1	13	3	18	1
1 mM TCPF	568	11	12	2	15	3	15	2

Abbildung 21 Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects

Incubation with Tris(2-chloropropyl)-phosphate = Fyrol PCF, Abbr. TCPPP

without S9-mix addition

strain	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	190	18	44	4	208	5	455	26
positive control	1427	4	2365	88	2279	70	2792	129
DMSO control	217	7	46	5	162	10	432	2
100 nM TCPPP	227	26	46	6	192	20	445	8
1 µM TCPPP	209	16	42	2	190	8	412	10
10 µM TCPPP	215	15	45	2	189	18	395	18
100 µM TCPPP	169	15	38	5	174	20	455	5
1 mM TCPPP	175	2	46	5	150	10	465	29
strain	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	382	60	14	2	13	2	20	1
positive control	1038	115	1273	118	117	10	2055	39
DMSO control	430	48	16	1	15	1	22	3
100 nM TCPPP	427	79	13	3	15	2	24	3
1 µM TCPPP	435	80	13	2	15	7	22	2
10 µM TCPPP	415	55	13	2	14	3	21	2
100 µM TCPPP	386	54	14	5	15	1	20	2
1 mM TCPPP	431	77	17	4	13	2	23	6

Abbildung 22 Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects

Incubation with Tris(2-chloroethyl)-phosphate = Fyrol TMCP, Abbr. TCEP
with S9-mix addition

strain	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	51	23	49	2	185	6	406	25
positive control	927	83	2277	150	2182	126	2002	95
DMSO control	71	37	43	3	186	15	421	19
100 nM TCEP	49	25	56	4	161	5	482	3
1 µM TCEP	67	43	50	2	166	2	433	7
10 µM TCEP	91	23	50	8	183	10	444	7
100 µM TCEP	22	2	52	11	178	10	434	24
1 mM TCEP	88	39	40	8	176	11	410	15
strain	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	516	11	17	2	7	2	10	1
positive control	1602	35	339	29	640	24	2279	61
DMSO control	530	27	15	4	7	1	12	1
100 nM TCEP	609	28	12	4	14	4	13	3
1 µM TCEP	600	19	14	2	8	2	15	1
10 µM TCEP	571	15	17	5	15	5	17	2
100 µM TCEP	516	10	13	6	10	4	10	1
1 mM TCEP	569	10	24	2	5	1	20	6

Abbildung 23 Salmonella typhimurium- (Ames-) assay for detection of mutagenic effects

Incubation with Tris(2-chloroethyl)-phosphate = Fyrol TMCP, Abbr. TCEP
without S9-mix addition

strain	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	99	16	31	6	204	7	321	29
positive control	452	5	1747	28	1252	36	864	14
DMSO control	104	7	35	3	198	17	362	9
100 nM TCEP	63	3	30	1	202	3	391	7
1 µM TCEP	72	12	33	2	195	9	341	9
10 µM TCEP	75	12	34	3	181	13	353	28
100 µM TCEP	74	16	33	2	207	11	358	10
1 mM TCEP	75	17	22	3	195	4	360	8
strain	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD	Revertants	SD
spontaneous rate	574	27	16	3	10	1	20	1
positive control	1476	39	1524	41	112	2	2045	39
DMSO control	553	22	14	2	8	3	17	2
100 nM TCEP	573	34	11	2	8	3	26	7
1 µM TCEP	589	32	16	2	6	1	66	2
10 µM TCEP	549	38	10	3	13	3	36	2
100 µM TCEP	500	54	16	2	9	2	16	5
1 mM TCEP	565	5	18	2	11	5	13	2

Abbildung 24 Östrogene Wirkung von TCP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1

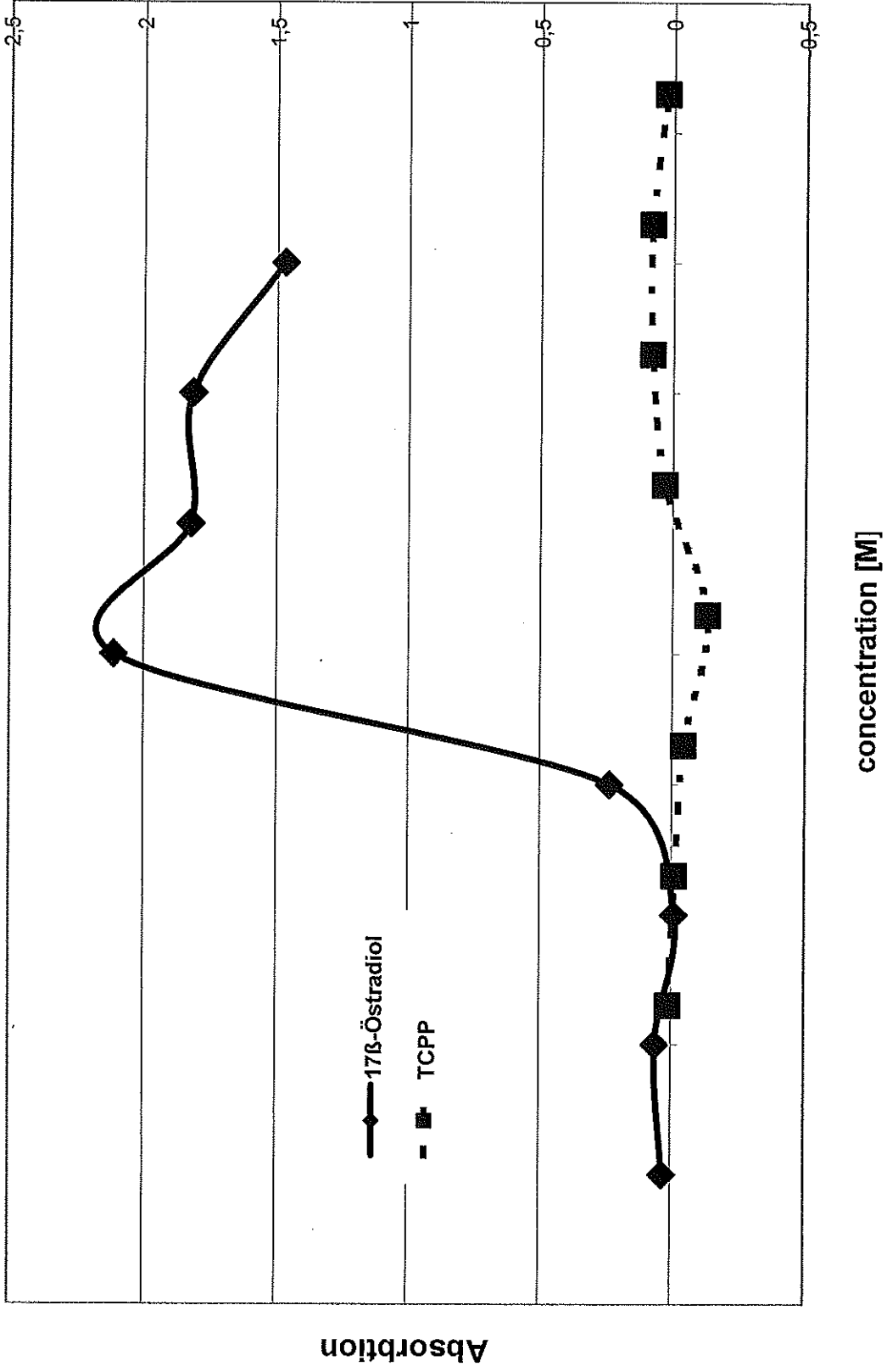


Abbildung 25 Östrogene Wirkung von TCPPP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2

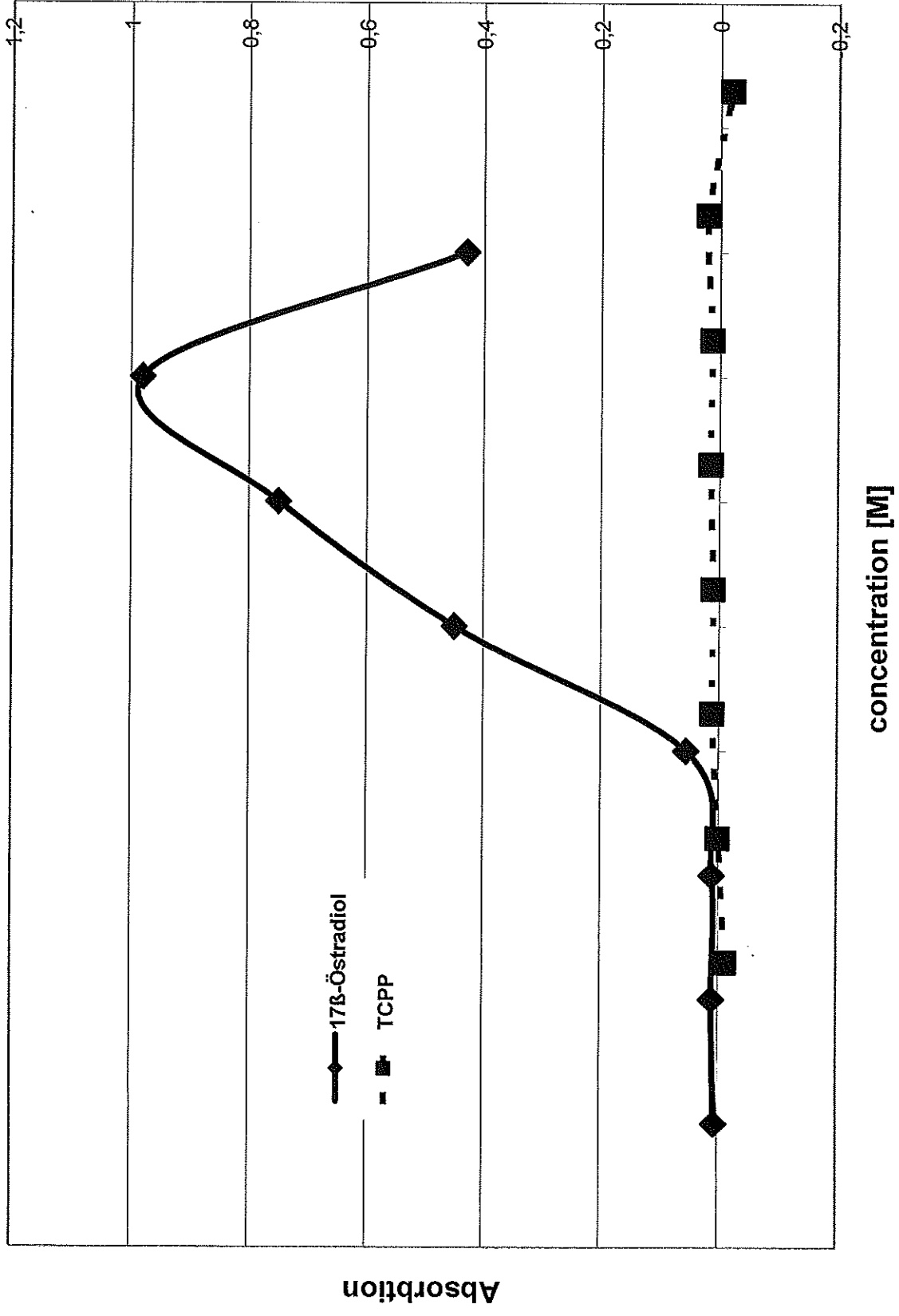


Abbildung 26 Östrogen Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1

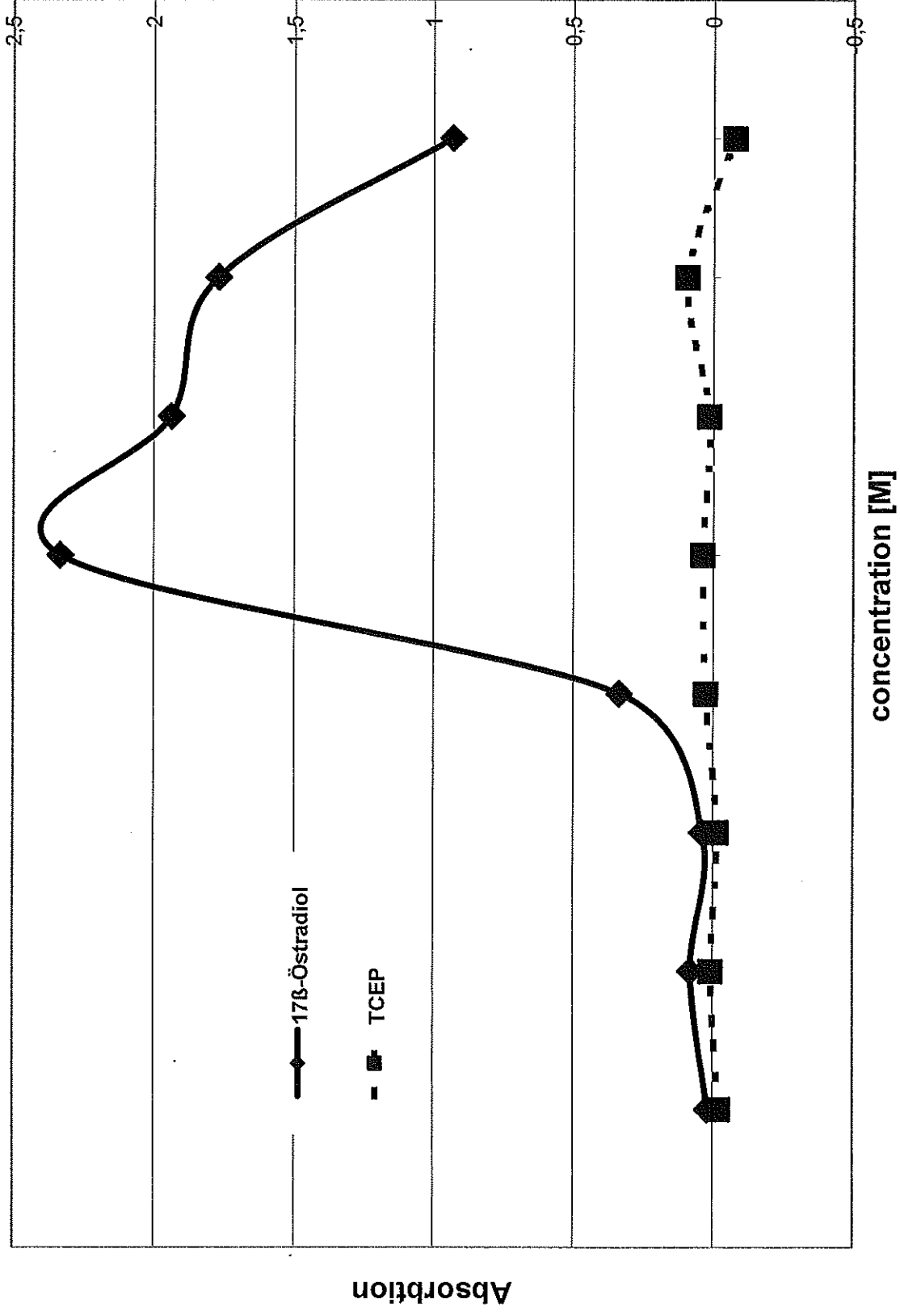


Abbildung 27 Östrogene Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2

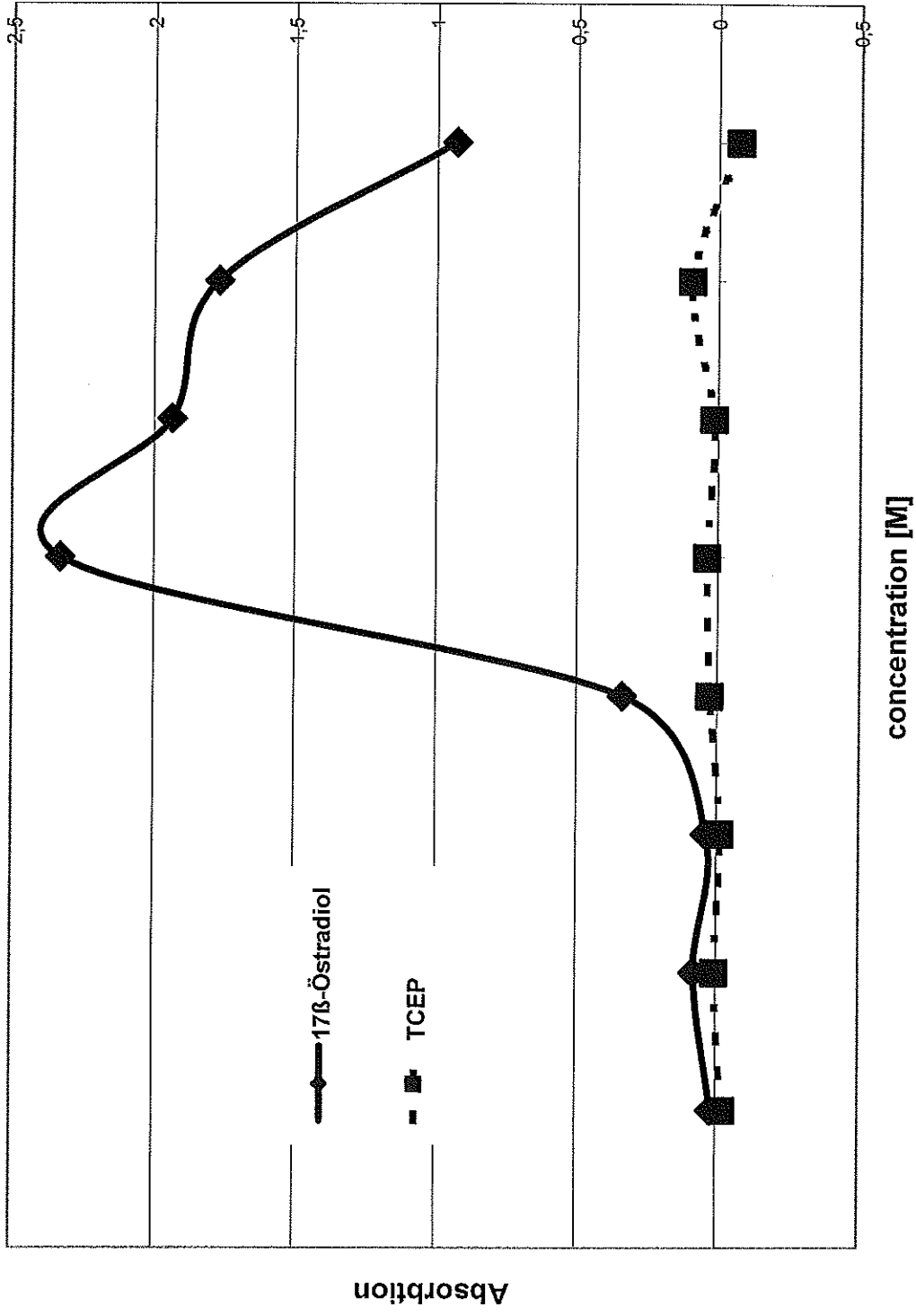


Abbildung 28 Alkalische Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen

