

Einträge und Quellen
von phosphororganischen Flammschutzmitteln
in Oberflächen- und Abwässern

► Impressum

Herausgeber:

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

Schwannstraße 3
40476 Düsseldorf

Telefon: (0211) 4566-0

Telefax: (0211) 4566-388

E-Mail: poststelle@munlv.nrw.de

Verantwortlich:

Dr. Harald Friedrich

Dr. Ulrike Grüter

Inhaltliche Rückfragen an:

E-Mail: harald.friedrich@munlv.nrw.de

E-Mail: ulrike.grueter@munlv.nrw.de

Telefax: (0211) 4566-946

Inhaltliche Bearbeitung:

Institut für Umweltforschung (INFU),
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6
44221 Dortmund

Prof. Michael Spiteller

E-Mail: spiteller@infu.uni-dortmund.de

Dr. Sebastian Zühlke

E-Mail: zuehlke@infu.uni-dortmund.de

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität

Dortmund (IfADo)

Ardeystr. 67

44139 Dortmund

Dr. Wolfram Föllmann

E-Mail: foellmann@arb-phys.uni-dortmund.de

FG Siedlungswasser- und Abfallwirtschaft,

Universität Essen

Universitätsstr. 15

45141 Essen

Dr. Kai Bester

E-Mail: kai.bester@uni-essen.de

Jens A. Andresen

E-Mail: jens.andresen@uni-duisburg-essen.de

Druck:

Gestaltung:

► Inhaltsverzeichnis

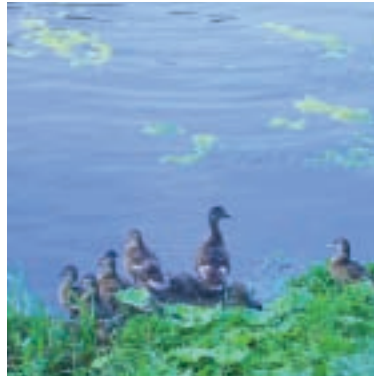
1	Einleitung	8
1.1	Halogenierte Organophosphate	11
1.1.1	Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP)	11
1.1.2	Tris(2-chlorpropyl)phosphat (TCPP)	12
1.1.3	Tris(dichlorpropyl)phosphat (TDCP)	13
1.2	Nichthalogenierte Organophosphate	14
1.2.1	Tributhylphosphat (TBP)	14
1.2.2	Triphenylphosphat (TPP)	15
1.2.3	Tris(butoxyethyl)phosphat (TBEP)	15
1.3	Eintrag in die Umwelt	16
1.4	Ökotoxikologische Daten der Organophosphate	18
2	Organophosphate in Oberflächenwässern am Beispiel der Ruhr	19
2.1	Einleitung	19
2.2	Analytik	22
2.3	Ergebnisse	22
2.3.1	Halogenierte Flammschutzmittel	22
2.3.2	Nichthalogenierte Organophosphate	24
2.4	Diskussion	27
3	Organophosphate im Dortmunder Abwassernetz	28
4	Organophosphate in Kläranlagen	31
4.1	Kläranlage in Köln-Stammheim	31
4.1.1	Einleitung	31
4.1.2	Analytik	31
4.1.3	Ergebnisse	31
4.2	Kläranlage in Dortmund-Deusen	40
4.2.1	Einleitung	40
4.2.2	Ergebnisse	40
4.3	Vergleich verschiedener Kläranlagen in Hinsicht auf TCPP	41
4.4	Diskussion	42

5	Toxikologische Daten	43
5.1	Einleitung	43
5.2	Zytotoxizitätsassay: Neutralrot (NR)-Aufnahme-Assay	43
5.3	Genotoxizitäts-Assay: Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)	44
5.4	Mutagenitätsassay: <i>Salmonella typhimurium</i> Mutagenitätsassay (Ames-Test)	46
5.5	Östrogene Aktivität	47
5.5.1	Rekombinanter Hefeassay	49
5.5.2	Stimulierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen	50
5.5.3	Ergebnisse	51
5.6	Diskussion	52
6	Analytischer Teil	53
6.1	Festphasenextraktion	55
6.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion	55
6.3	Klärschlammproben	59
7	Zusammenfassung	60
8	Literatur	62
9	Anhang	67

► Abkürzungsverzeichnis

BG	Bestimmungsgrenze
FSM	Flammschutzmittel
GC	Gaschromatographie
KA	Kläranlage
LLE	Flüssigextraktion
M/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze
NOEC	No observed effect concentration
NRW	Nordrhein-Westfalen
RSD	Relative Standardabweichung
R _t	Retentionszeit
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Festphasenextraktion
TBEP	Tris(butoxyethyl)phosphat
TCEP	Tris(chlorethyl)phosphat
TCPP	Tris(2-chlorpropyl)phosphat
TDCP	Tris(dichlorpropyl)phosphat
TiBP	Tri-iso-butylphosphat
TnBP	Tri-n-butylphosphat
TPP	Triphenylphosphat

► 1 Einleitung



► 1 Einleitung

Flammschutzmittel (FSM) sind organische oder anorganische Verbindungen, welche insbesondere Holz und Holzwerkstoffe, Kunststoffe und Textilien flammfest machen sollen. Sie verhindern die Entflammung der zu schützenden Stoffe, behindern die Entzündung und erschweren die Verbrennung [Römpp 1997].

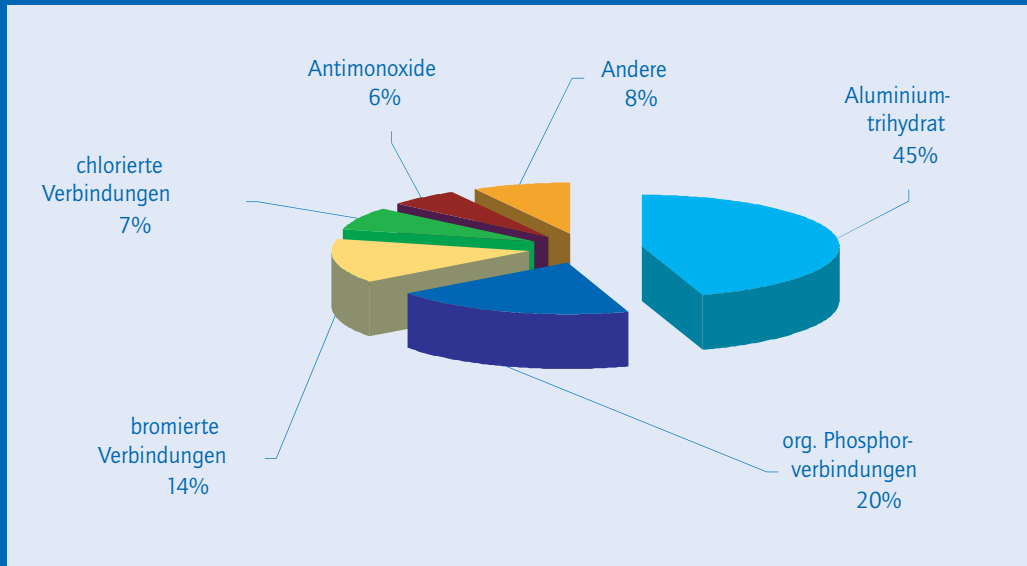
Die für Holz verwendeten FSM werden dort auch Feuer- oder Brandschutzmittel genannt. Sie werden meist auf das Holz aufgebracht und können feuererstickend, verkohlungsfördernd sowie sperr- und dämmschichtbildend wirken. Der breite Einsatz und die zunehmende Verwendung von Kunststoffen erfordert auch hier eine genügende Flammfestigkeit, da z.B. Polyethylen und Polypropylen eine einmal gestartete Verbrennung von selbst unterhalten. Der Einsatz von Flammschutzadditiven erfolgt bei brennbaren Polymeren bereits während der Herstellung, wobei dies mit den gewünschten Eigenschaften des Kunststoffes vereinbar sein muss. Die in Kunststoffen eingesetzten FSM kann man in vier wesentliche Gruppen unterteilen [Römpp, 1997]. Spezielle anorganische Verbindungen, wie Aluminiumhydroxidhydrate oder Ammoniumphosphate werden ebenso eingesetzt wie halogenierte organische Verbindungen (z.B. Chlorparaffine, bromierte Diphenylether oder Tetrabrombisphenol A). Organische Phosphorverbindungen (Phosphate, Phosphonate) sowie deren halogenierten Derivate (z.B. Tris(2-chlorethyl)-phosphat, Tris(2-chlorpropyl)-phosphat, Tris(2,3-dibrompropyl)-phosphat) bilden die weiteren Gruppen der eingesetzten FSM. Phosphorverbindungen hemmen den Verbrennungsprozess von Kunststoffen durch die Ausbildung einer verkohlten Deckschicht an der Polymeroberfläche durch die entstehenden Phosphorsäure [Römpp, 1997]. Auf diese Weise wird die Sauer-



stoffzufuhr behindert und das Fortschreiten der oxidativen Zersetzung erschwert. Die Kombination von Phosphorsäureestern mit Füllstoffen wie z.B. Aluminiumtrihydrat, führt im Brandfall zur Ausbildung von festen Schlackeschichten, welche ebenfalls die Sauerstoffzufuhr unterbrechen. Gleichzeitig wirken die Phosphorsäureester, in ihrer Eigenschaft als Weichmacher, der Versprödung des Kunststoffes durch anorganische Füllstoffe entgegen [Metzger & Möhle, 2001]. Die oftmals in Kunststoffen verwendeten Halogenverbindungen setzen bei erhöhter Temperatur Halogenatome frei, welche die Verbrennung unterhaltende Radikale abfangen und somit die Kettenreaktion abbrechen.

Eine Marktstudie für das Jahr 1998 gibt den weltweiten Gesamtverbrauch an FSM mit 1,14 Millionen Tonnen an [Davenport et al., 1999]. Allein in Deutschland wurden 1997 rund 95.000 t Flammschutzmittel verwendet. Ca. 15-20% dieser Menge wird durch halogenierte und nichthalogenierte, organische Phosphatverbindungen repräsentiert. In Westeuropa wurden 1998 rund 360000 Tonnen FSM verbraucht, die Anteile einzelner Substanzgruppen sind in Abbildung 1 dargestellt [Metzger & Möhle, 2001]. 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%.

Abbildung 1 Flammenschutzmittelverbrauch in Westeuropa 1998



Auslöser des stetig steigenden Verbrauchs an Flamm-
schutzmitteln war ein höheres Sicherheitsbedürfnis beson-
ders in öffentlichen Räumen, sowie der Ersatz von früher
verwendeten, toxikologisch und ökotoxikologisch beden-
klichen Flammenschutzmitteln, wie z.B. bromierten Substan-
zen [Ljung 1996]. Die bromierten Verbindungen können
die Umwelt auf Grund ihres aktiven Eingriffs in den
Hormonhaushalt belasten. Die hohe Lipophilie kann zu-
dem zu einer Anreicherung dieser Substanzen in Umwelt
und Nahrungskette führen. Des Weiteren können aus sämt-
lichen halogenierten FSM unter hoher Temperatur Dioxine
und Furane entstehen. Das Umweltbundesamt fasste die
FSM in insgesamt fünf Gruppen zur toxikologischen Be-
deutung zusammen [UBA, 2001]. Während auf die Anwen-
dung von bromierten FSM verzichtet werden sollte, sind
einige anorganische Substanzen unproblematisch (z.B.
Aluminiumtrihydroxid). Zur Anwendung in Polymeren
sind jedoch gerade die Eigenschaften der organischen
FSM, besonders der Phosphorsäureester essentiell.

Das Anwendungsspektrum der FSM ist enorm. Sie werden
hauptsächlich in folgenden Bereichen eingesetzt [AssTech,
2004]:

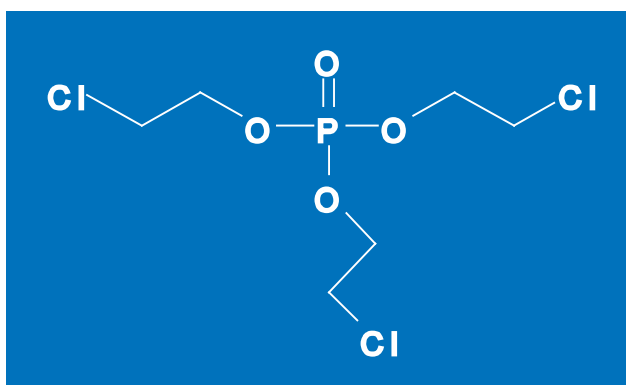
- | | |
|-----------------------|---|
| Gebäude : | Dämmungsmaterial, Wasserrohre,
Fassadenverkleidung, Kunststoff-
folien, Harze |
| Elektrogeräte : | Monitorgehäuse, Kabel, Steck-
dosen, Sicherungskästen, Leiter-
platten, Computer, Haushaltsgeräte |
| Möbel und Textilien : | Polstermöbel, Überzüge,
Matratzen, Vorhänge, Teppiche,
Schaumstoffe |
| Fortbewegungsmittel : | Sitzpolster, Sonnenblenden,
Teppiche, Innenverkleidungen |

Der größte Abnehmer für FSM ist die Kunststoffindustrie. Organische FSM können bis zu 30% und anorganische sogar bis zu 80% des Kunststoffes ausmachen [Brüggemann, 2004; AssTech, 2004].

Chlorierte Alkyl- und Arylphosphate finden als Flamm- schutzmittel hauptsächlich in Kunststoffen, Baustoffen, Textilien, Papier, Hydraulikflüssigkeiten sowie als Weich- macher in Polyurethanschäumen und -kunststoffen Anwen- dung [Leisewitz et al., 2000a,b; Ljung, 1996; Sagunski et al., 1997; Friedle, 2001; Kawagoshi et al., 1996; Ingerowski et al., 2001]. Billige Massenkunststoffe wie Polyethylen und Polypropylen können nur unter Verwen- dung von FSM in Bereichen mit hohem Brandrisiko- potenzial, wie Elektro- und elektronische Geräte, einge- setzt werden.

1.1 Halogenierte Organophosphate

1.1.1 Tris(2-chlorethyl)phosphat TCEP

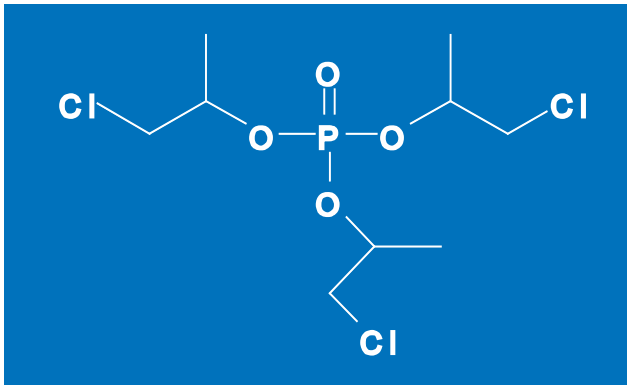


Summenformel :	$C_6H_{12}Cl_3O_4P$
CAS -Nummer :	115 -96-8
Molare Masse [g/mol] :	283,95
LogPow :	1,63
Wasserlöslichkeit [g/l] :	0,9 (25 °C)

TCEP dient neben seinen Eigenschaften als FSM auch als Weichmacher und wird hauptsächlich in Polyurethan- schaumstoffen, Klebstoffen, Lacken, Farben und weiteren Beschichtungsmitteln verwendet [BUA, 1988]. TCEP wird vor allem als Weichmacher und Viskositätsregulator mit flammhemmenden Eigenschaften eingesetzt (Pro- duktblatt Hoechst Reg.-Nr. 6.2.). Die Diskussion um die Problematik der polybromierten Biphenylether führte in der Vergangenheit zur vermehrten Produktion von TCEP.

Der geringe LogP_{OW} von 1,63 und die Wasserlöslichkeit von 0,9 g/l deuten auf eine sehr mobile Verbindung hin, eine hohes Bioakkumulationspotenzial liegt nicht vor. Die Absorptionsneigung an Gewässerschwebstoffen wurde nach ARGE [2000] auf 200 – 400 l/kg (Schwebstoff-Wasser- Verteilungskoeffizient) abgeschätzt, was einer Feststoff- absorption von nur wenigen Prozent entspricht. Der Einsatz von TCEP wurde auf Grund tierexperimentell ermittelter Cancerogenität und Neurotoxizität [Industrie B.d.c. 1995] in den letzten Jahren eingeschränkt und vermehrt auf TCPP zurückgegriffen [Fookan et al., 2000]. In der EU wird die Verbindung nicht mehr produziert und der Einsatz damit dramatisch reduziert. Dennoch kann der Import von TCEP- haltigen Gütern zum Freisetzen der Verbindung auch in Europa führen. Während der Eintrag in die Umwelt durch Abluft bei der Produktion und Verwendung von TCEP ver- mutlich gering ist, besteht auf Grund der Flüchtigkeit der Verbindung die Gefahr der langsamen Freisetzung aus TCEP-haltigen Materialien. Die Verwendung solcher Pro- dukte führt über das Abwasser zum Eintrag der Verbindung in die Vorfluter, und auch fernab von Produktionsstätten wird TCEP ins Oberflächenwasser eingetragen [BUA 1988]. Zudem kann der Eintrag in die Umwelt über Deponiesickerwasser erfolgen [BUA 1988].

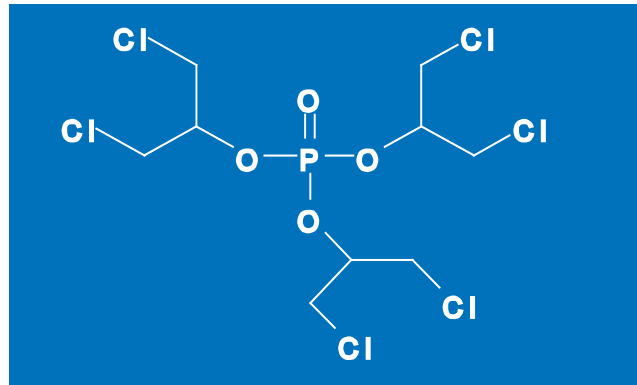
1.1.2 Tris(2-chlorpropyl)phosphat (TCPP)



Summenformel :	$C_9H_{18}Cl_3O_4P$
CAS -Nummer :	13674 -84-5
Molare Masse [g/mol] :	327,55
LogPow :	2,89
Wasserlöslichkeit [g/l] :	1,6 (20 °C)

Heute wird TCPP als Ersatz für das in der Vergangenheit häufig eingesetzte TCEP verwendet, welches im Tierexperiment neurotoxische Wirkung zeigte [Industrie B.d.c. 1995]. Vergleichbare Untersuchungen für TCPP gibt es derzeit nicht. Das Anwendungsspektrum entspricht weitestgehend dem von TCEP. TCPP wird somit unter anderem auch für Schaummaterialien (Polyurethanschäume) in Matratzen und Polstermöbeln eingesetzt [UBA, 2001]. Auf Grund der verzweigten Alkylketten besitzt TCPP einen höheren LogP_{ow} als TCEP und könnte somit etwas besser an Sediment oder Schwebstoffen sorbieren. Die Absorptionsneigung von TCPP an Gewässerschwebstoffen wurden nach ARGE [2000] auf 1000-2400 l/kg (Schwebstoff-Wasser-Verteilungskoeffizient) abgeschätzt, was einer Feststoffabsorption von nur wenigen Prozent entspricht. Über das kommunale Abwasser könnte TCPP ebenfalls ins Oberflächenwasser gelangen. Die Bewertung von FSM aus toxikologischer und ökotoxikologischer Sicht ergab, dass es sinnvoll ist den Einsatz von TCPP zu mindern und die Substitution durch eine verträglichere Verbindung angestrebt werden sollte [UBA, 2001].

1.1.3 Tris(dichlorpropyl)phosphat (TDCP)



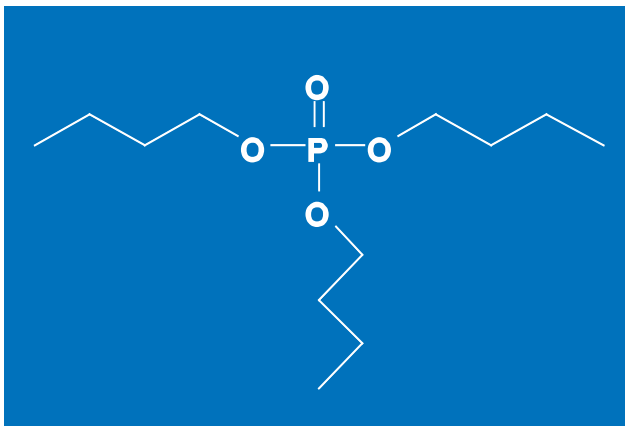
Summenformel :	$C_9H_{15}Cl_6O_4P$
CAS -Nummer :	13674 -87-8
Molare Masse [g/mol] :	430,91
LogPow :	3,65
Wasserlöslichkeit [g/l] :	<0,1 (20 °C)

TDCP wird vorwiegend als Weichmacher mit flammhemmenden Eigenschaften in Polyurethanen eingesetzt. Polyurethanschaum findet in der Textil-, Bau- und Möbelindustrie und im Innenausbau der Automobilindustrie (Dachhimmel, Türverkleidung) Verwendung. Der Einsatz von TDCP wurde in den letzten Jahren zunehmend eingeschränkt, die Verbindung wird jedoch für Spezialprodukte weiterhin verwendet.

1.2 Nichthalogenierte Organophosphate 1.2.2 Triphenylphosphat (TPP)

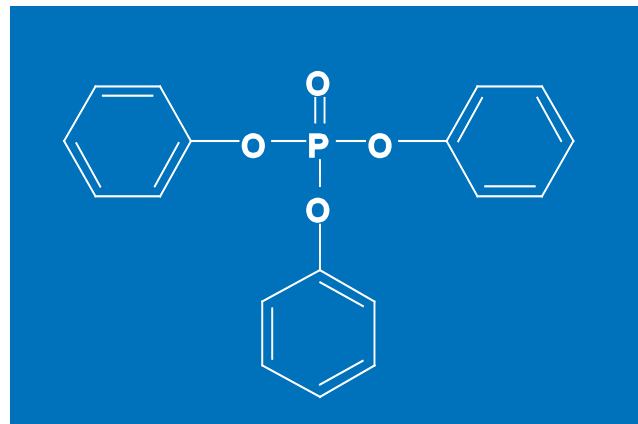
Bei Tributylphosphat, Triphenylphosphat und Tris(butoxyethyl)phosphat handelt es sich nicht um FSM. Aufgrund der Umweltrelevanz und der strukturellen Ähnlichkeit mit TCEP und TCPP wurden diese Verbindungen in die analytische Methode integriert und bei einigen Untersuchungsreihen mit erfasst.

1.2.1 Tributylphosphat (TBP)



Summenformel :	$C_{12}H_{27}O_4P$
CAS - Nummer :	126-73-8
Molare Masse [g/mol] :	266,16
LogPow :	3,82
Wasserlöslichkeit [g/l] :	6 (20 °C)

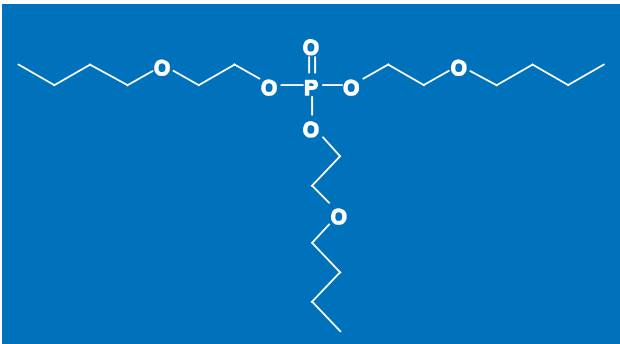
TBP wird als Lackbestandteil und ebenso wie TPP als Weichmacher von plastischen Massen eingesetzt. Der mittlere LogP_{ow} von 3,82 lässt bei der guten Wasserlöslichkeit noch eine hohe Mobilität der Verbindung vermuten. Nach Fookan et al. [1997] ist jedoch mit einer geringen Anreicherung im Boden zu rechnen. Laut BUA [1991] wird TBP vornehmlich in Hydraulikflüssigkeiten eingesetzt, da diese Öle nicht korrosiv sind. Weitere Anwendungsgebiete sind die Betonherstellung (als Entschäumer) sowie die Textil- und Papierindustrie.



Summenformel :	$C_{18}H_{15}O_4P$
CAS - Nummer :	115-86-6
Molare Masse [g/mol] :	326,07
LogPow :	4,70
Wasserlöslichkeit [g/l] :	0,001 (25 °C)

TPP wird wie TBP als Weichmacher von plastischen Massen als Lackbestandteil eingesetzt. Zudem findet es Anwendung in Gehäusen von elektronischen Geräten (z.B. Monitoren).

1.2.3 Tris(butoxyethyl)phosphat (TBEP)



Summenformel :	C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P
CAS -Nummer :	78-51-3
Molare Masse [g/mol] :	398,24
LogPow :	3,00
Wasserlöslichkeit [g/l] :	0,002 (25 °C)

TBEP findet Verwendung als Weichmacher in Bodenpflegemitteln, Kunststoffen und Gummi. Zudem wird TBEP häufig Schaumstoffen zugesetzt [WHO, 2000]. Das weltweite Produktionsvolumen für TBEP wird auf bis zu 6000 t/Jahr geschätzt und auf Grund der unvollständigen Eliminierung während der Klärwerkspassage kann es zum Eintrag in die Oberflächengewässer kommen [WHO, 2000].

1.3 Eintrag in die Umwelt

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], Skandinavien [Paxeus, 1996; Nilsson et al., 2001; Carlsson et al., 2000], Frankreich [Deroux et al., 1996], den Niederlanden [Stee, et al., 1999; Hankemeier et al., 1999] und Deutschland [Fries & Püttmann 2001; Prösch et al., 2000; ARGE, 2000] zeigen. Abbildung 2 veran-

schaulich mögliche Eintragspfade der FSM in Wasser und Luft, sowie deren Verbleib in der Umwelt.

Da die Analyten mit bis zu 30 Gew. - % [AssTech, 2004; Friedle, 1999] in den Zielprodukten enthalten sind, können sie während der Produktion und nach Fertigstellung der Produkte freigesetzt werden. Sowohl die Emission in die Innenraumluft [Hansen et al., 2001; Nilsson et al., 1997] als auch der Austrag in Abwasser [ARGE, 2000; Metzger & Möhle, 2001] ist nachweisbar.

Das in erheblichem Umfang in Bauprodukten als Flamm- schutzmittel eingesetzte TCPP zeigte insbesondere in Montage- und Dämmschäumen erhebliche Emissionsraten zwischen 40 und 70 µg/m³h (UFOPLAN, 2004). Für TPP ergaben sich in einem Montageschaum Emissionsraten von 130 ng/m³h (UFOPLAN, 2004). Angaben aus der Literatur weisen darauf hin, dass die FSM in der Innenraumluft im wesentlichen partikelgebunden vorliegen [Clausen et al. 1999].

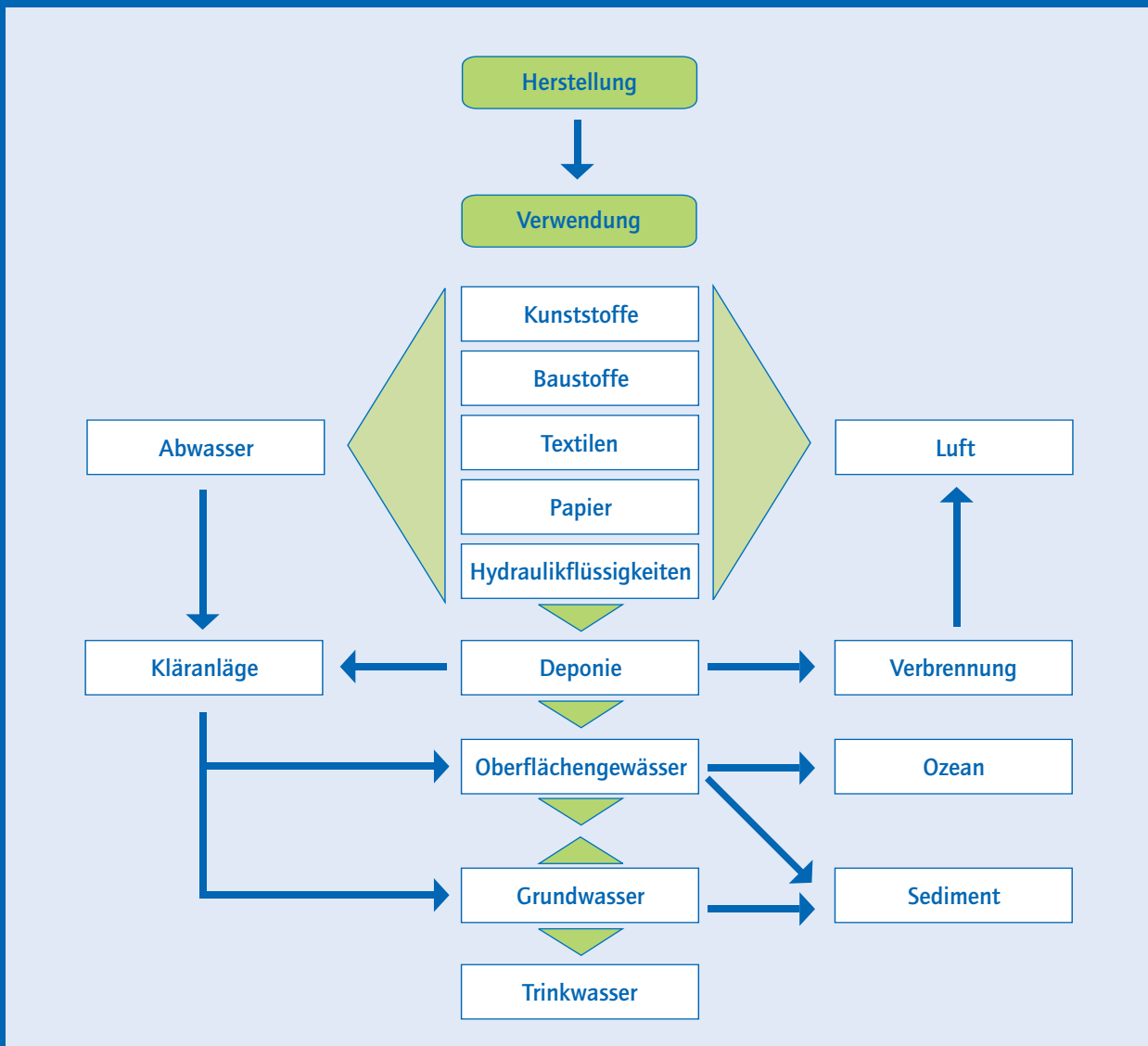
In das Abwasser können die phosphororganischen Verbindungen direkt über den Einsatz in Reinigungsmitteln (z.B. TBEP) oder über den Hausstaub gelangen [Hansen et al, 2001]. Durch Wasch- und Reinigungsvorgänge werden die Organophosphate dann ins Abwasser eingetragen. Da FSM auch in Kunststoffen für Wasserrohre eingesetzt werden [Asstech, 2004], kann die Migration von FSM aus Hausinstallationen (Spülenanschluss) ins Wasser nicht ausgeschlossen werden. 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 [ARGE, 2000].

Der vielfältige Einsatz der Flamm- schutzmittel führt dazu, dass die organisch substituierten Triphosphate ubiquitär nachweisbar sind. Für Deutschland liegen für die hessi- schen Fließgewässer und Kläranlagenabläufe umfangreiche Untersuchungen für die vier Verbindungen Trimethyl-, Triethyl-, Tributyl- und Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) aus den Jahren 1992 und 1994 bis 1996 vor [Fookan et al.

1997]. Eine Kontamination durch Trimethylphosphat lag nur in einem untersuchten Kläranlagenablauf mit $0,6 \mu\text{g/l}$ vor (Bestimmungsgrenze: $0,5 \mu\text{g/l}$). Triethylphosphat wurde in Konzentrationen $<0,1 - 0,4 \mu\text{g/l}$ gefunden. Nur in einem industriellen Kläranlagenablauf wurden einmalig $6 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen. Für TBP wurden in der Regel Werte im Bereich kleiner der Nachweisgrenze und $1 \mu\text{g/l}$ gefunden. TCEP wurde in den untersuchten kommunalen Kläranlagenabläufen mit $0,2 - 4,7 \mu\text{g/l}$ gefunden, dagegen in

industriellen Kläranlagen mit Spitzenwerten bis $150 \mu\text{g/l}$ detektiert. In den Fließgewässern lagen die Werte zwischen $0,1 - 1,3 \mu\text{g/l}$. Die Werte, die in Hessen für die vier Verbindungen analysiert wurden, sind vergleichbar mit Werten aus Nordrhein-Westfalen [Fooker et al., 1997]. Aus dem Jahr 2001 liegen Werte zu dem Vorkommen verschiedener phosphororganischer Flammschutzmittel in 21 Kläranlagen aus Baden-Württemberg vor [Metzger & Möhle, 2001]. Hier wurden vor allem auch TCEP (MW 1,9

Abbildung 2 Eintragspfade von Alkyl- und Arylphosphaten in die Umwelt; nach Grundmann [2000]



$\mu\text{g/l}$), TCPP (MW 2,29 $\mu\text{g/l}$) und TDCP (MW 0,03 $\mu\text{g/l}$) detektiert. Bei Kläranlagen mit einem erhöhten industriellen Schmutzwasseranteil wurde TBEP, welches nicht als Flammschutzmittel sondern als Weichmacher Verwendung findet, in Konzentrationen bis 11,56 $\mu\text{g/l}$ gefunden.

1.4 Ökotoxikologische Daten der Organophosphate

Organisch substituierte Triphosphate wirken teilweise schon in geringen Konzentrationen auf aquatische Organismen toxisch [Kuhlmann, 1991]. Die aquatische Toxizität auf Fische, Algen und Daphnien liegt für TCEP bei 2-10 mg/l (NOEC) [IUCLID, 1995a,b]. TCEP ist in die Wassergefährdungsklasse 2 (wassergefährdend) eingestuft und 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 verbrauchsnahen Produkten fordert. Für TCEP wird vom UBA ein vorläufiger PNEC von 65 $\mu\text{g/l}$ angegeben [persönliche Mitteilung].

Die aquatische Toxizität (NOEC) auf Fische, Algen und Daphnien liegt für TCPP bei 2-10 mg/l [IUCLID, 1995b]. TCPP wurde von den Herstellern selbst in die Wassergefährdungsklasse 2 (wassergefährdend) eingestuft [Bayer, 1999; BASF, 1999; IUCLID, 1995b]. TCPP kann eine längerfristig schädliche Wirkung in Gewässern und für Wasserorganismen haben [Bayer AG, 1999; BASF, 1999; Great Lakes, 2004]. Unterhalb von 6 mg/l TCPP sind keine Effekte auf Fische (sowie 9,8 mg/l auf Algen und 32 mg/l auf Daphnien) zu beobachten [UBA, 2001]. Für TCPP wird vom UBA ein vorläufiger PNEC von 120 $\mu\text{g/l}$ angegeben [persönliche Mitteilung].

TBP wird der Wassergefährdungsklasse 2 zugeordnet [Great Lakes, 2004]. Triphenylphosphat (TPP) kann zu Atembeschwerden führen und wird als giftig 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 und Daphnien [Ahrens, 1978; Great Lakes, 2004].

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, 2003].

► 2 Organophosphate in Oberflächenwässern
am Beispiel der Ruhr



► 2 Organophosphate in Oberflächenwässern am Beispiel der Ruhr

2.1. Einleitung

Die Ruhr wurde als Probenahmegebiet ausgewählt, da sie zu einem der bestgeschützten Gewässer Europas zählt und die Hauptversorgungsquelle mit Trinkwasser für ca. 7 Millionen Menschen im Ruhrgebiet darstellt. Es sollte ermittelt werden ob sich spezielle Eintragsquellen fest-

stellen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Gehalte der Organophosphate in Kläranlagenabläufen und Nebenflüssen bestimmt, welche in die Ruhr münden. Eine Aufstellung der Probenahmeorte liefert Tabelle 1. Abbildung 3 zeigt die Probenahmepunkte im Ruhrverlauf.

Abbildung 3 Übersicht der einzelnen Probenahmestellen entlang der Ruhr

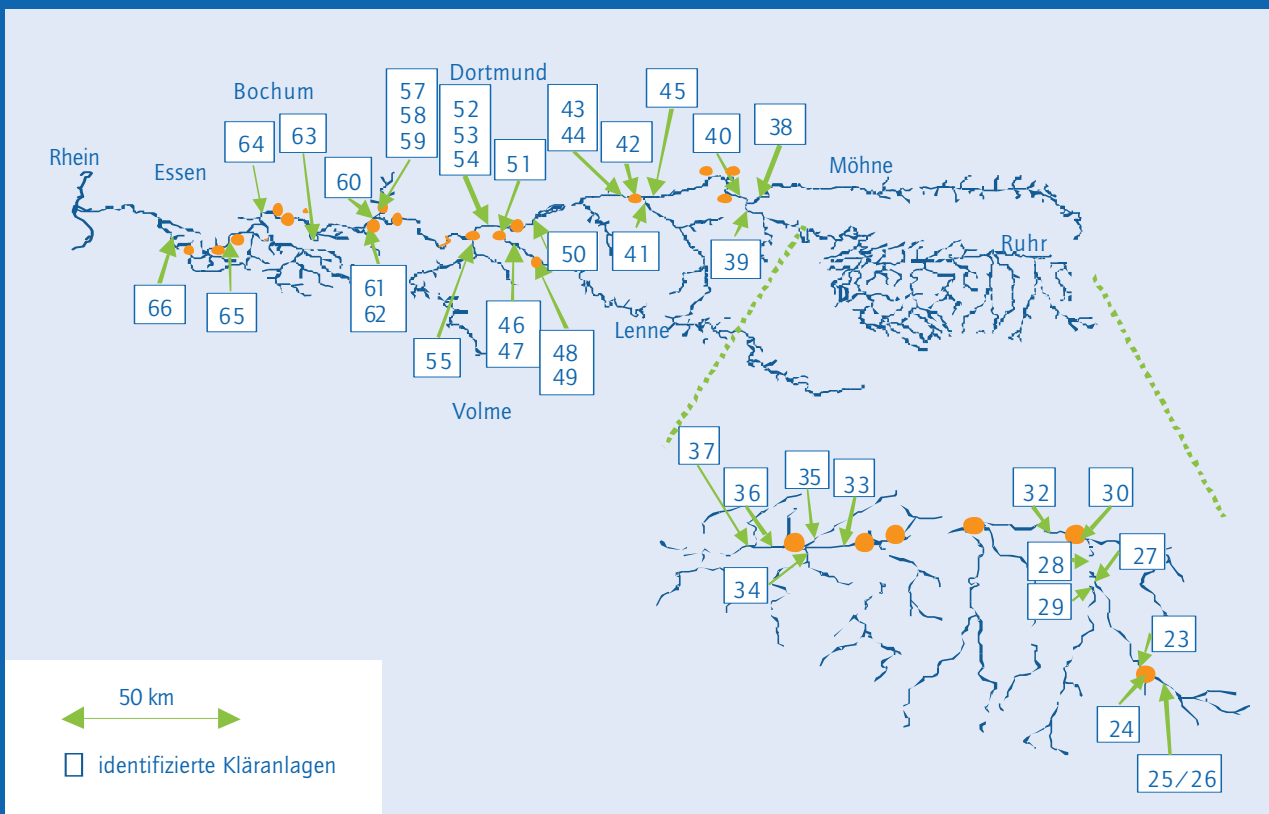


Tabelle 1 Probenahmeorte an der Ruhr und deren Nebenflüssen

Probenahmestelle	Charakteristika	Datum
23	Kläranlagenablauf KA Niedersfeld (4000 Einwohner)	17.09.02
24	Fahne des Kläranlagenablaufs von KA Niedersfeld	17.09.02
25/26	Ruhr stromauf von KA Niedersfeld	17.09.02
27	Ruhr stromauf von Nebenfluss Neger	17.09.02
28	Ruhr stromab von Nebenfluss Neger, Betonwerk (keine sichtbare Einleitung)	17.09.02
29	Nebenfluss Neger	17.09.02
30	Ruhr	17.09.02
31	Blindwert	17.09.02
32	Ruhr	17.09.02
33	Wehr, Ruhr (Heinrichstal)	17.09.02
34	Nebenfluss Henne	17.09.02
35	Nebenfluss Gebke	17.09.02
36	KA Meschede 1 (stromab von Henne und Gebke)	17.09.02
37	KA Meschede 2	17.09.02
38	Möhne	17.09.02
39	Ruhr stromab von KA Wildshausen-Arnsberg (98000 Einwohner) stromauf der Möhne	17.09.02
40	Ruhr stromab der Möhne	17.09.02
41	Nebenfluss Hönne	17.09.02
42	Ruhr stromauf of KA Menden-Bösperde	17.09.02
43	Fahne des Kläranlagenablaufs KA Menden-Bösperde (120.000 Einwohner)	17.09.02
44	Fahne des Kläranlagenablaufs KA Menden-Bösperde	17.09.02
45	Ruhr stromauf der Hönne des KA Menden-Bösperde	17.09.02
46/47	Nebenfluss Lenne (Autobahn) (stromauf der Kläranlagen in Hagen)	19.09.02
48	Kläranlagenablauf KA Hagen Fley (70.000 Einwohner)	19.09.02
49	Lenne stromauf KA Hagen Fley (70.000 Einwohner)	19.09.02
50	Ruhr stromauf der Lenne und den Kläranlagen in Hagen	19.09.02
51	Kläranlagenablauf KA Hagen Boele (15.000 Einwohner)	19.09.02
52/53/54	Ruhr stromab der Kläranlagen in Hagen und der Lenne	19.09.02
55	Nebenfluss Volme	19.09.02
56	Ruhr stromauf Kläranlage Oelbachtal	19.09.02
57/58/59	Kläranlagenablauf KA Oelbachtal (160.000 Einwohner)	19.09.02
60	Bucht (Nordufer) Kemnadersee in welche KA Oelbachtal einleitet (Sporthafen)	19.09.02
61	Kemnadersee nach Einleitung KA Oelbachtal stromab Probe Nr. 60	19.09.02
62	Kemnadersee nach Einleitung KA Oelbachtal stromab Probe Nr. 61	19.09.02
63	Ruhr stromab Kemnadersee, KA Hattingen (75.000 Einwohner)	19.09.02
64	Ruhr stromab von KA Burgaltendorf, Steele und Rellinghausen (36000, 54000 und 51000 Einwohner)	19.09.02
65	Ruhr stromab des Baldeneysees und der KA Kupferdreh (51.000 Einwohner)	19.09.02
66	stromab von KA Kettwig und KA Werden (22.000 und 29.000 Einwohner)	19.09.02

2.2 Analytik

An den einzelnen Probenahmestellen wurden jeweils 11-Proben gezogen und analysiert. Die Probennahme erfolgte Mitte September 2002 in einer Periode ohne Niederschläge. Aufgearbeitet wurden die Proben per Flüssig-Flüssig-Extraktion mit TnBPD27 als internem Standard. Anschließend wurden die Toluolextrakte eingengt, die Messung erfolgte per GC-MS. Da die Wiederfindungsraten für TCEP bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion gering sind, wurden parallel drei Proben per Festphasenextraktion analysiert. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.3 Ergebnisse

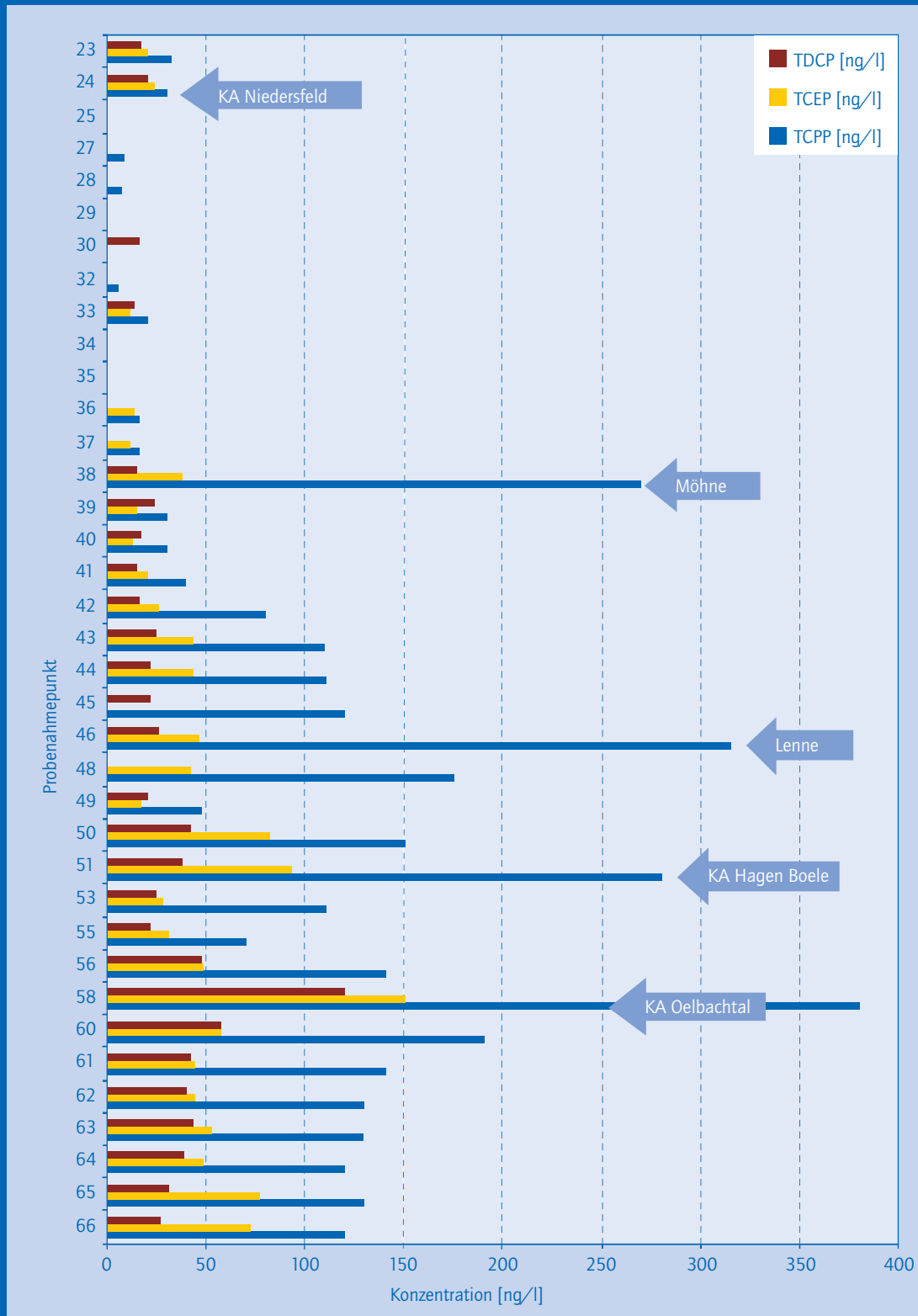
2.3.1 Halogenierte Flammschutzmittel

Abbildung 4 zeigt die Konzentrationen für TCEP, TDCP und TCPP. Die gemessenen Konzentrationen der chlorierten Flammschutzmittel 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, < 5ng/l für TCPP und <14ng/l TDCP. Das Klärwerk Niedersfeld stellt die geographisch erste Eintragsquelle der FSM dar. Stromab der Ruhr nahmen die Konzentrationen der Verbindungen zu. 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 zur Belastung der Ruhr beitragen. Nur bei zwei Kläranlagen (Hagen und Ölbachtal) konnte eine zusätzliche Verschmutzung der Ruhr festgestellt werden. Die übrigen Kläranlagen scheinen dabei keine Rolle zu spielen.

Nebenflüsse wie Lenne und Möhne tragen deutlich zur Kontamination der Ruhr bei. Zwei Kläranlagen in Hagen, welche direkt in die Lenne einleiten, könnten hier die Ursache der Kontamination der Lenne sein. Die Möhne, von der bisher angenommen wurde, dass sie von Kläranlagen kaum beeinflusst ist, zeigt jedoch ebenfalls eine Belastung mit den FSM. Dieser Effekt ist am deutlichsten beim TCPP erkennbar, während er beim TCEP bzw. TDCP nur schwach ausgeprägt ist (Abbildung 4). Nach vollständiger Durchmischung der Ruhr mit dem gereinigten Abwasser der Kläranlage Ölbachtal (Probenahmepunkt 60) bleiben die Konzentrationen der halogenierten FSM in etwa konstant.

Abbildung 4 Darstellung der Konzentrationen der halogenierten FSM im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002



2.3.2 Nichthalogenierte Organophosphate

Die gemessenen Konzentrationen der nichthalogenierten Organophosphate liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der chlorierten Flammschutzmittel. In der Nähe der Quelle in Niedersfeld wurden ausschließlich Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze für TiBP, TnBP, TBEP und TPP ermittelt. Diese stiegen stromab der Ruhr deutlich an. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen in den Abläufen der Kläranlagen deutlich höher liegen. Dabei wurden folgende Werte ermittelt: 110ng/l TnBP, 1900ng/l TiBP und 480ng/l TBEP. Für das TPP wurden generell niedrigere Konzentrationen bestimmt. Der maximale Gehalt, der in einem Kläran-

lagenablauf gemessen wurde, betrug 22ng/l, während die Konzentration am Sporthafen des Kemnader Sees 38 ng/l betrug (Abbildung 5). Auch bei den nicht halogenierten Organophosphaten zeigte sich, dass Nebenflüsse zur Belastung der Ruhr mit diesen Verbindungen beitragen. Im Unterschied zu den chlorierten Organophosphaten spielen neben Lenne und Möhne, auch noch andere kleinere Nebenflüsse, wie z.B. Henne und Gebke beim TnBP eine wichtige Rolle. Es wurden Gehalte bis 100ng/l festgestellt (Abbildungen 5 und 6). TnBP/TPP auf der einen und TiBP/TBEP auf der anderen Seite zeigen deutliche Unterschiede im Eintragsmuster auf.



Abbildung 5 Darstellung der Konzentrationen von TiBP und TBEP im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002

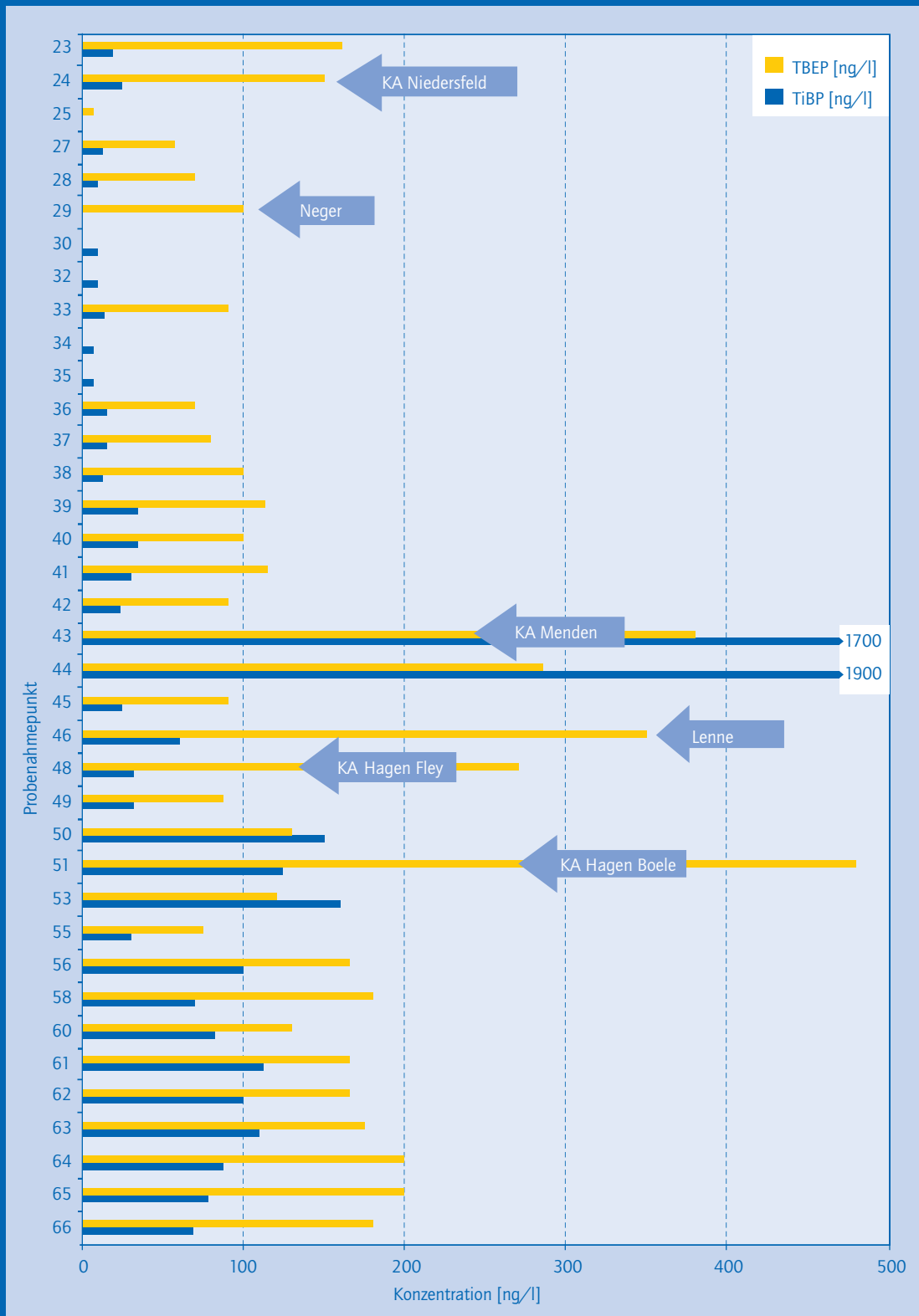
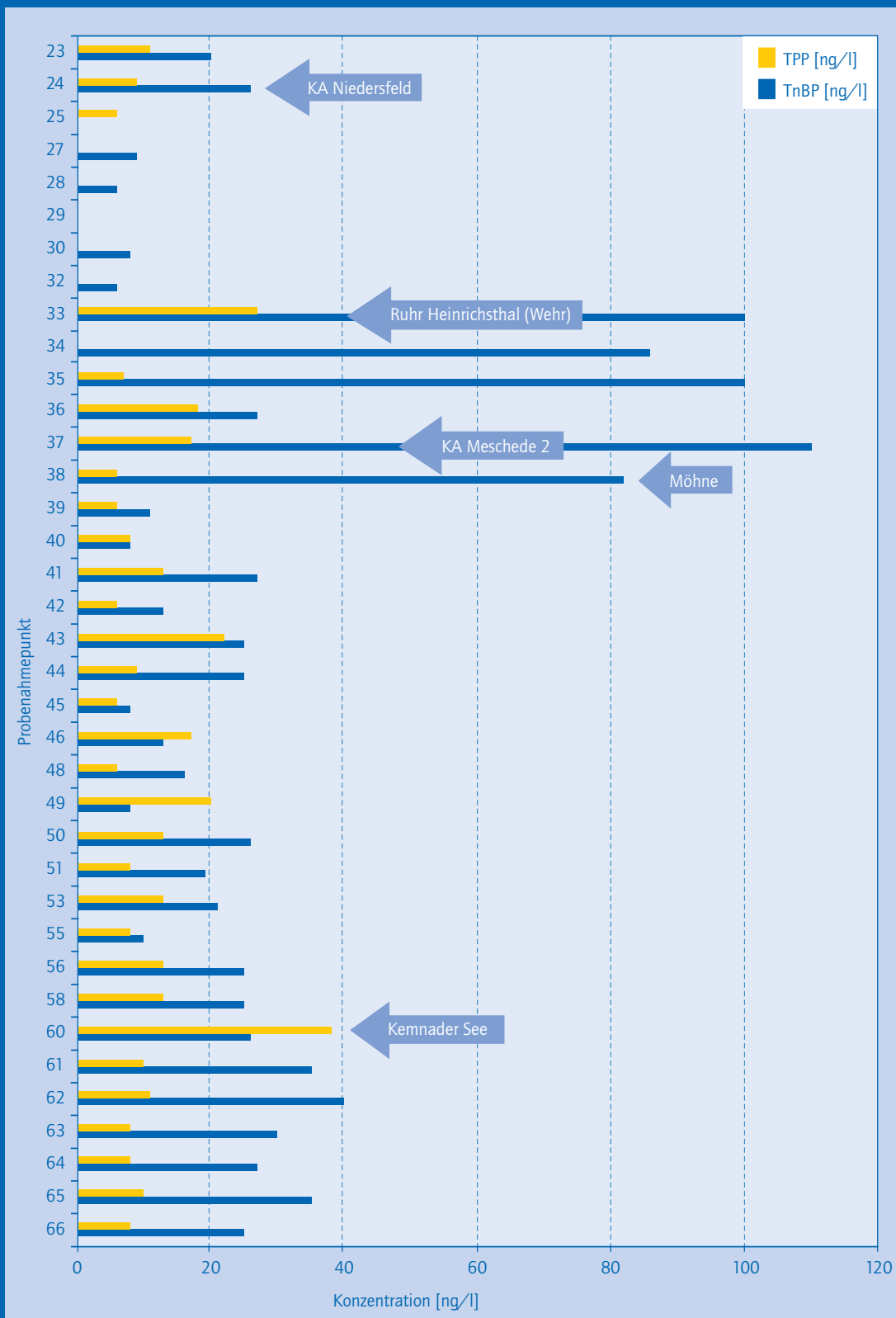


Abbildung 6 Darstellung der Konzentrationen von TPP und TnBP im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002



2.4 Diskussion

Bei der Betrachtung der Gehalte für die verschiedenen Organophosphate fällt auf, dass unterschiedliche Kläranlagen auch unterschiedlich zur Belastung der Ruhr mit den verschiedenen Verbindungen 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 Substanzen wie TBEP kaum eine Rolle spielt. Hier liegen die Gehalte in den weiteren beprobten Kläranlagenabläufen deutlich höher. Dies deutet darauf hin, dass der Eintrag der Verbindungen in das Oberflächenwasser auf Punktquellen wie Klärwerke zurückzuführen ist. Es kann jedoch auf Grund des Eintrages über die Emmission aus Baumaterial

keine Korrelation zu den an die Kläranlagen angeschlossenen Personen hergestellt werden. Dies zeigt auch die zeitliche Variabilität der Befunde, welche mit zusätzlichen Proben im Juli 2002 bestätigt wurde. Teilweise deutliche Abweichungen konnten bei den ermittelten Konzentrationen festgestellt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2 Vergleich der Organophosphatkonzentrationen [ng/l] im Juli/September 2002 im Oberflächenwasser

Probennr.	Monat	TiBP	TnBP	TCEP	TCPP	TDCP	TBEP	TPP
46	Juli	70	70	180	100	<BG	870	60
46	September	58	13	45	310	27	350	17
50	Juli	50	60	190	130	<BG	<BG	<BG
50	September	150	26	81	150	41	130	12
57	Juli	70	70	300	280	<BG	290	60
57	September	72	24	150	380	120	180	13
60	Juli	80	60	250	290	<BG	230	80
60	September	83	26	58	190	57	130	39
61	Juli	160	130	< 20	230	<BG	< 100	< 10
61	September	110	34	45	140	42	160	10

Die Größenordnung der Gehalte an den halogenierten und nichthalogenierten Organophosphaten konnte jedoch bestätigt werden. Es handelte sich also nicht um eine einzelne Emission sondern um dauerhafte Einträge. Um zu überprüfen, ob es sich bei den gemessenen Kontaminationen um ein ruhrspezifisches oder allgemeines Problem handelt, wurden zusätzlich Proben aus dem Rhein und der Lippe untersucht. Hierbei wurden ähnlich Befunde festgestellt (Tabelle 3).

Die EU-Wasserrahmenrichtlinie soll einen neuen europäischen Ordnungsrahmen für den Schutz des Grundwassers sowie der Oberflächen- und Küstengewässer schaffen. Für ihre Umsetzung ist unter anderem ein zugehöriges Maßnahmenprogramm zur Erreichung eines guten Gewässerzustandes zu erstellen. Die „Verordnung über Qualitätsziele für bestimmte gefährliche Stoffe und zur Verringerung der Gewässerverschmutzung durch Programme (Gewässerqualitätsverordnung)“ dient der Umsetzung der Richtlinie 76/464/EWG betreffend die Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft. Hier werden Qualitätsziele für Stoffe im Sinne des Artikels 7 der Richtlinie 76/464/ EWG festgelegt und Programme zur Verringerung der Verschmutzung oberirdischer Gewässer durch diese Stoffe aufgestellt. Die Qualitätsziele von 132 Stoffen sind im Anhang zu § 2 aufgeführt, für die Organophosphorverbindung Tributylphosphat (TBP) beträgt das Qualitätsziel 0,1 µg/l. Dieser Wert wird bei einer Vielzahl von Proben in der Ruhr und deren

Nebenflüssen nicht eingehalten (Abbildung 5). Für die anderen in diesem Projekt untersuchten Organophosphate existieren keine Qualitätsziele. Ob Verbindungen wie TCEP und TCPP, welche ebenfalls deutlich oberhalb von 0,1 µg/l bestimmt wurden (Abbildung 4), in das Programm zur Verringerung der Oberflächenwasserverschmutzung aufgenommen werden sollten, bleibt zu klären.

Grundlage der Risikobewertung von Stoffen für den Umweltbereich ist der Vergleich der Umweltkonzentration (Exposition) und deren Wirkung in den entsprechenden Umweltkompartimenten. Konzentrationen, mit denen Verbindungen voraussichtlich in der Umwelt vorkommt (PEC; Predicted Environmental Concentration) oder, wenn vorhanden, gemessene Umweltkonzentrationen (MEC; Measured Environmental Concentration) werden in Relation zu den PNEC-Werten (Predicted No-Effect-Concentration) gesetzt. Dieser PNEC gibt den Schwellenwert an, bei dem noch keine Wirkungen auf die betroffenen Organismen oder Ökosysteme angenommen wird. Dieses Risk Assessment gibt je nach Verhältnis von PEC zu PNEC den möglichen Handlungsbedarf vor. Für TCEP wird vom UBA ein vorläufiger PNEC von 65 µg/l und für TCPP von 120 µg/l angegeben [persönliche Mitteilung]. Die TCEP-Konzentration wurde in den Oberflächengewässern mit bis zu 0,15 µg/l und in Kläranlagenabläufen mit bis zu 0,43 µg/l bestimmt. TCPP wurde in den Oberflächengewässern bis zu 0,38 µg/l und im gereinigten Abwasser bis zu 6,7 µg/l aufgefunden. Die gemessenen Konzentrationen sind somit für beide Verbindungen geringer als der PNEC und bei einem PEC/PNEC kleiner als 1, gibt der Stoff keinen Anlass zu unmittelbarer Besorgnis [Richtlinie 67/548/EWG]. Das Prinzip der Konzentrations-Additivität für Umweltkontaminanten ist hier jedoch zu bemerken. Dieses besagt, dass Verbindungen auch in Konzentrationen unterhalb der Einzelstoffwirkungsschwellen zur Gesamtoxizität eines Substanzgemisches beitragen können.

Tabelle 3 Vergleich der Organophosphatkonzentrationen in Ruhr (Quelle bis Mündung), Rhein (bei Köln) und Lippe (Bereich Dortmund)

Verbindung	Ruhr	Rhein	Lippe
TCPP [ng/l]	<BG - 185	~ 90	~ 100
TDCP [ng/l]	<BG - 60	13 - 36	17
TnBP [ng/l]	<BG - 40	30 - 120	30
TiBP [ng/l]	<BG - 160	30 - 50	100
TBEP [ng/l]	<BG - 200	80 - 140	130

► 3 Organophosphate im Dortmunder Abwassernetz



► 3 Organophosphate im Dortmunder Abwassernetz

Im Juni/Juli 2003 wurden verschiedene Punkte des Dortmunder Kanalnetzes beprobt. Hauptaugenmerk lag auf der Emscher, die in diesem Bereich Teil des oberirdischen Abwassernetzes in Dortmund ist, sowie ihren Zuflüssen Rüpingsbach und Rossbach. Dabei wurde in Hörde im Bereich des Regenüberlaufes begonnen und anschließend entlang der Emscher an verschiedenen Zusammenflüssen beprobt. Ebenso wie für das Oberflächenwasser wurde eine Einmalbeprobung durchgeführt. Die Charakterisierung der Entnahmestellen ist in Tabelle 4 dargestellt. Abbildung 7 zeigt den Verlauf der TCPP-Konzentration im Dortmunder Kanalnetz.

Generell konnte eine deutliche Variabilität der Konzentrationen festgestellt werden. Die Schwankungsbreiten der ermittelten Werte für TDCP, TCEP, TCPP und TBEP sind in Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 4 Zuordnung der Probenahmestellen des Dortmunder Kanalnetzes

Probenahmepunkt	Ort/Bezeichnung
113/114	Regenwasserüberlauf Do-Hörde; Emscher
115/116	Emscher : Westfalenpark; Einleitung Schondelle Kanal
111/112	Emscher : Ardeystr. Do-Barop
106/107	Emscher : Dieckmüllerbaum; Do-Barop
109/110	Rüpingsbach; aus Süden
103/104	Emscher : am Mühlenberg; Rangierbahnhof/Versuchszeche
101/102	Emscher : Franziusstr.
99/100	Roßbach; Do-Huckarde
95/96	Emscher : Franziusstr.; stillgelegter Bachlauf am Bahndamm
93/94	Sammler Huckarde/Pumpwerk KA Deusen
97/98	Emscher nach KA Deusen

Abbildung 7 TCPP-Konzentration im Dortmunder Kanalnetz

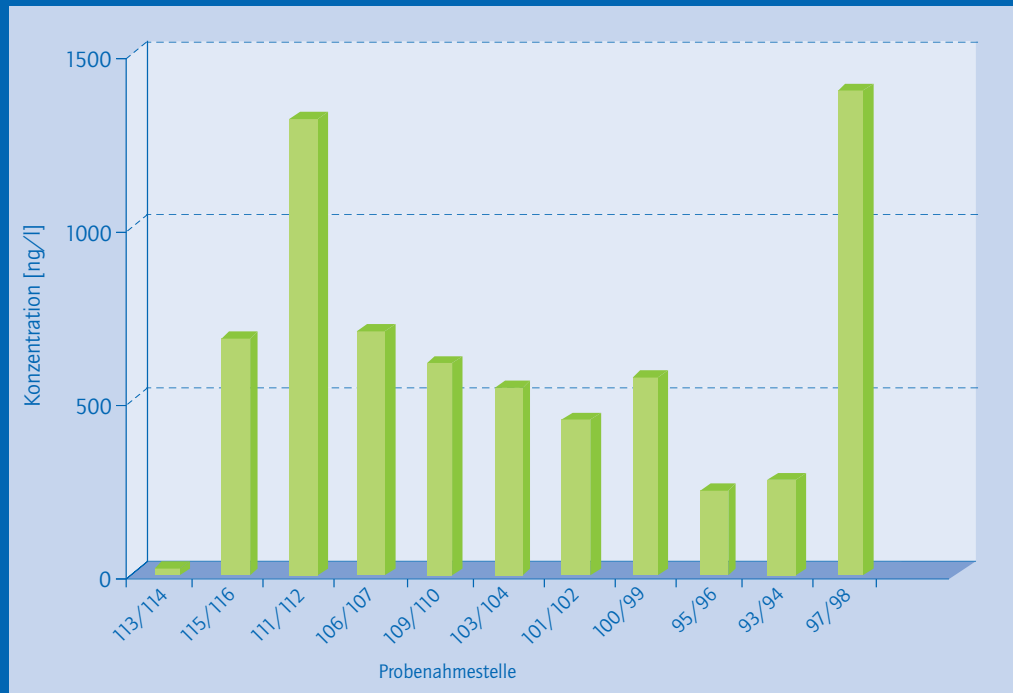
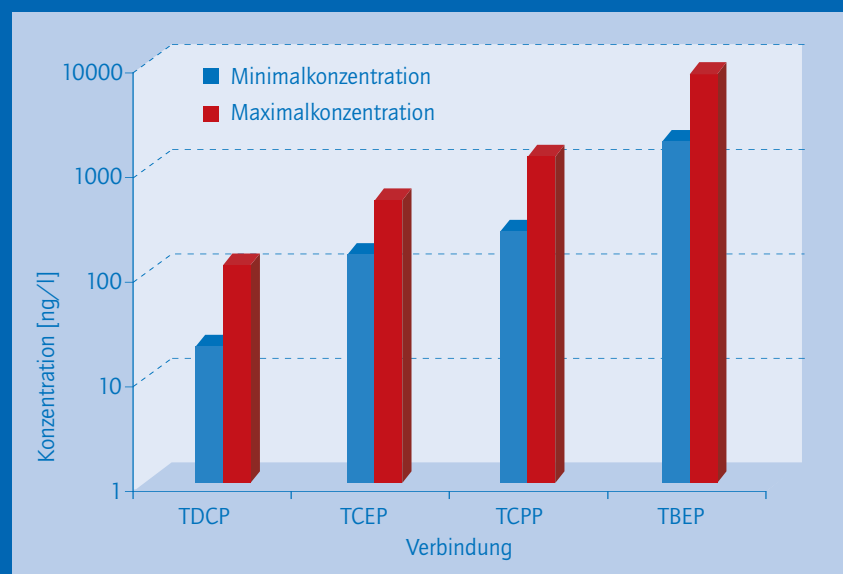
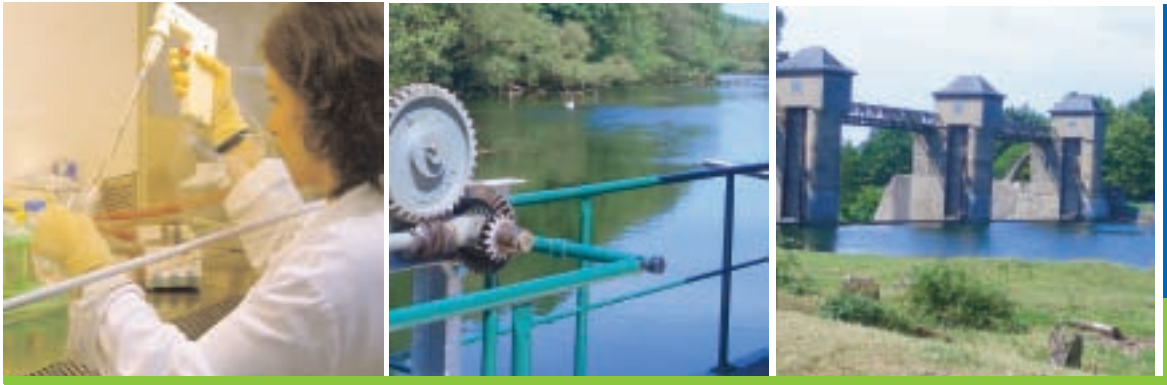


Abbildung 8 Minimale und maximale Konzentrationen von TCEP, TCPP, TDCP und TBEP im Dortmunder Kanalnetz entlang der Emscher; ohne Regenwasserüberlauf; logarithmische Auftragung



Die Beurteilung der Konzentrationen in den einzelnen Messpunkten gestaltet sich äußerst schwierig. In Proben mit verhältnismäßig hohen Gehalten eines Organophosphates, konnten oftmals die anderen Verbindungen in keinen erhöhten Konzentrationen aufgefunden werden. Die verschiedenen Substanzen werden von einer Vielzahl an Punktquellen mit unterschiedlichen Emissionspattern eingeleitet. Die verschiedenen Zusammensetzungen könnten mit der Tatsache zusammenhängen, dass TCPP vor Jahren das bis dahin häufig verwendete TCEP ersetzte. Zudem wird in den letzten Jahren TDCP nur noch in geringem Umfang eingesetzt. Es könnte also ein kontinuierlicher Eintrag in das Abwasser durch flammenschutzmittelhaltige Produkte existieren. Auf Grund der geringen Befunden im Regenwasserüberleiter in Hörde, ist ein Eintrag über Regen oder Straßenverkehr unwahrscheinlich. Er kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Beprobung bei Trockenwetter durchgeführt wurde.

► 4 Organophosphate in Kläranlagen



► 4 Organophosphate in Kläranlagen

4.1 Kläranlage in Köln-Stammheim

4.1.1 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 bestimmen. Im Rahmen der Untersuchung wurden hierzu Proben vom Zu- bzw. Ablauf des Klärwerks genommen. 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.

4.1.2 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 wurden mittels Retentionszeit und Massenfragmenten identifiziert.

4.1.3 Ergebnisse

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

Die Abbildungen 9 bis 15 zeigen die ermittelten Werte für die Zu- und Abläufe über den Beprobungszeitraum. Die Ermittlung von Durchbruchsraten für die einzelnen Organophosphate ist auf Grund der zu geringen Datengrundlage und der hohen Variabilität ihrer Konzentrationen im Abwasser nicht möglich.

Abbildung 9 TCEP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

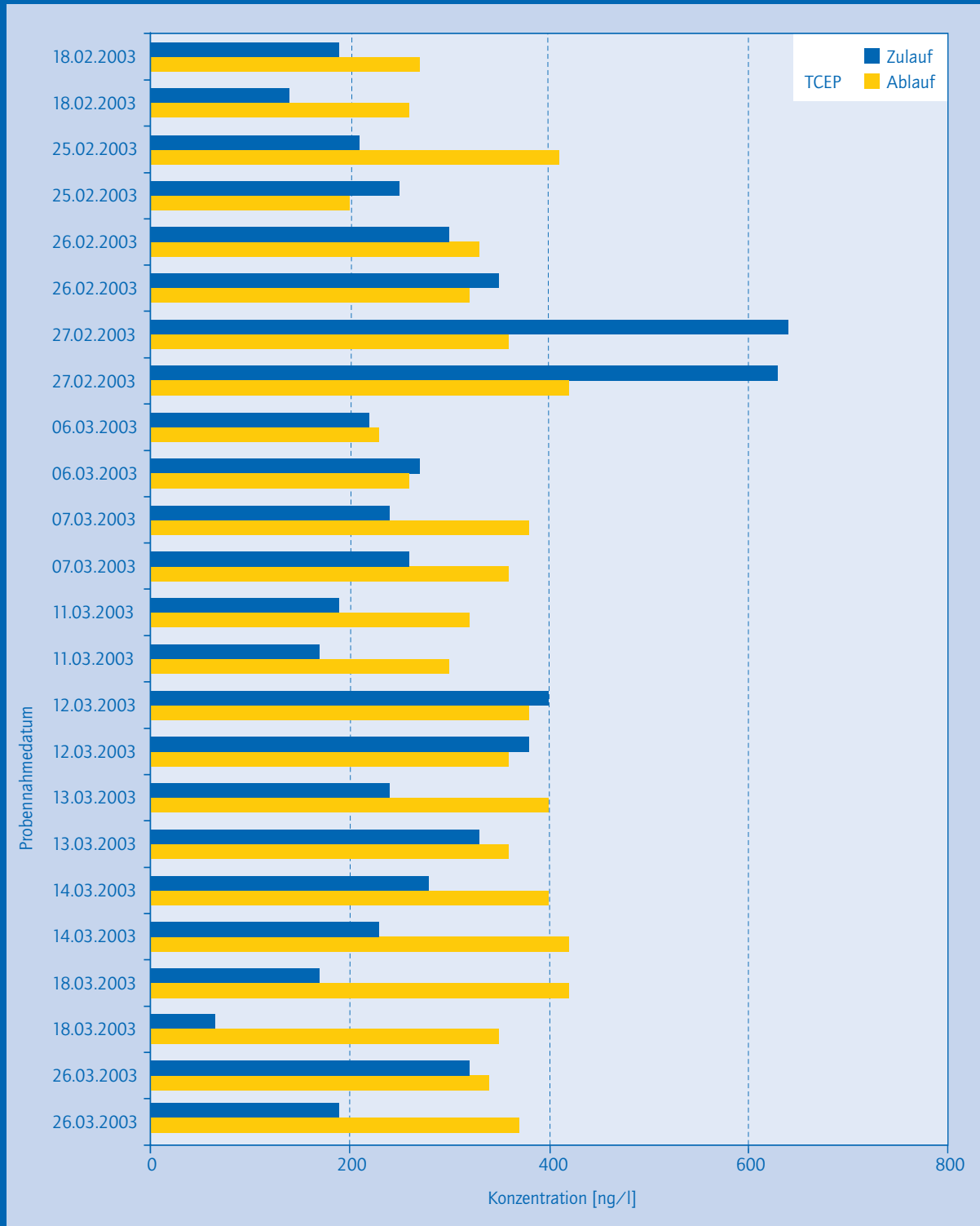


Abbildung 10 TCPP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

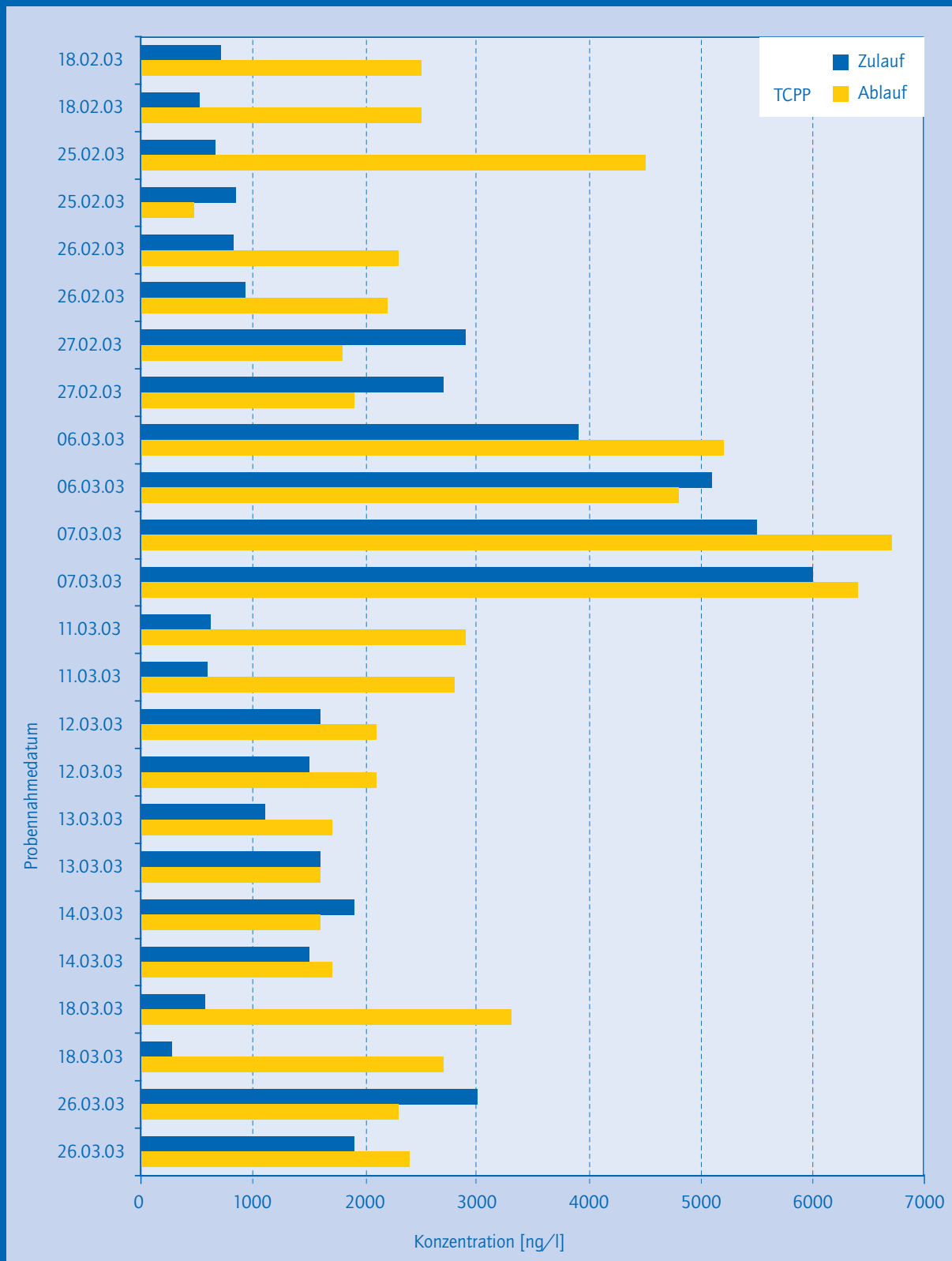


Abbildung 11 TDCP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

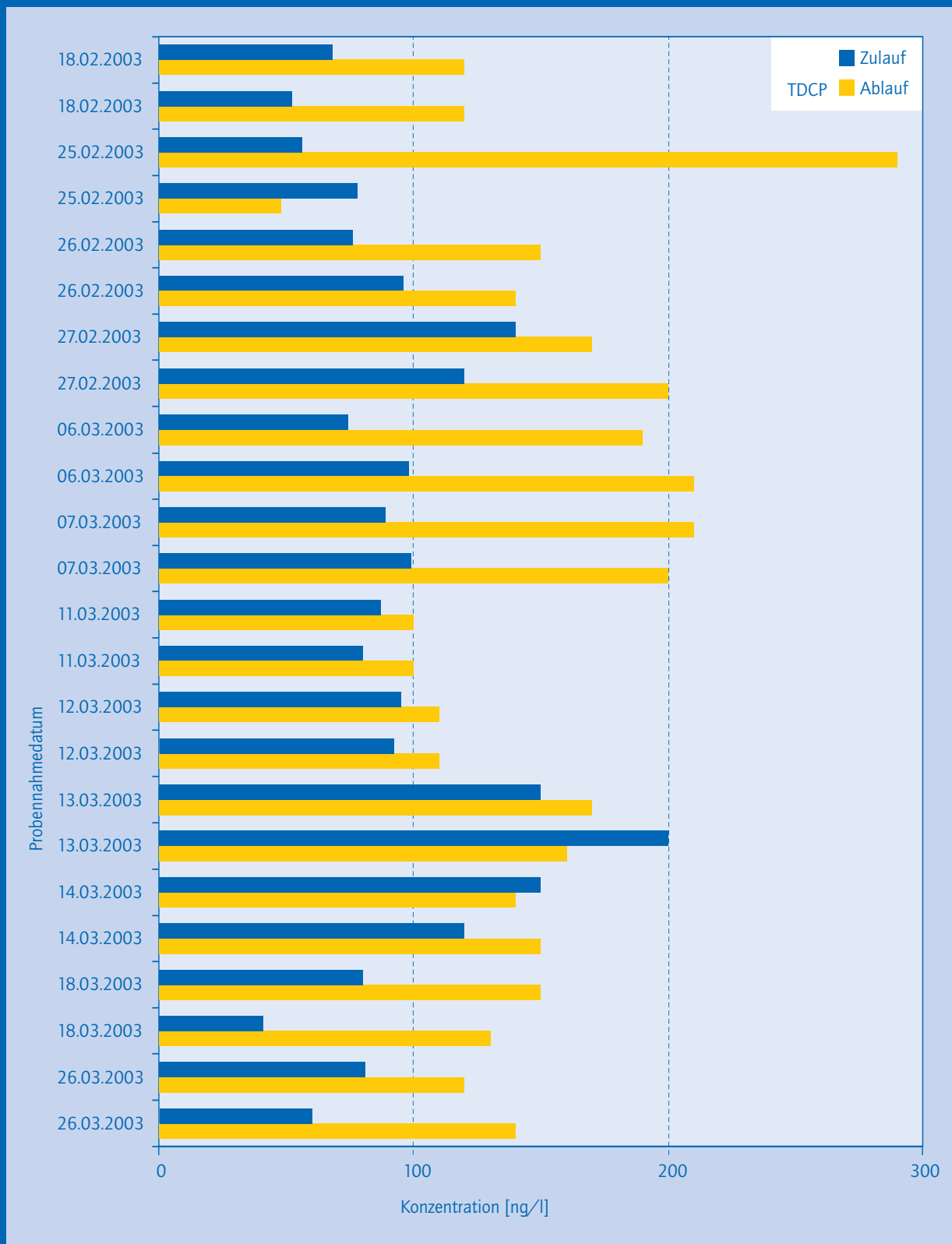


Abbildung 12 TBEP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

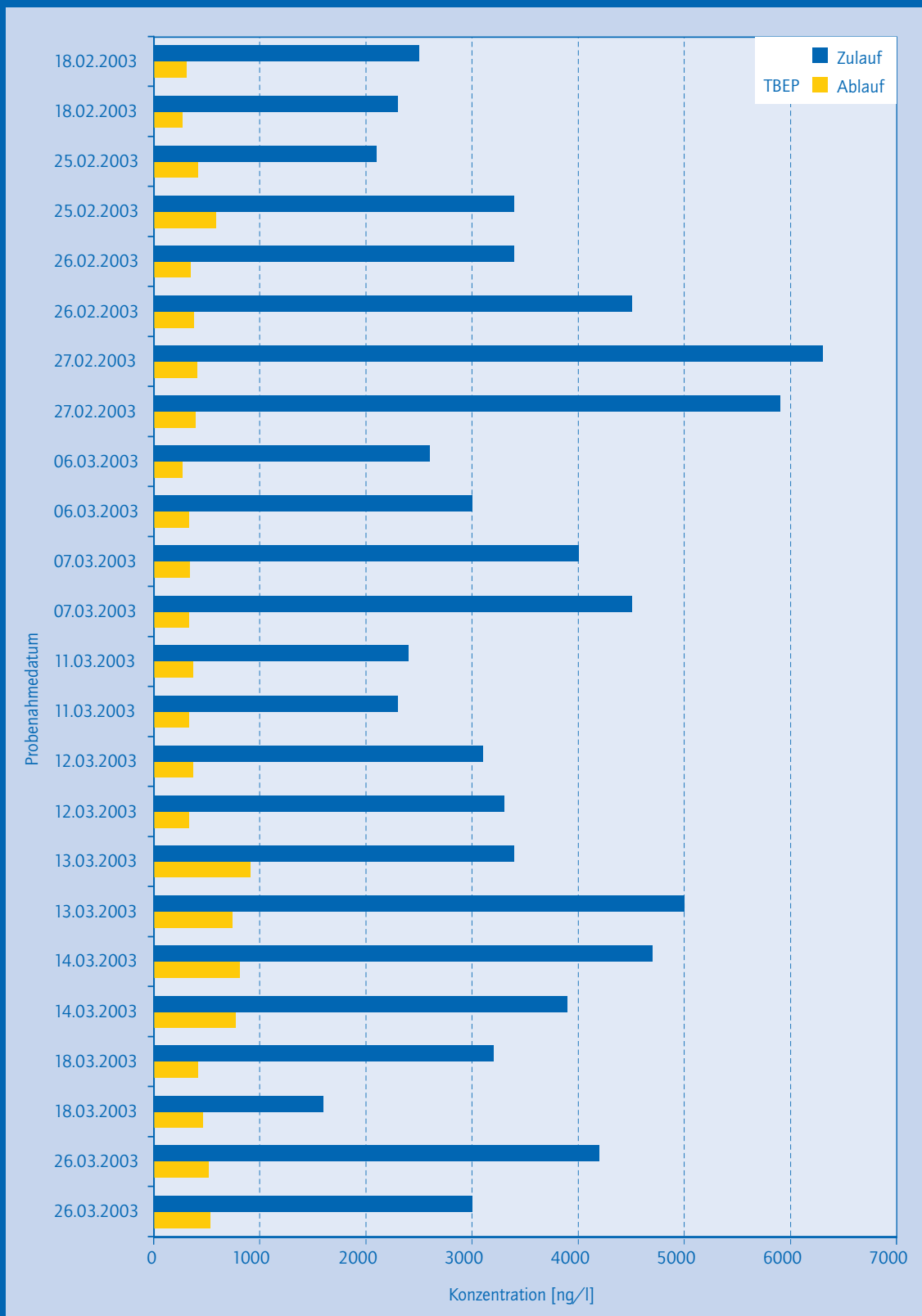


Abbildung 13 TiBP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

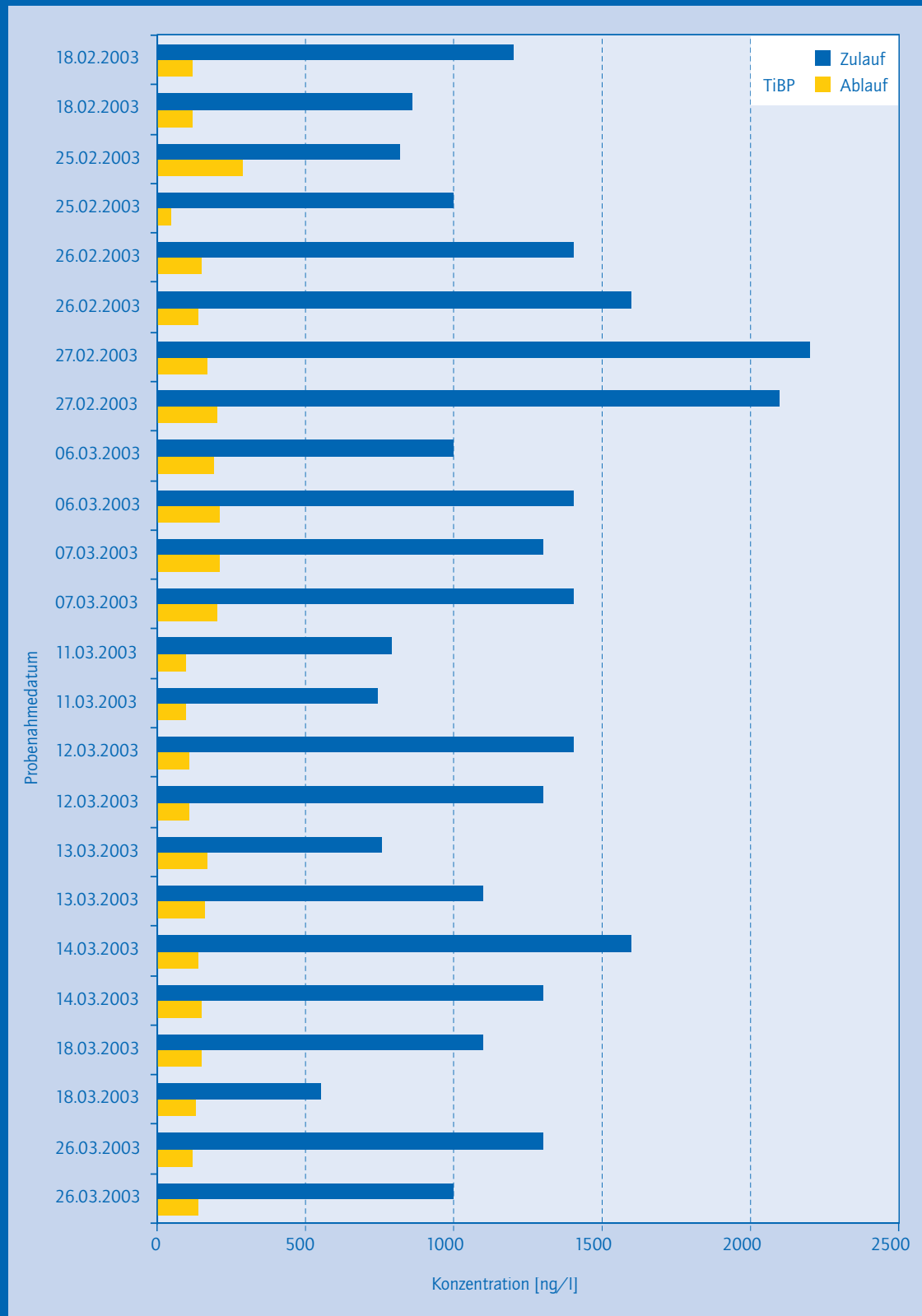


Abbildung 14 TnBP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003

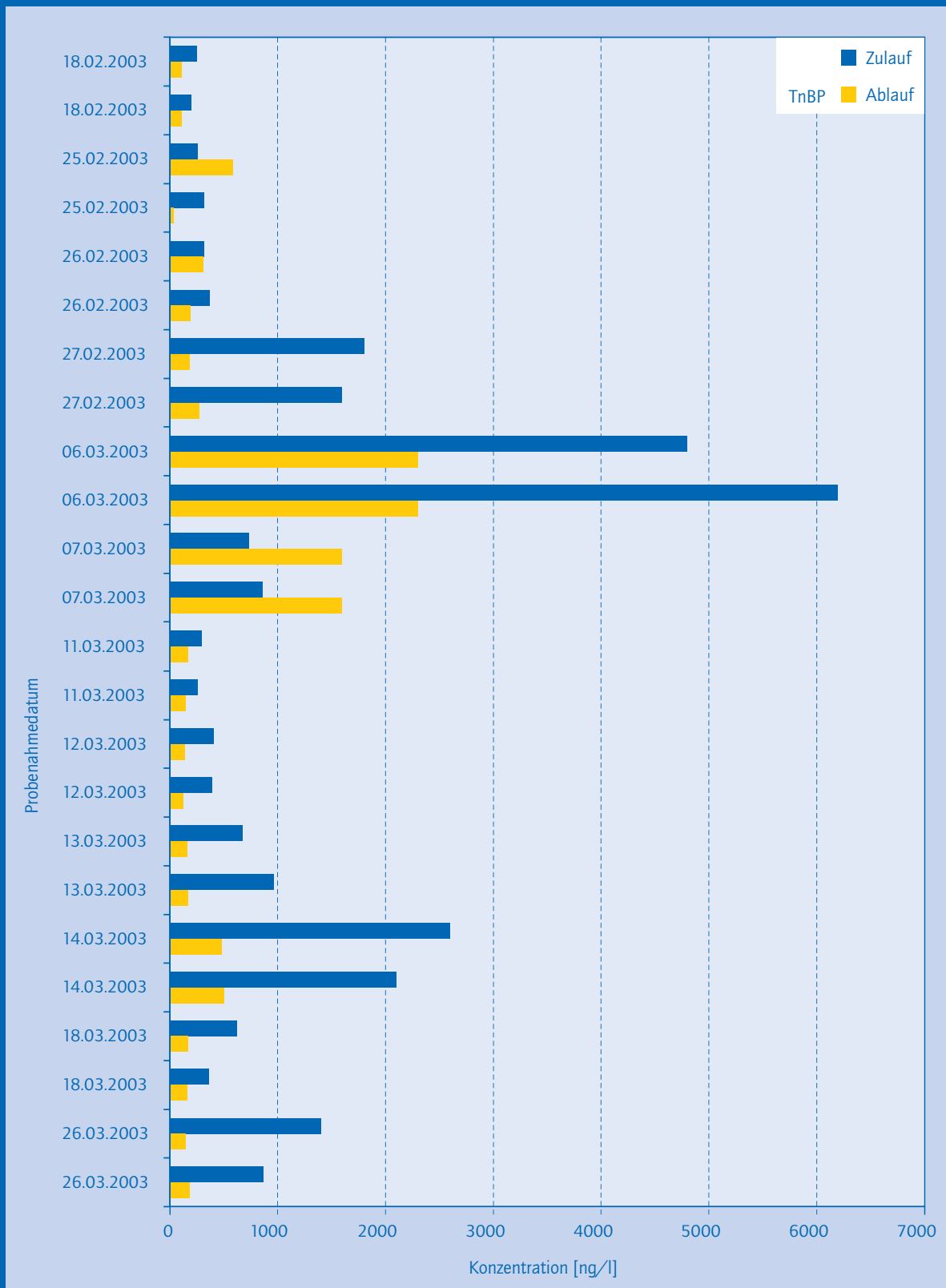
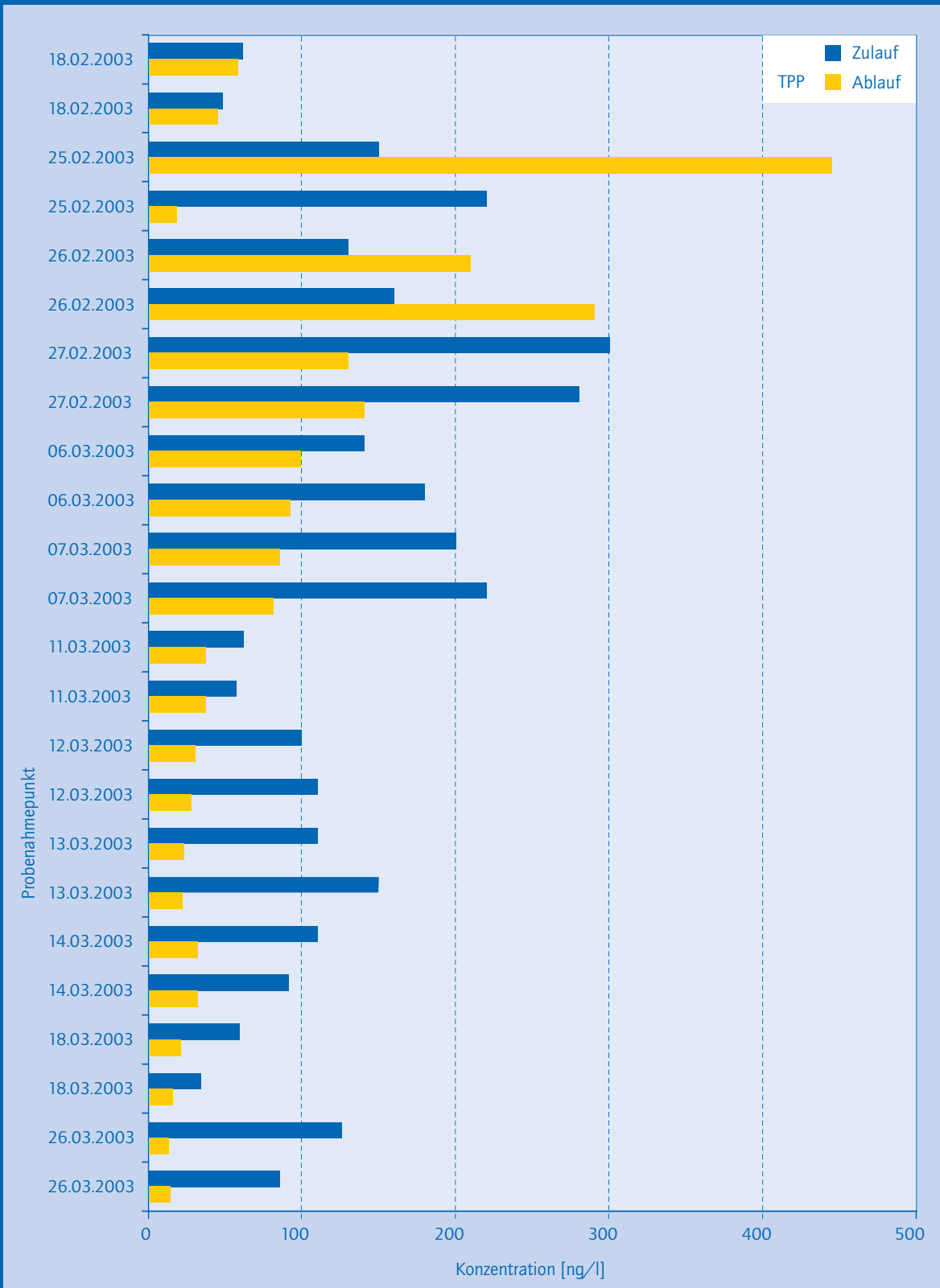


Abbildung 15 TPP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim (2003)

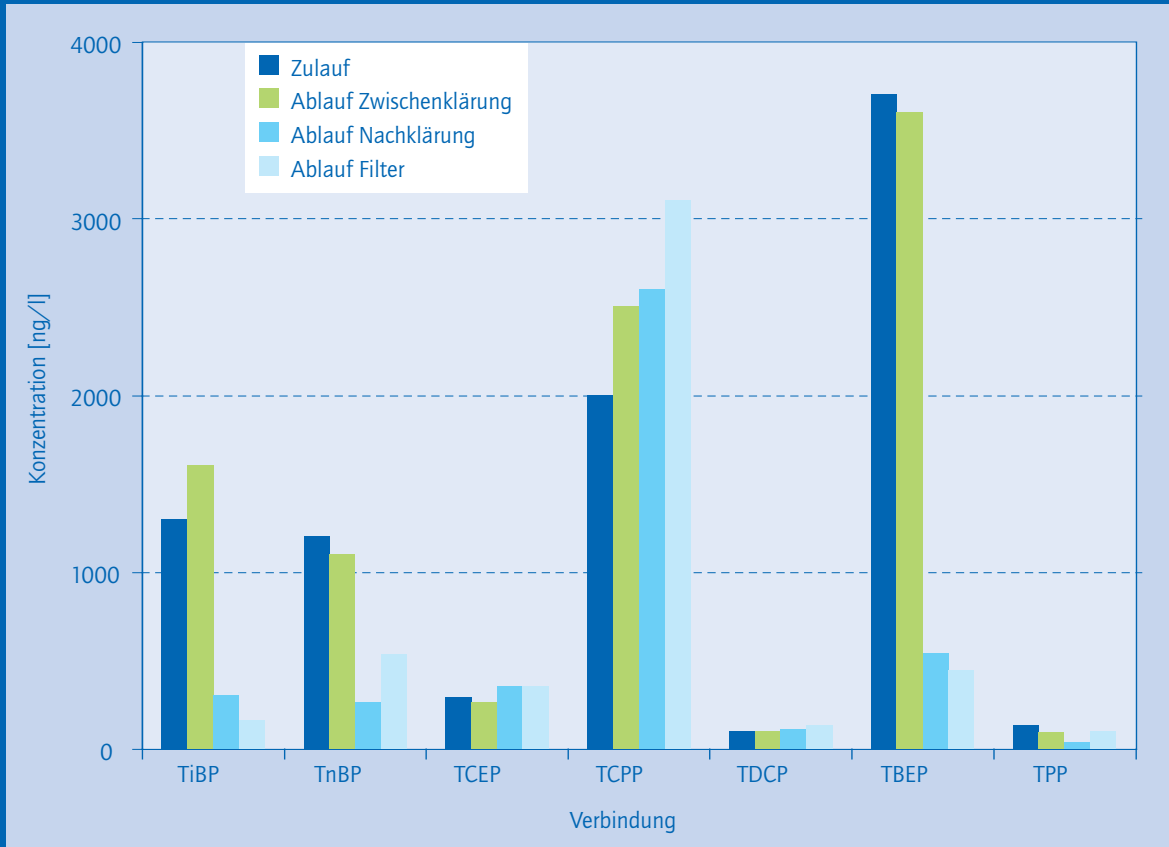


Die Auftragung der mittleren Konzentrationen im Zu- und Ablauf der Kläranlage stellt auf Grund der geringen Anzahl an Messwerten und hohen Variabilität der Befunde nur einen ersten Anhaltspunkt für das Verhalten der Verbindungen dar (Abbildung 16). In dieser Darstellung ist zudem die mittlere Konzentration des Ablaufes der Zwischenklärung und des Ablaufes der Nachklärung gegeben.

Bei Betrachtung der mittleren Konzentrationen fällt auf, dass ein großer Unterschied in der Abbauleistung des Klärwerks zwischen chlorierten und nichtchlorierten Organophosphaten besteht. Während für die nichthalogenierte Verbindungen eine Entfernung aus dem Abwasser

beobachtet wurde, wird bei den chlorierten Flamm- schutzmitteln keine Konzentrationsabnahme festgestellt. Die chlorierten FSM werden bei der Abwasserreinigung in Köln-Stammheim nicht entfernt. Der vermeintlich leichte Anstieg der Konzentrationen der chlorierten FSM bei der Klärwerkspassage ist auf die hohe Variabilität und statistisch nicht zureichende Probenzahl zurückzuführen. Eine größere Probenzahl lieferte jedoch das Projekt „Untersuchungen zum Eintrag und zur Eliminierung von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen“, welches ebenfalls die hier untersuchte KA beprobt. Der Vergleich von Zu- und Ablaufproben in Köln-Stammheim liefert hier eine geringfügige Konzentrationsabnahme der chlorierten FSM in der wässrigen Phase des Abwassers.

Abbildung 16 Mittlere Konzentrationen der Organophosphate im Klärwerk Köln-Stammheim



Für die Proben von der Zwischen- bzw. der Nachklärung lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse aus der Bestimmung der Konzentrationen der Flammschutzmittel in den Zu- bzw. Abläufen bestätigt werden. Auch hier ist eine Eliminierung der chlorierten Organophosphate nicht festzustellen. Bei den nichthalogenierten Verbindungen zeigt sich schon eine Eliminierung nach Sandfang/ Hochlastbelebung (Ablauf Zwischenklärung). Für TiBP und TBEP zeigt sich eine leichte Eliminierung zwischen dem Ablauf der Nachklärung und dem Gesamtablauf. Dies könnte auf einen Reinigungseffekt der Filtration hindeuten, welcher jedoch mit einer größeren Anzahl von Proben abgesichert werden muss.

4.2 Kläranlage in Dortmund-Deusen

4.2.1 Einleitung

In der KA Deusen wurde am Beispiel des TCPP die Konzentration im behandelten und unbehandelten Abwasser sowie im Klärschlamm bestimmt. Es wurde über einen Zeitraum von einer Woche beprobt. Ziel war die genaue Betrachtung des TCPP im Klärwerk, um auf die mögliche Entfernung der Substanz aus der wässrigen Phase durch Sorption am Schlamm schließen zu können.

4.2.2 Ergebnisse

In diesem Versuch wurde eine erhebliche zeitliche Variabilität festgestellt (Tabelle 5). Sie beträgt 57% im Zulauf, 44% im Ablauf und 19% im Schlamm. Diese Variabilität ist deutlich höher als die Standardabweichung der analytischen Methode und somit nicht auf Messunsicherheiten zurückzuführen.

Tabelle 5 TCPP-Konzentrationen an fünf Tagen im Klärwerk Deusen

Tag	Zulauf [ng/l]	Ablauf [ng/l]	Schlamm [ng/g]	Durchbruch [%]
1	240	240	1700	100
2	370	230	2200	62
3	1000	610	1300	61
4	470	490	1700	104
5	480	330	1700	69
<i>Mittelwert :</i>	<i>510</i>	<i>380</i>	<i>1700</i>	<i>80</i>
<i>Variabilität RSD [%]</i>	<i>57</i>	<i>44</i>	<i>19</i>	<i>27</i>

Die Durchbruchrate von 80% zeigt, dass nur etwa ein Fünftel des TCPP aus der wässrigen Phase entfernt werden. Ein Teil des TCPP ist zudem an den Schlamm gebunden. Eine signifikante Eliminierung von TCPP findet, analog zum Klärwerk in Köln-Stammheim, nicht statt.

4.3 Vergleich verschiedener Kläranlagen in Hinsicht auf TCPP

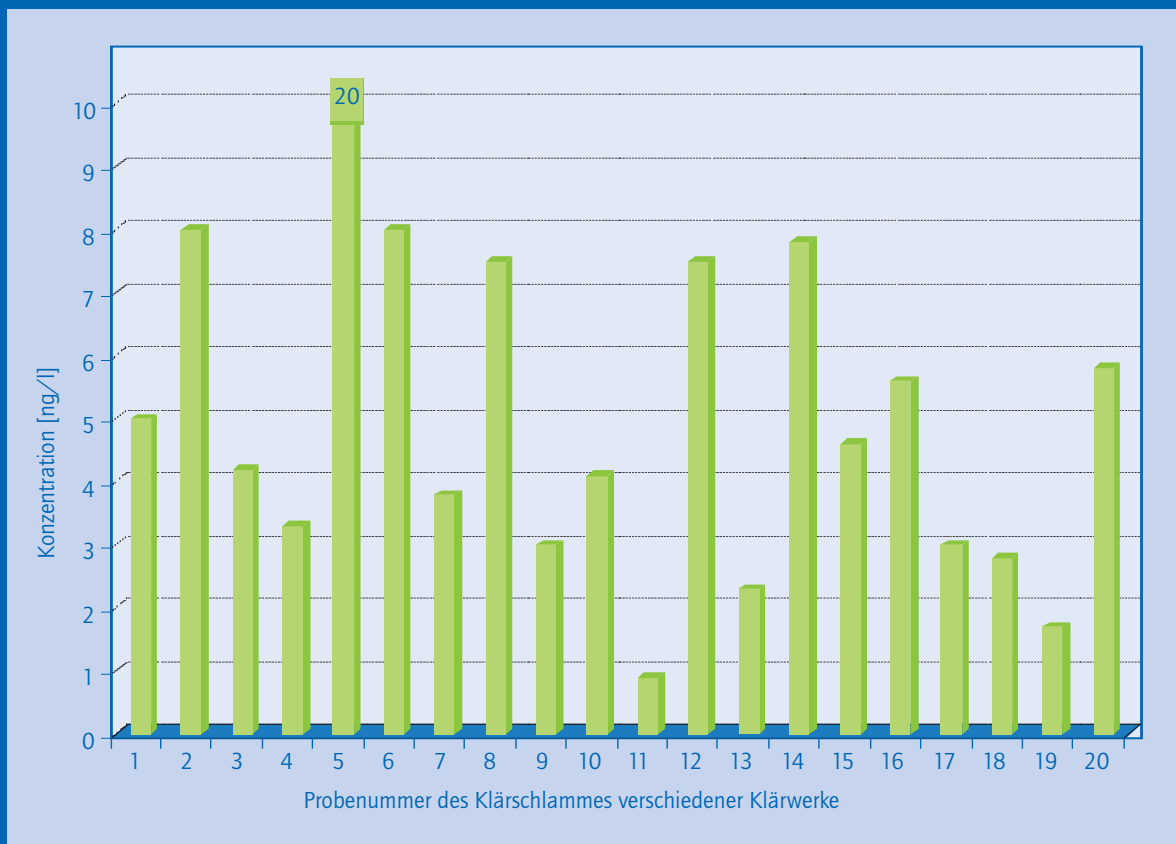
Die Mengen TCPP, welche in die Kläranlagen gelangen und diese wieder verlassen, sind nicht unerheblich. So kann in Dortmund-Deusen ein Austrag von 67 kg pro Jahr, oder 26 mg pro Jahr und Einwohner geschätzt werden (Tabelle 6). Die Basisdaten für die Klärwerke wurden aus MUNLV [2000] entnommen.

Dieser Vergleich zeigt deutlich, dass das Emissionsverhalten (ähnlich auch das Immissionsverhalten) verschiedener Kläranlagen sehr unterschiedlich ist. Es scheint sich um Spezifika jeweiliger Einzugsgebiete zu handeln. Die KA in Deusen zeichnet sich im Vergleich durch die relativ geringe Belastung aus. Dies wird auch deutlich, wenn man die Konzentrationen in Klärschlämmen verschiedener Kläranlagen in NRW betrachtet, da in Deusen nur etwa 1,7 µg/g gefunden wurde (Abbildung 17).

Tabelle 6 Abgeschätzte TCPP-Emissionen mehrerer Kläranlagen

Klärwerk	Einwohner	Trockenwetterzulauf [m ³ /d]	TCPP Ablauf [ng/l]	abgeschätzte Emission [kg/a]	Emission pro Einwohner [mg/a]
Köln-Stammheim	760000	312000	3000	340	450
Düsseldorf Süd	320000	131000	780	37	116
Deusen	380000	200000	380	67	26
Ölbachtal	121000	70000	330	8,5	70

Abbildung 17 TCPP Belastung von 20 Klärschlämmen aus Klärwerken NRW



4.4 Diskussion

Die Studie hat vor allem gezeigt, dass sich die halogenierten und die nichthalogenierten Verbindungen beim Klärwerksprozess deutlich voneinander unterscheiden. Während die nichthalogenierten Organophosphate Eliminierungsraten im Bereich von 20% bis 90% aufweisen, werden die halogenierten Flammenschutzmittel nicht/kaum aus dem Abwasser entfernt. Im Vergleich zum Zulauf, können geringfügig höhere Befunde im behandelten Abwasser auch auf an Partikel/Stäube gebundene FSM in den Zuläufen zurückzuführen sein. Diese werden von der für wässrige Proben validierten Methode eventuell nicht vollständig erfasst. Ein zusätzlich reinigender Effekt der abschließenden Filtration des gereinigten Abwasserstroms lässt sich nur beim TiBP und TBEP

vermuten. Während die Ablaufkonzentrationen von TCEP und TCPP deutlich unter dem vorläufigen PNEC des UBA liegen, wurden TiBP und TnBP oberhalb des Qualitätszieles für Oberflächenwasser von $0,1 \mu\text{g/l}$ bestimmt (Abbildungen 13 und 14).

In das Abwasser können die phosphororganischen Verbindungen direkt über den Einsatz in Reinigungsmitteln (z.B. TBEP) gelangen. Ein möglicher Weg des TCPPs und TCEPs in das Abwasser ist über Hausstaub und Kontaminationen von Textilien aus Innenräumen und Automobilen [Prösch & Puchert, 2003; Marklund et al., 2003; Hansen et al, 2001]. Dadurch können die Organophosphate dann durch Wasch- und Reinigungsvorgänge ins Abwasser eingetragen werden.

Da FSM auch in Kunststoffen für Wasserrohre eingesetzt werden [Asstech, 2004], kann deren Migration aus Hausinstallationen (Spülenanschluss) ins Wasser nicht ausgeschlossen werden. Dieser Eintrag allein sollte allerdings zu gleichmäßigen Belastungen in einzelnen Kläranlagen führen, was jedoch nicht festgestellt wurde. Es existieren daher wohl noch weitere Eintragspfade, die maßgeblich für die Belastung der Gewässer von NRW verantwortlich sind. So könnten diskontinuierliche Quellen, wie Bau- und Abrisstätigkeiten zu einem punktuellen, kurzzeitigen Eintrag führen.

► 5 Toxikologische Daten



► 5 Toxikologische Daten

5.1 Einleitung

Mit Hilfe ausgewählter in-vitro-Prüfsysteme wurden zytotoxische, genotoxische und mutagene Effekte sowie mögliche hormonelle Wirkungen von TCEP und TCPP 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 hormonartige Wirkung aufweisen, wurde ein Screening auf östrogene/antiöstrogene Effekte mit Reportergensystemen durchgeführt. Ausgehend von den ermittelten Daten wurde eine vorläufige toxikologische Bewertung von TCEP und TCPP erstellt.

5.2 Zytotoxizitätsassay: Neutralrot (NR)-Aufnahme-Assay

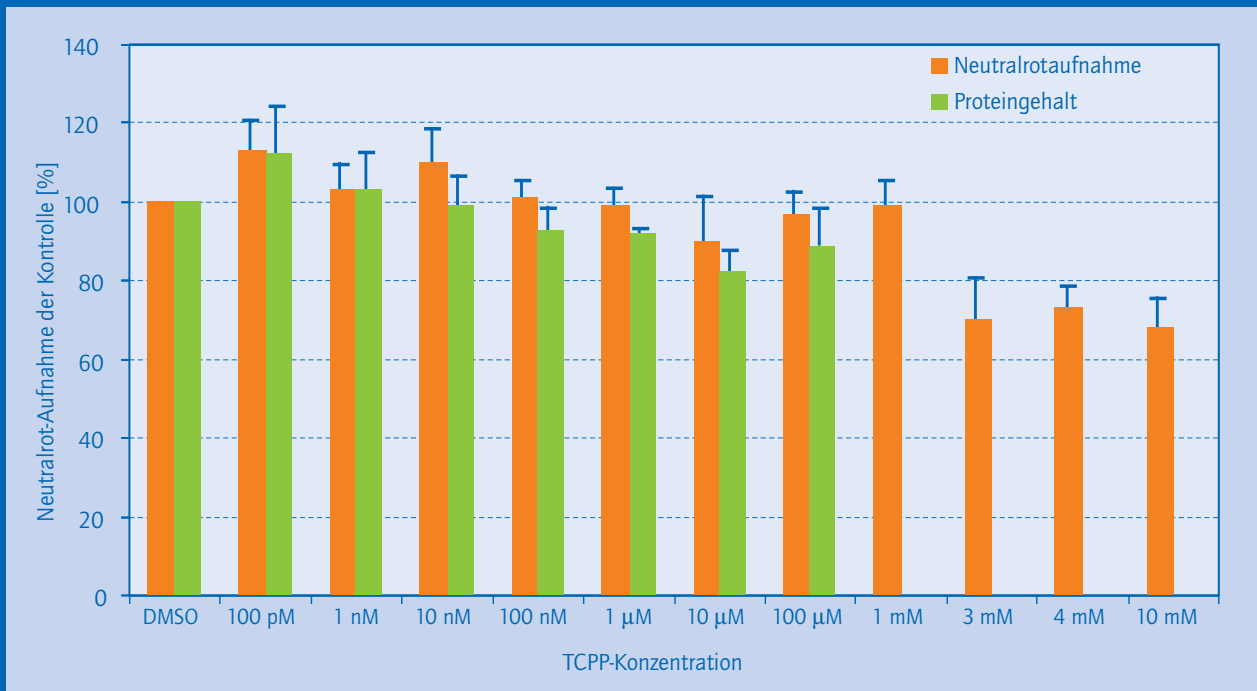
Im NR-Assay wird die Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot in die verwendeten Zellen und die anschließende Speicherung in den Lysosomen photometrisch bestimmt. Werden Zellen durch äußere Noxen (z.B. Chemikalien) in ihrer Vitalität beeinträchtigt, so verringert sich ihr Vermögen zur Aufnahme des Farbstoffs, da dies ein aktiver, energieabhängiger Prozess ist. Die zytotoxische Wirkung einer Testsubstanz äußert sich daher in einer Abnahme der photometrisch messbaren Farbstoffmenge in den Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen.

Der NR-Assay wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Babich und Borenfreund [1992] unter Verwendung von V79-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie vom Chinesischen Hamster) durchgeführt. Im Test wurden auch eine Mediumkontrolle (ohne Testsubstanz), eine Lösemittelkontrolle (Medium mit 0,5% DMSO) und eine Wachstumskontrolle (ohne Medium) mitgeführt. Die Extinktionsbestimmung erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 540 nm. Der Proteinbestimmung lag die Methode nach Bradford [1976] zugrunde, die Messung der Absorption (570 nm) erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät.

Die in den Abbildungen 18 und 19 dargestellten Ergebnisse zur zytotoxischen Wirkung von TCPP und TCEP belegen, dass beide Substanzen als wenig zytotoxisch einzustufen sind. Erst bei Konzentrationen von >1 mM kommt es zu schwachen zytotoxischen Effekten, d.h. die Vitalität der Zellen wird durch die Behandlung derart beeinträchtigt, dass weniger Farbstoff in die Zellen aufgenommen werden kann als in die Kontrollzellen. Es zeigen sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Behandlung mit und ohne Zusatz eines externen enzymatischen Metabolisierungssystems (S9-Mix).

Abbildung 18 Zytotoxizität von TCP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem

Zytotoxizität von TCP in V79-Zellen mit S9-Mix



Zytotoxizität von TCP in V79-Zellen ohne S9-Mix

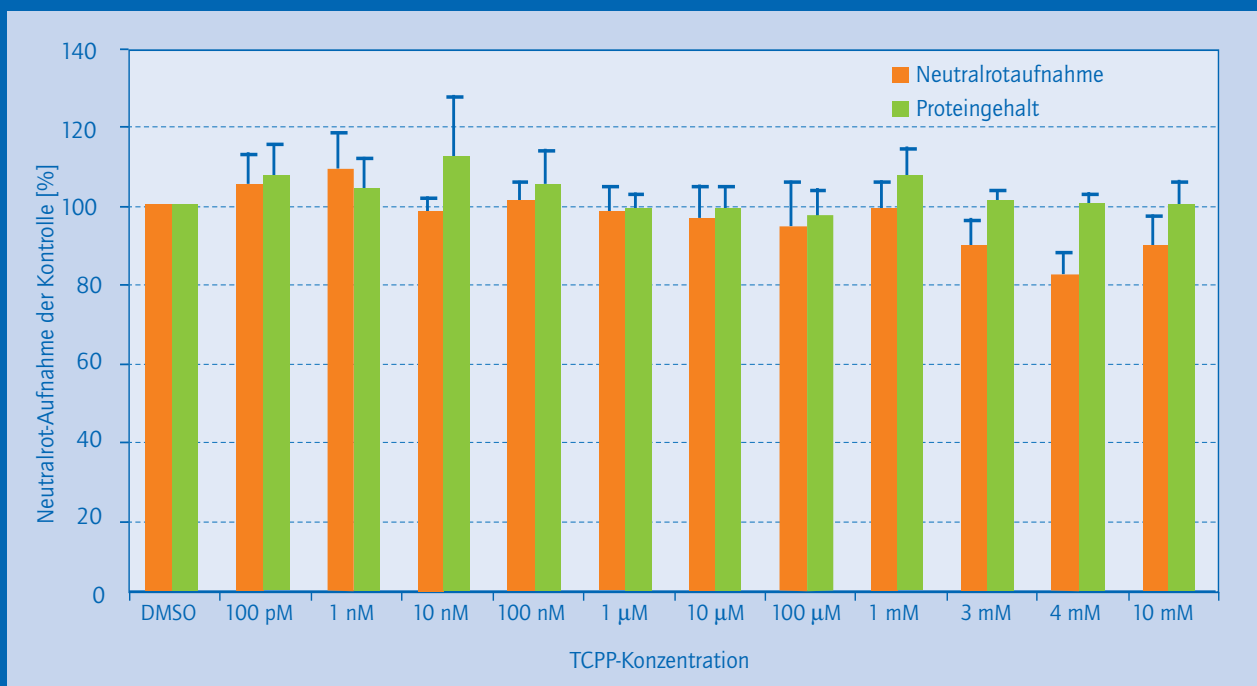
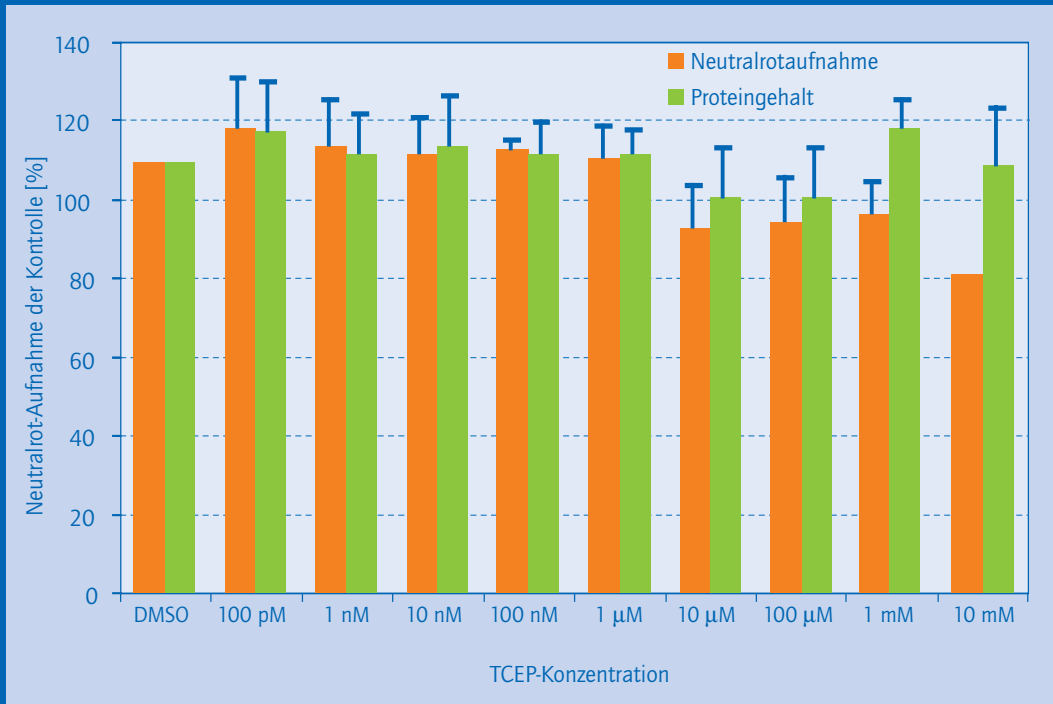
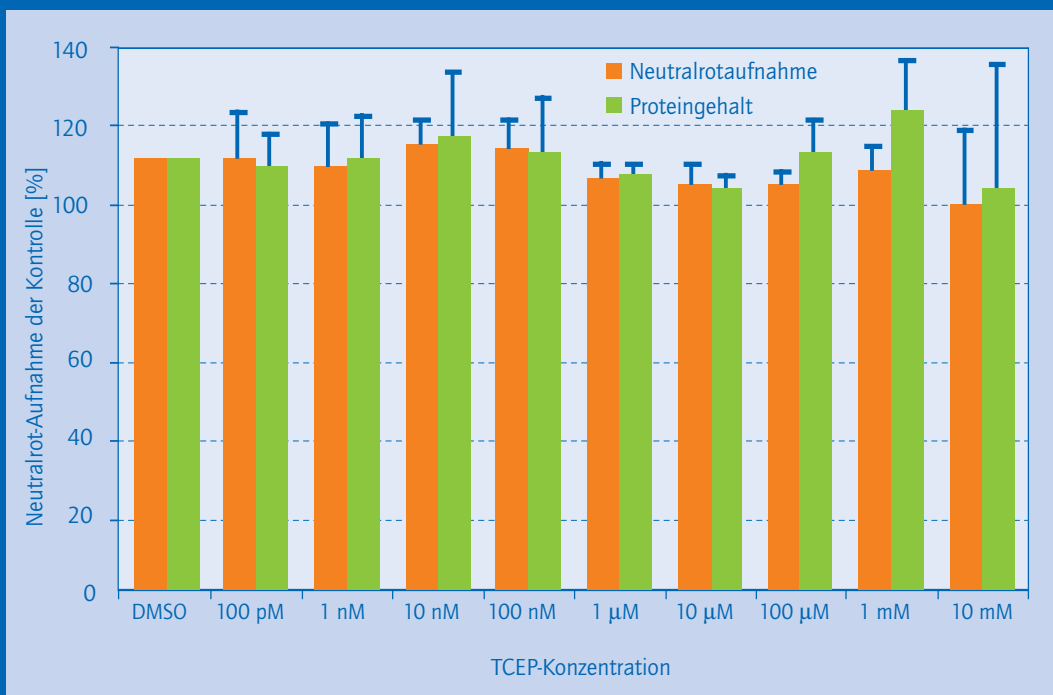


Abbildung 19 Zytotoxizität von TCEP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem

Zytotoxizität von TCEP in V79-Zellen mit S9-Mix



Zytotoxizität von TCEP in V79-Zellen ohne S9-Mix



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

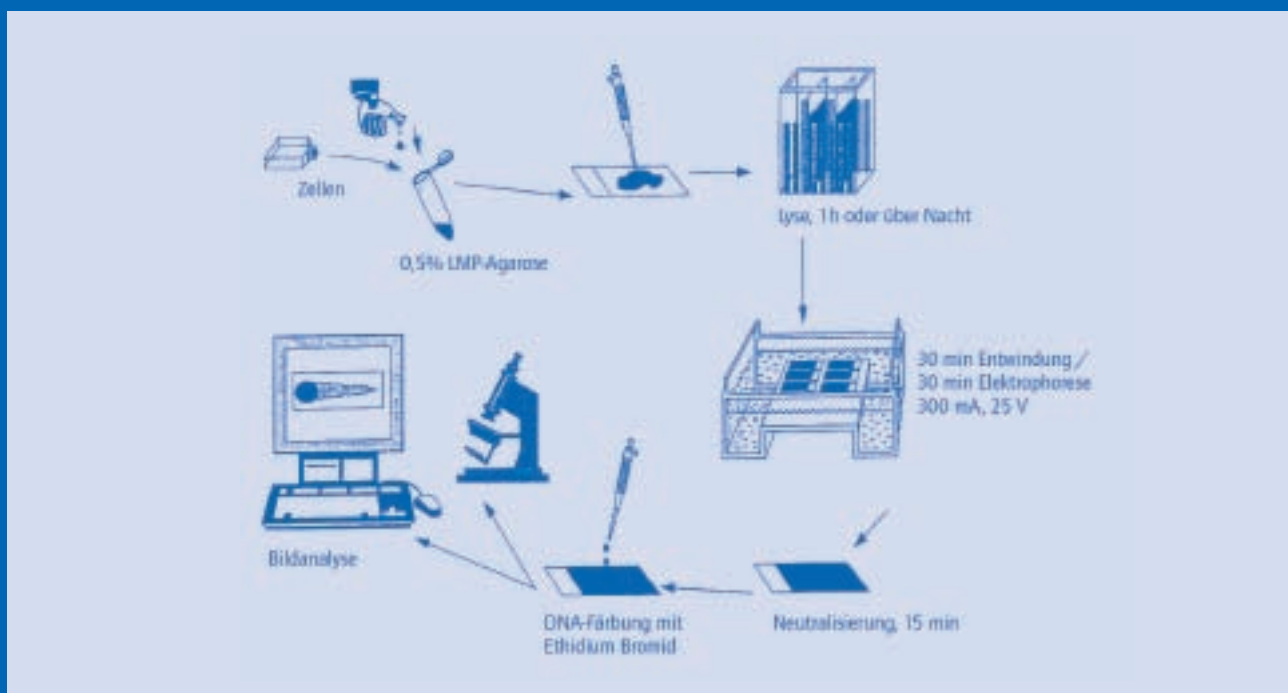
Im so genannten Comet-Assay werden DNA-Schäden detektiert, die durch Testsubstanzen in Zellkulturen induziert werden (Abbildung 20).

Nach der Behandlung der Zellen werden diese in ein Agarsegel eingebettet und der Zellkörper so weit lysiert, dass nur noch die reine DNA im Gel verbleibt. Mit diesem Gel wird eine elektrophoretische Trennung nach Molekülgröße im elektrischen Feld durchgeführt. Ein unbeschädigter, langer DNA-Doppelstrang-Faden wandert aufgrund seiner Größe nicht im angelegten elektrischen Feld. Hat die Testsubstanz allerdings DNA-Einzelstrangbrüche induziert, so liegen auch kleine DNA-Bruchstücke vor. Da diese wesentlich kleiner sind, wandern sie im elektrischen

Feld. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die DNA angefärbt und ist im Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Abbildung 21).

Die ungeschädigte DNA liegt als kreisförmige Masse dort vor, wo sich zuvor der Zellkern befunden hatte (Kopf). Die kleinen DNA-Stücke sind im Gel gewandert und erscheinen wie ein Cometenschweif, daher der Name Comet-Assay. Dieses Bild wird digitalisiert und die Länge des Schweifes (Tail) wird vermessen. Sie gibt Aufschluß über das Ausmaß der von der Testsubstanz induzierten DNA-Schäden. Je länger der Tail ist, desto größer war der induzierte DNA-Schaden. Die Durchführung des Comet-Assay beruht auf der Methode von Singh et al. [1988] und wurde

Abbildung 20 Ablaufschema des Comet-Assay



mit V79-Zellen durchgeführt. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Um keine UV-induzierten DNA-Schäden zu induzieren, wurden die Alkalidenaturierung und die anschließende Elektrophorese ohne direkten Lichteinfall durchgeführt.

Mit dem Comet-Assay konnte keine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCPP und TCEP in V79-Zellen detektiert werden, die sich in einem Anstieg der Tail-Länge in den behandelten Zellen äußern würde (Abbildungen 22 und 23). Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer Behandlung mit und ohne Zusatz eines externen enzymatischen Metabolisierungssystems (S9-Mix).

Ausbildung 21 Auswertung des Comet-Assays

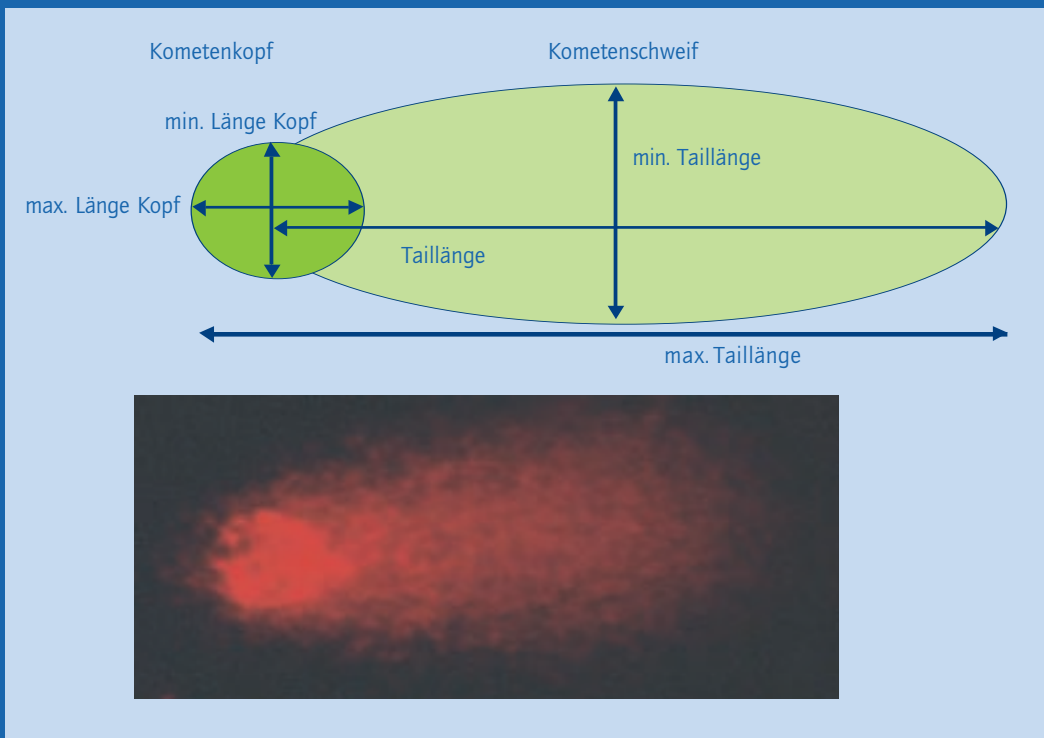


Abbildung 22 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCPP in V79-Zellen Median der Tail-Länge, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)

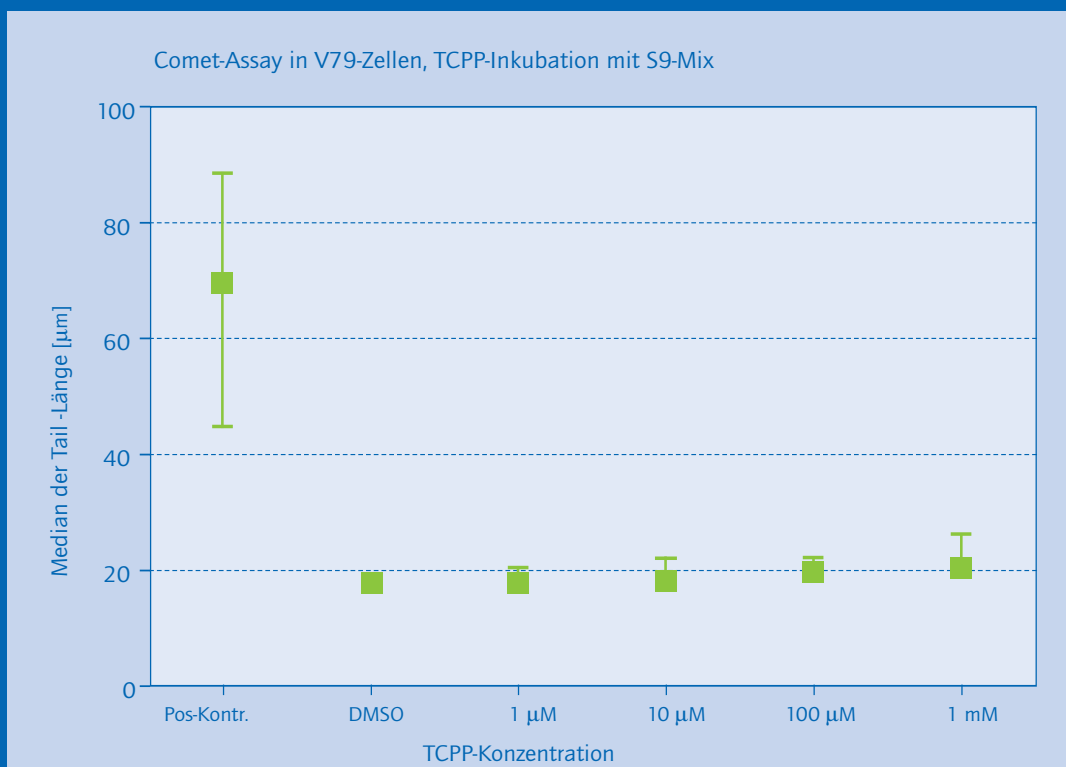
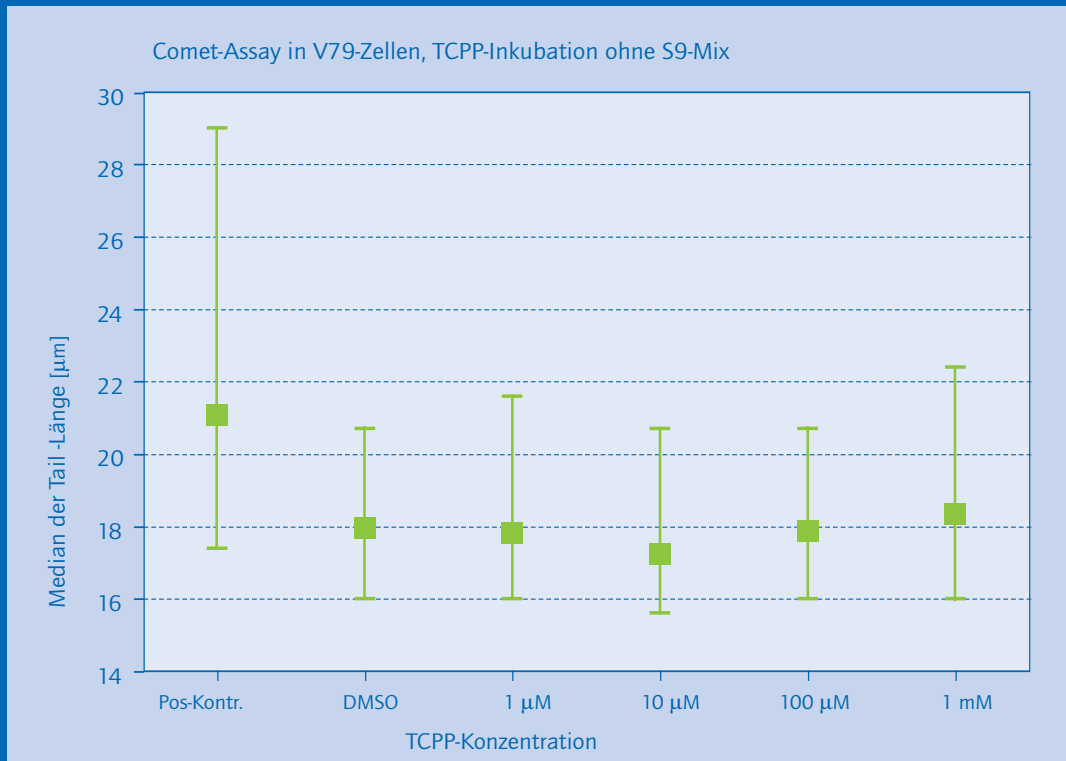
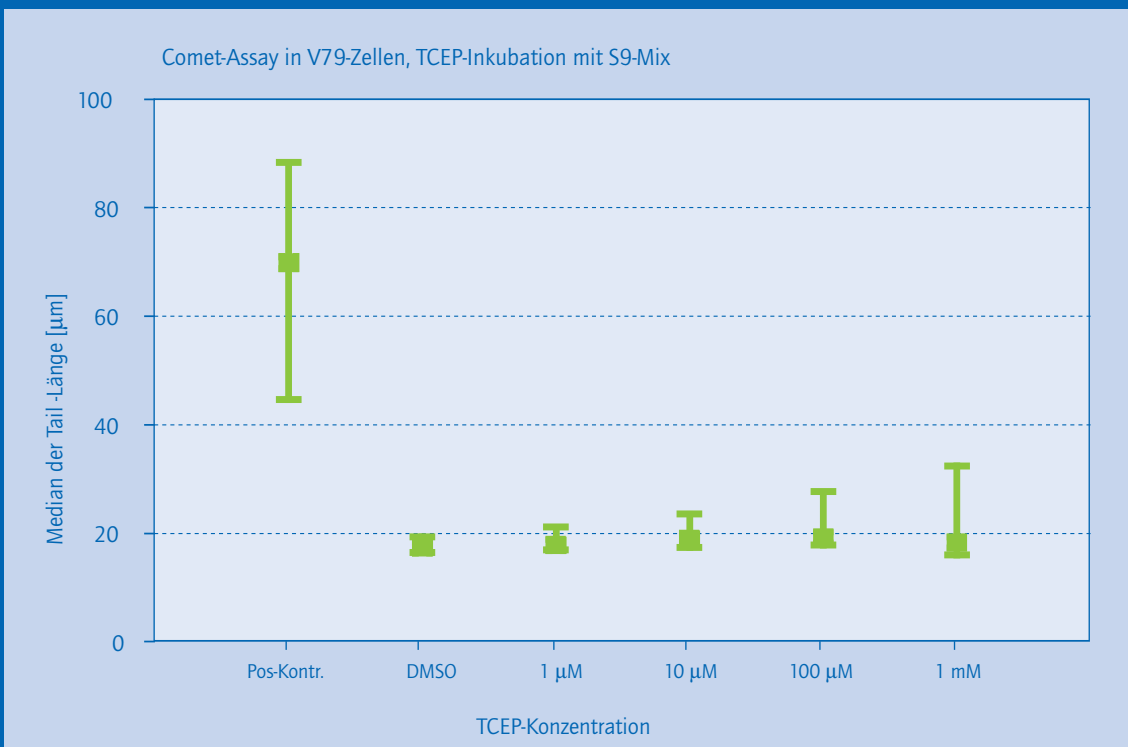
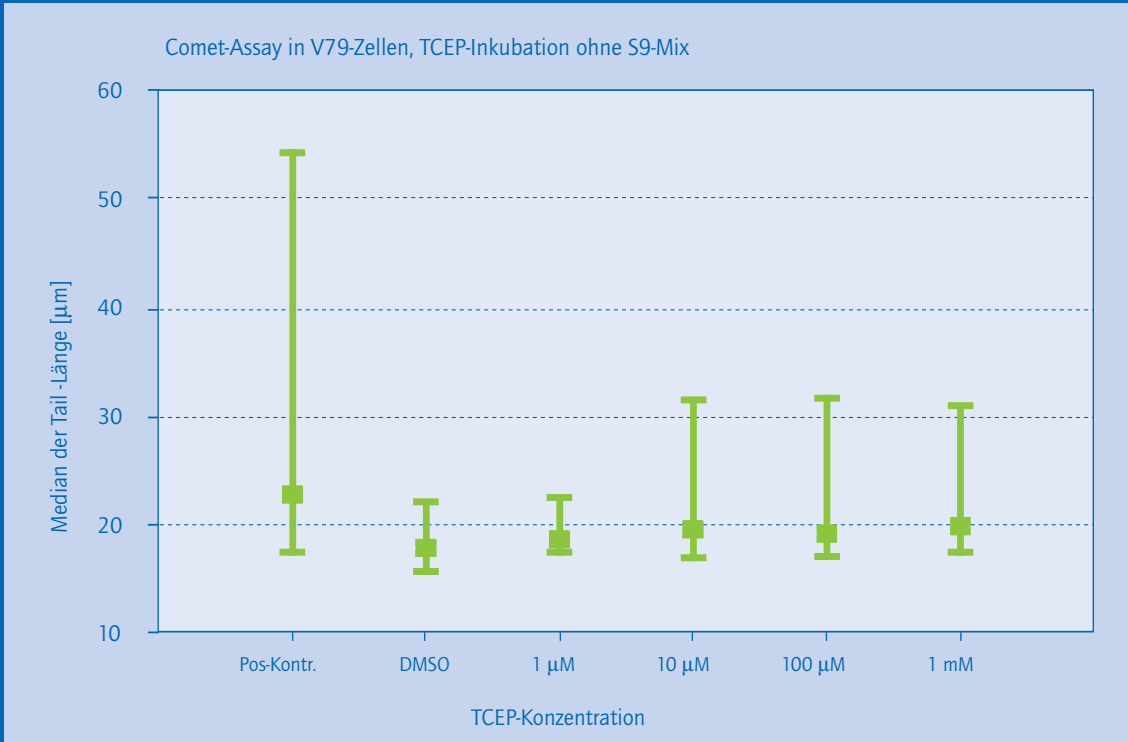


Abbildung 23 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCEP in V79-Zellen Median der Tail-Länge, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)



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 & Ames, 1983]. Es wurden Histidin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium*-Bakterien verwendet, mit deren Hilfe sich chemisch induzierte Basensubstitutions- und Leserastermutationen erfassen lassen.

Die Mangelmutanten dieser Bakterien, die hier verwendet werden, 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 die Bakterien auf einem Minimalnährboden ohne Histidin 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, Chromosomen- oder Genommutationen werden nicht erkannt.

Für diesen Assay wurden acht *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].

Die mikroskopisch kleinen Kolonien der rückmutierten Bakterien wurden mit einem automatischen Zählgerät ausgewertet. 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 zytotoxischer Effekt vor und die Bakterien sind vor der ersten Teilung abgestorben. Die Durchführung des Testes ist in Abbildung 24 dargestellt.

Abbildung 24 Durchführung des Ames-Testes [nach Andrae, 1996]



Bei jeder Testdurchführung wurden Stammkontrollen sowie Negativ-Kontrollen mit dem verwendeten Lösungsmittel und Positiv-Kontrollen mit einem Referenzmutagen für den jeweiligen Stamm mitgeführt. Zudem wurde jede Probe pro Stamm dreifach einer unabhängigen Testwiederholung unterzogen.

Tabelle 7: 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

Bei keinem der hier angewendeten Ames-Assays zeigten TCEP oder TCPP mutagene Wirkungen (Tabellen 8 bis 11), d.h. es wurden keine Basensubstitutions- oder Leserrastermutationen induziert, die sich in Form einer steigenden Anzahl von Revertanten nach Behandlung darstellen würden. Die jeweiligen Positivkontrollen zeigen

einen signifikanten Anstieg der Revertanzahl gegenüber der Spontanrate und Lösungsmittelkontrolle. Die Lösungsmittelkontrollen bestätigen durch die Revertanzahl auf dem Niveau der stammspezifischen Spontanraten, dass die Testdurchführung ordnungsgemäß verlief.

Tabelle 8 Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCPP; Zugabe von S9-Mix;

Stamm	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	186	8	43	3	196	4	394	23
Positivkontrolle	1378	13	2751	227	2965	60	2580	290
DMSO-Kontrolle	161	40	40	3	192	6	438	18
100 nM TCPP	130	9	42	8	198	10	418	33
1 µM TCPP	152	20	47	7	193	16	377	30
10 µM TCPP	149	29	36	2	199	18	376	27
100 µM TCPP	94	20	39	5	203	10	423	49
1 mM TCPP	25	9	39	12	185	9	511	11

Stamm	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	519	42	12	3	11	2	13	1
Positivkontrolle	1826	41	188	21	758	38	2066	81
DMSO-Kontrolle	509	37	10	2	15	3	16	3
100 nM TCPP	556	44	11	3	9	3	14	3
1 µM TCPP	489	37	10	2	10	4	16	4
10 µM TCPP	506	25	10	1	9	2	14	4
100 µM TCPP	497	60	11	1	13	3	18	1
1 mM TCPP	568	11	12	2	15	3	15	2

Tabelle 9 Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCPP; ohne S9-Mix

Stamm	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	190	18	44	4	208	5	455	26
Positivkontrolle	1427	4	2365	88	2279	70	2792	129
DMSO-Kontrolle	217	7	46	5	162	10	432	2
100 nM TCPP	227	26	46	6	192	20	445	8
1 µM TCPP	209	16	42	2	190	8	412	10
10 µM TCPP	215	15	45	2	189	18	395	18
100 µM TCPP	169	15	38	5	174	20	455	5
1 mM TCPP	175	2	46	5	150	10	465	29

Stamm	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	382	60	14	2	13	2	20	1
Positivkontrolle	1038	115	1273	118	117	10	2055	39
DMSO-Kontrolle	430	48	16	1	15	1	22	3
100 nM TCPP	427	79	13	3	15	2	24	3
1 µM TCPP	435	80	13	2	15	7	22	2
10 µM TCPP	415	55	13	2	14	3	21	2
100 µM TCPP	386	54	14	5	15	1	20	2
1 mM TCPP	431	77	17	4	13	2	23	6

Tabelle 10 Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCEP; Zugabe von S9-Mix

Stamm	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	51	23	49	2	185	6	406	25
Positivkontrolle	927	83	2277	150	2182	126	2002	95
DMSO-Kontrolle	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

Stamm	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	516	11	17	2	7	2	10	1
Positivkontrolle	1602	35	339	29	640	24	2279	61
DMSO-Kontrolle	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

Tabelle 11 Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCEP; ohne S9-Mix

Stamm	TA 97a		TA 98		TA 100		TA 102	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	99	16	31	6	204	7	321	29
Positivkontrolle	452	5	1747	28	1252	36	864	14
DMSO-Kontrolle	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

Stamm	TA 104		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD	Revertanten	SD
Spontanrate	574	27	16	3	10	1	20	1
Positivkontrolle	1476	39	1524	41	112	2	2045	39
DMSO-Kontrolle	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

5.5 Östrogene Aktivität

5.5.1 Rekombinanter Hefeassay

Dieser einfache biologische Screening-Assay ermöglicht es, Substanzen aus der Umwelt auf hormon-ähnliche Effekte hin zu untersuchen [Routledge & Sumpter 1996]. Für diesen Test werden Hefen verwendet in deren genetisches Material der humane Östrogenrezeptor- α (ER α) sowie ein Reportergen eingefügt wurden. Eine östrogen wirksame Substanz ruft in diesen Hefen einen Anstieg der Aktivität des Enzyms β -Galactosidase hervor. Dies kann durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Diese Enzymaktivität ist als ein direktes Maß der ER-vermittelten Aktivität der Testsubstanz verwendbar. Als Positivkontrolle verwendet man 17 β -Östradiol, welches einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität bewirkt.

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. 17 β -Östradiol?

Mit Hefeassay kann eine östrogene Aktivität in einem Farbstest 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.

In jedem Versuchsansatz werden Standards (Östradiol im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-12} M) mitgeführt und darauf die Aktivität der Probe bezogen. Die Extinktion wird um die Trübung korrigiert. [Aktivität = Probe E_{540nm}/Probe E_{620nm}].

Unter Berücksichtigung der testbedingten Verdünnung der Probe (1:20) beträgt die Aufkonzentrierung bei der Untersuchung des unverdünnten Probenextraktes AF = 100.

5.5.2 Stimulierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen

In Ishikawa-Zellkulturen löst eine Behandlung mit Östradiol eine Zunahme der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AlkP) aus, die etwa nach drei Tagen ihr Maximum erreicht [Holinka et al., 1986]. Daher werden diese Zellen dazu benutzt, östrogene Wirkungen von Testsubstanzen zu detektieren. Eine Inkubation mit anderen Substanzen, die östrogenartige Wirkungen haben, führt ebenfalls zu einem Anstieg der Enzymaktivität.

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.

5.5.3 Ergebnisse

Der Screening-Assay in Glaxo ERa-Hefen zeigte weder für TCPF noch für TCEP einen östrogenen Effekt. Im Gegensatz zu den Positivkontrollen mit 17 β -Östradiol wurde durch die beiden Testsubstanzen keine Aktivität des Enzyms β -Galactosidase induziert (Abbildungen 25-28).

Abbildung 25 Östrogene Wirkung von TCP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1

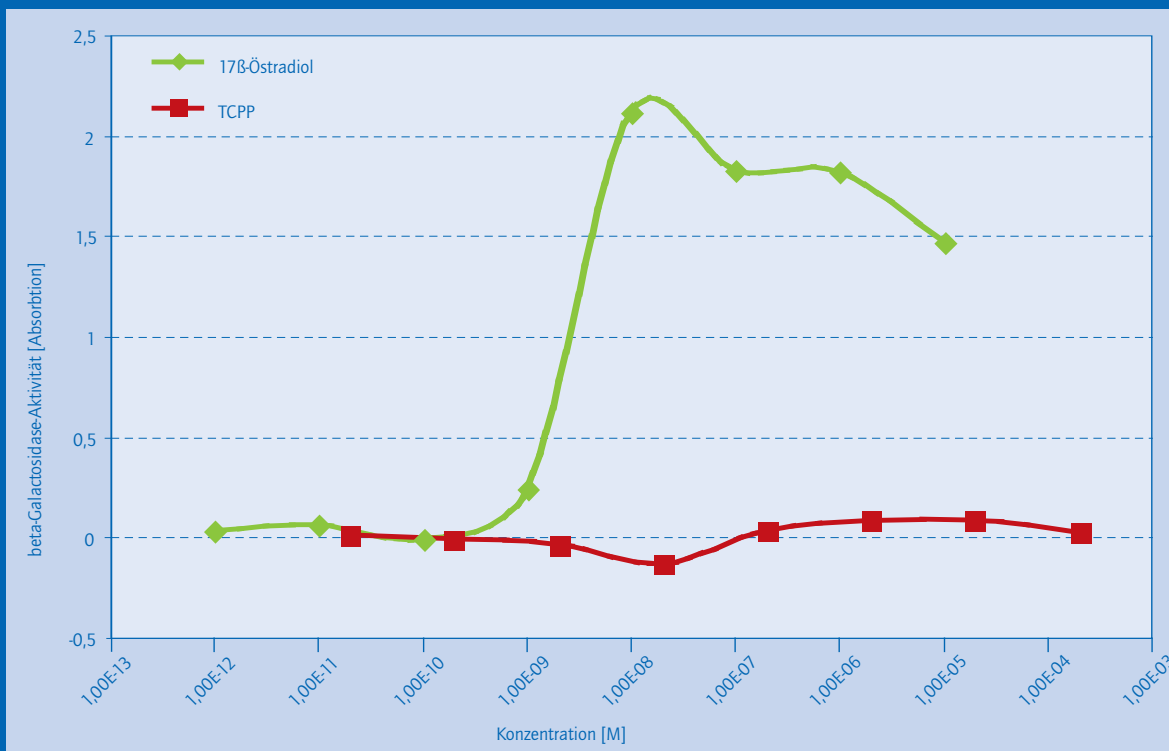


Abbildung 26 Östrogene Wirkung von TCP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2

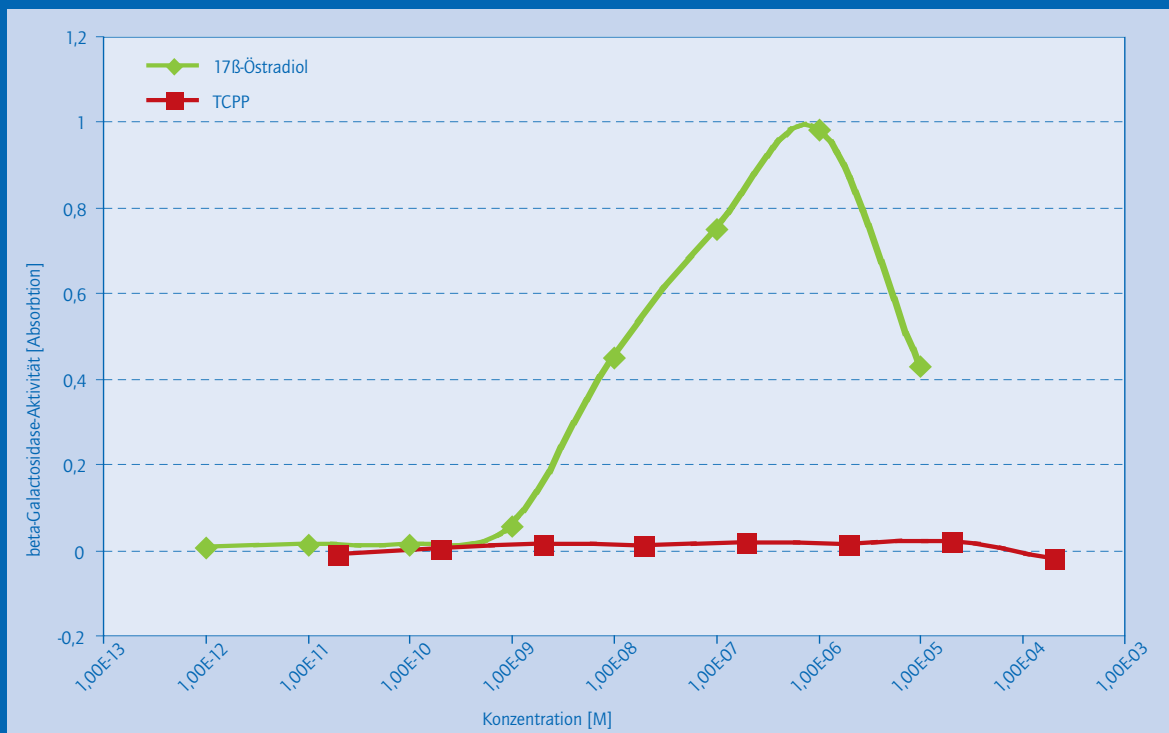


Abbildung 27 Östrogene Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe – Versuch 1

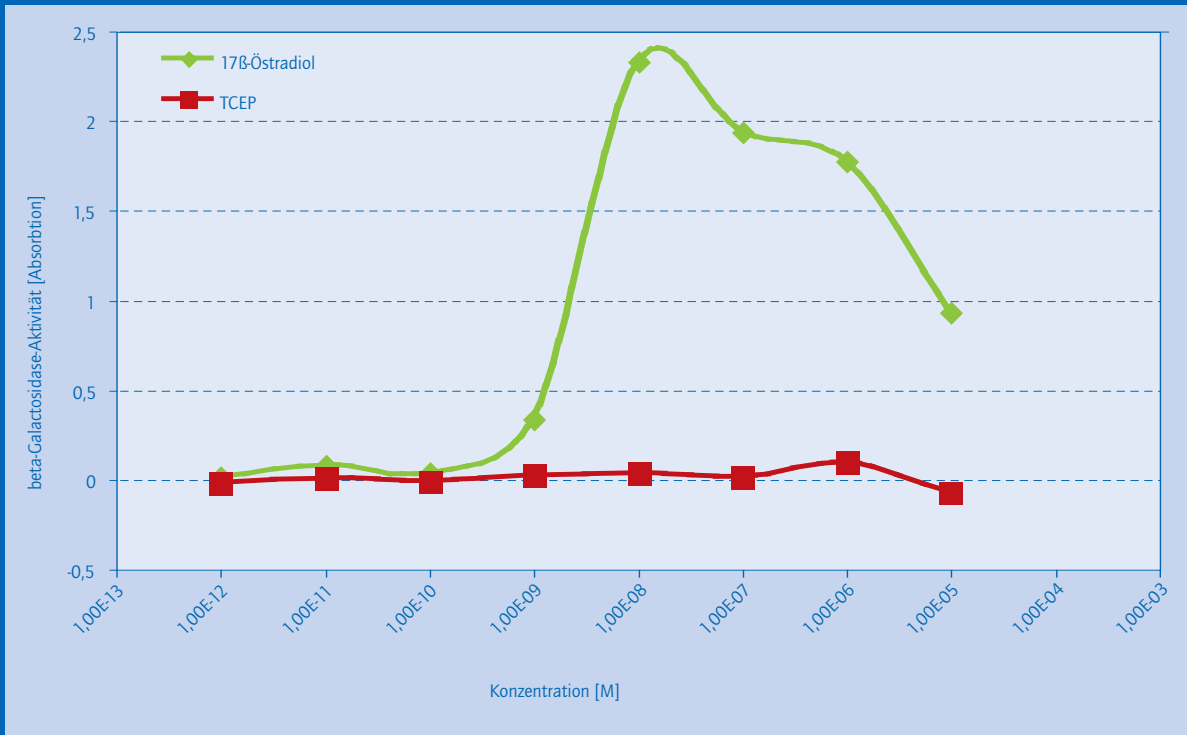
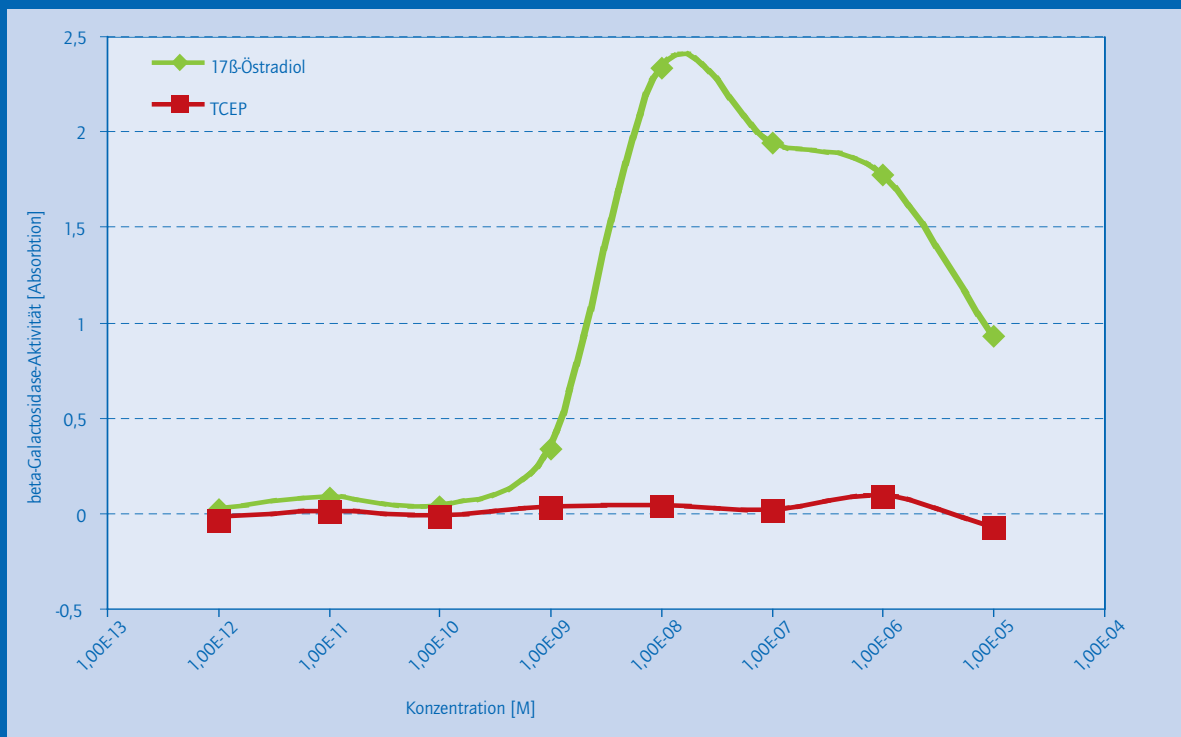
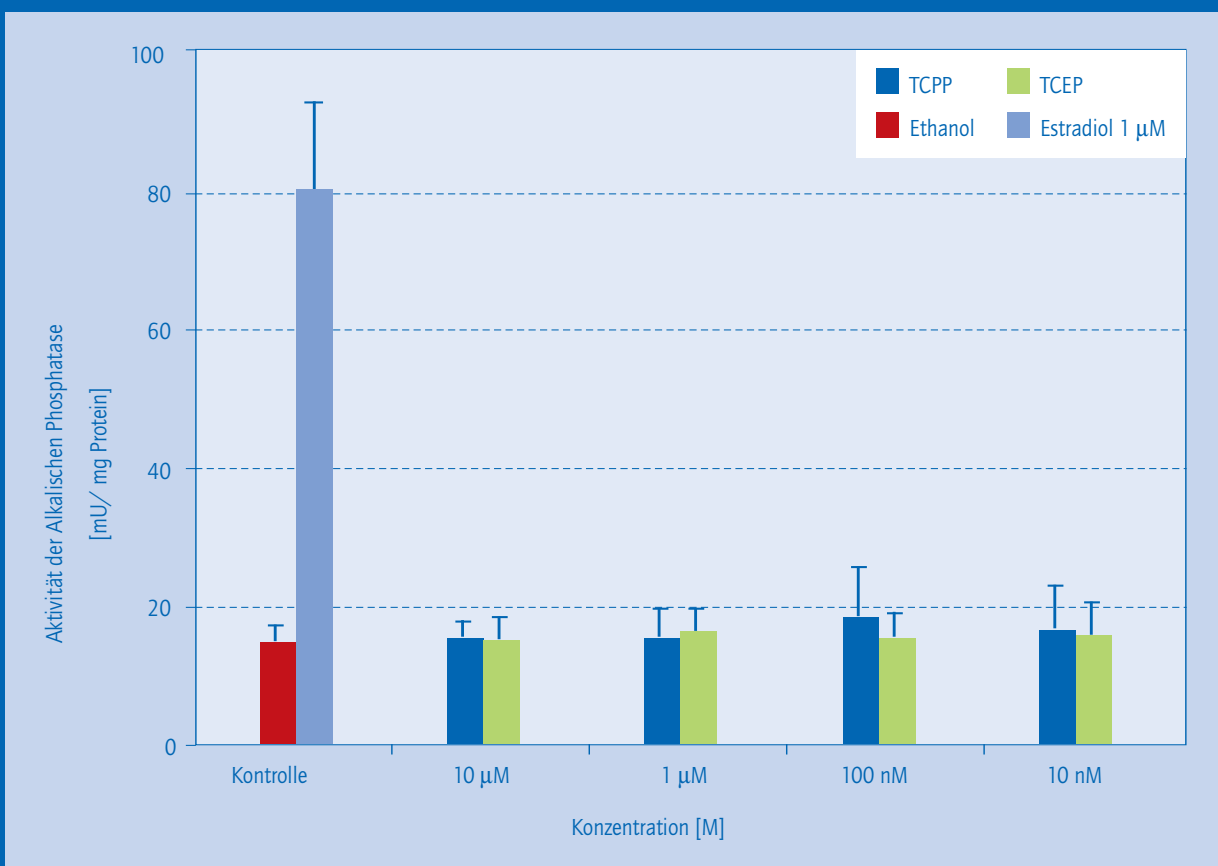


Abbildung 28 Östrogene Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe – Versuch 2



Auch in Ishikawa-Zellen zeigten weder TCPP noch TCEP in den untersuchten Konzentrationen eine östrogene Wirkung. Während die Positivkontrolle mit Östradiol eine deutliche Induktion der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase induziert, bleibt die Aktivität nach TCPP oder TCEP-Behandlung im Bereich der Kontrolle (Abbildung 29).

Abbildung 29 Alkalische Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen



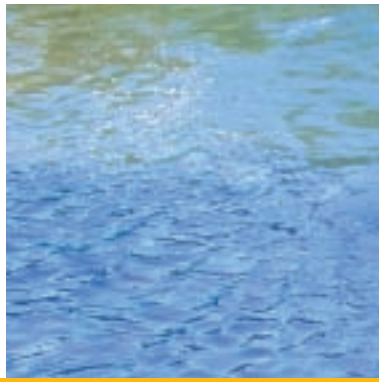
5.6 Diskussion

Die hier untersuchten TCPP und TCEP zeigten in den angewendeten toxikologischen Assays allenfalls bei sehr hohen Konzentrationen einen adversen Effekt. So wurde eine schwache Zytotoxizität gegenüber V79 Zellen erst ab Konzentrationen von über 1 mM (284 mg/l TCEP und 327 mg/l TCPP) festgestellt. Es ist nicht auszuschließen, dass andere, primäre Zellkulturen möglicherweise empfindlicher reagiert hätten. Ein genotoxischer Effekt in Form einer Induktion von DNA-Strangbrüchen konnte in den durchgeführten Tests nicht nachgewiesen werden. Im Ames-Assay mit acht verschiedenen Teststämmen zeigten weder TCPP noch TCEP mutagene Effekte. Es ergaben sich also keine Hinweise auf ein mutagenes Potential oder andere genotoxische Schäden wie DNA-Strangbrüche (Comet-Assay). Die Verwendung des externen Metabolisierungssystems (S-9 Mix) zeigte in allen Testsystemen keine Modulation des toxischen Effektes. Daher ist davon auszugehen, dass auch durch eine Metabolisierung der Substanzen 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.

Es wird allerdings 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 Analytischer Teil



► 6 Analytischer Teil

Mit der vorliegenden Methode werden die folgenden Organophosphate 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).

6.1 Festphasenextraktion

Die Extraktion der Analyten erfolgt mittels Festphasenextraktion aus 11 Proben, welchen 100ng des internen Standards (TnBPd27) zugesetzt wurden. Anschließend werden die Analyten mit Toluol und tert-Butylmethylether eluiert. Nach Trocknung der organischen Phase erfolgt ein clean-up über Kieselgel. Nach Einengen des Extraktes erfolgte die Messung mittels GC-MS. Die Wiederfindung des Extraktionsschrittes ist in Tabelle 12 gegeben.



Tabelle 12 Wiederfindungen der Analyten (Festphasenextraktion)

Verbindung	SPE-Wiederfindung [%]
TiBP	78
TnBP	87
TCEP	83
TCPP	80
TDCP	81
TBEP	90
TPP	75

6.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Probenaufbereitung:

Die Proben wurden mit Toluol und dem internen Standards (jeweils 100ng TnBP-d₂₇) versetzt gerührt. Nach Phasentrennung wird die organische Phase abgenommen und getrocknet, eingengt und mit GC-MS vermessen.

Beide beschriebenen Methoden eignen sich gleichermaßen zur Bestimmung von Organophosphaten aus Oberflächen-gewässern. Die Festphasenextraktion ist bei der Bestimmung von TCEP vorzuziehen, da hier bessere Wiederfindungsraten erzielt werden (Tabelle 13). Nach Einbeziehung der entsprechenden Wiederfindungsraten liefern beide Methoden (SPE und LLE) vergleichbare Ergebnisse. Da stark matrixbehaftete Proben (Abwasser) nach der Festphasenextraktion Minderbefunde ergaben,

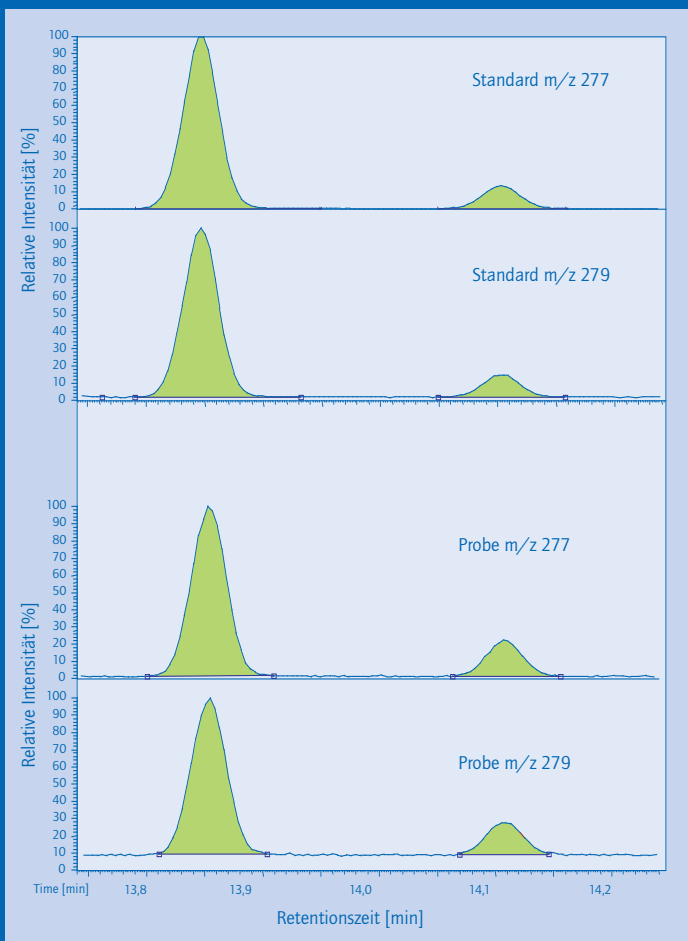
wurde vorwiegend mit Flüssigextraktion gearbeitet. Die SPE diente hauptsächlich zur Absicherung der TCEP Konzentrationen. Die Identifizierung der Analyten erfolgt über die Retentionszeit und die Masse (m/z) des ausgewählten Massenfragments. Tabelle 9 zeigt die Validierungsdaten für die verwendeten Methoden, Abbildung 30 zeigt am Beispiel von TCPP die Identifizierung der Verbindungen über zwei Ionenspuren. Die Absicherung über das full-scan-Spektrum der Verbindungen ist nur bei höheren Konzentrationen möglich (Abbildungen 31-38).

Tabelle 13 Methodenkenndaten der Gesamtmethode

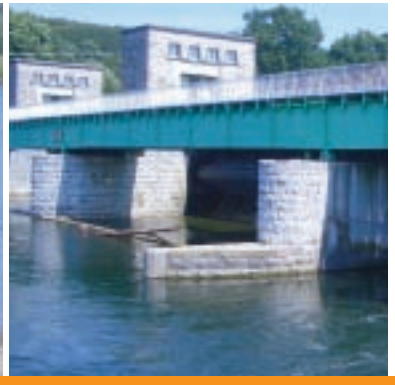
Verbindung	Retentionszeit [min]	SIM-Ionen [m/z]	Wiederfindung [%]	RSD [%]	Bestimmungsgrenze [ng/l]
TiBP	10,87	155, 211	107	12	6
TnBP	11,95	155, 211	98	19	6
TCEP (LLE)	13,47	249, 251	31	33	12
TCEP (SPE)	13,47	249, 251	67	15	12
TCPP	13,85	277, 279	101	14	5
TDCP	18,92	381, 379	95	3	14
TBEP	19,55	199, 125	89	19	6
TPP	19,59	325, 326	93	27	6

Da es sich beim TCPP um ein Isomergemisch handelt, werden beide Isomere über die aufgezeichneten Ionenspuren sichtbar. Sie unterscheiden sich jedoch auf Grund ihrer Retentionszeiten von 13,86 und 14,11 min (Abbildung 30).

Abbildung 30 Selected ion monitoring (SIM) Chromatogramme von TCPP einer Standardlösung und einer Abwasserprobe



► 7 Zusammenfassung



► 7 Zusammenfassung

Die Untersuchungsreihen über die Ruhr, im Abwassernetz Dortmunds und die Kläranlagen Köln-Stammheim sowie Dortmund-Deusen haben gezeigt, dass die hier betrachteten Organophosphorverbindungen im Abwasser und Oberflächenwasser nachweisbar sind. 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 in erster Linie Kläranlagen identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Klärwerke auch unterschiedlich zur Verschmutzung beitragen. In Oberflächenwasserproben mit direkter Einleitung von Klärwerksabläufen konnten Höchstwerte von 150ng/l für TCEP, 380ng/l für TCPP und 120ng/l für TDCP ermittelt werden. Die nichthalogenierten Organophosphate wurde hier mit bis zu 110ng/l TnBP, 1900ng/l TiBP und 480ng/l TBEP bestimmt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Nebenflüsse der Ruhr, wie z.B. die Möhne, von denen man bisher annahm, dass sie kaum von Kläranlagen beeinflusst sind, ebenfalls zur Verschmutzung der Ruhr beitragen. Es liegt daher der Schluss nahe, dass es noch weitere bisher unbekannte Eintragspfade geben muss. In Betracht zu ziehen wäre hier unter anderem der Eintrag aus Deponien.

Die Probenserie im Großklärwerk Köln-Stammheim zeigte, dass sich die halogenierten und nichthalogenierten Organophosphate unterschiedlich verhalten. Während sich bei den nichthalogenierten Verbindungen, 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. Die Untersuchungen an der Kläranlage Dortmund-Deusen

zeigten, dass TCPP trotz Absorption am Schlamm kaum entfernt wird. In den Abläufen der untersuchten Kläranlagen wurden Konzentrationen bis zu 420ng/l TCEP, 6700ng/l TCPP, 290ng/l TDCP, 2300ng/l TnBP, 260ng/l TiBP, 440ng/l TPP und 900ng/l TBEP bestimmt.

In das Abwasser können die phosphororganischen Verbindungen direkt über den Einsatz in Reinigungsmitteln (z.B. TBEP) gelangen. Ein möglicher Weg des TCPPs und TCEPs in das Abwasser ist über Hausstaub und Kontaminationen von Textilien aus Innenräumen und Automobilen [Prösch & Puchert, 2003; Marklund et al., 2003; Hansen et al, 2001]. Dadurch können die Organophosphate dann durch Wasch- und Reinigungsvorgänge ins Abwasser eingetragen werden. Da FSM auch in Kunststoffen für Wasserrohre eingesetzt werden [Asstech, 2004], kann deren Migration aus Hausinstallationen ins Wasser nicht ausgeschlossen werden. Dennoch scheinen weitere Eintragspfade zu existieren, die maßgeblich für die Belastung der Gewässer von NRW verantwortlich sind. So könnten diskontinuierliche Quellen, wie Bau- und Abrisstätigkeiten zu einem punktuellen, kurzzeitigen Eintrag führen.

Deshalb und auf Grund der Emission aus Baumaterial kann keine Korrelation zu den an die Kläranlagen angeschlossenen Einwohnern hergestellt werden. Dies zeigt auch die zeitliche Variabilität der Befunde.

Aufgrund der Kontaminationen der untersuchten Oberflächengewässer wurden am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund zelltoxische (zytotoxische), erbgutschädigende (genotoxische), erbgutverändernde (mutagene) und hormonelle (hier: östrogene) Wirkungen von TCPP und TCEP an Bakterien und an verschiedenen Zellkulturmodellen untersucht. Diese toxikologischen Untersuchungen zeigen, dass allenfalls bei sehr hohen Konzentrationen schwache Effekte auftraten. So trat eine

schwache Zelltoxizität gegenüber Zellkulturen von Lungenfibroblastenzellen des Hamsters (V79-Zellen) erst bei Konzentrationen von über 1 mM (284 mg/l TCEP und 327 mg/l TCPP) auf. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass andere Zellen möglicherweise empfindlicher reagieren. Eine Schädigung der Erbinformation durch von TCPP und TCEP induzierte Brüche am DNA-Doppelstrang konnte in V79-Zellen nicht nachgewiesen werden. Auch erbgutverändernde Wirkungen wurden in einem allgemein anerkannten Testsystem mit Salmonella-Bakterien (Ames-Assay) nicht gefunden.

Für beide Testsubstanzen lagen bislang keine Daten zu möglichen hormonellen Wirkungen in der Literatur vor. Daher wurde im Rahmen dieses Vorhabens erstmals ein Screening auf die östrogene Wirkung der Substanzen durchgeführt. An Hefezellen (Glaxo-Era-Hefen) und an humanen Endometrium-Karzinom-Zelllinien (Gebärmutter schleimhaut) konnten keine östrogenen Wirkungen von TCEP oder TCPP festgestellt werden.

Die Verwendung des externen Metabolisierungssystems (S-9 Mix) zeigte in allen Testsystemen keine Modulation des toxischen Effektes. Daher ist davon auszugehen, dass auch durch eine Metabolisierung der Substanzen keine stärker toxischen Metabolite gebildet werden. Es wird allerdings 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. So wurde in früheren Studien die aquatische Toxizität auf Fische, Algen und Daphnien untersucht, die NOEC liegt für TCEP und TCPP bei 2-10 mg/l [IUCLID, 1995a,b]. Beide Verbindungen sind in die Wassergefährdungsklasse 2 (wassergefährdend) eingestuft und besonders problematisch, da sie eine hohe Langzeitstabilität aufweisen und eine längerfristig schädliche

Wirkung in Gewässern und für Wasserorganismen haben können. Zur Wirkung von TCEP und TCPP auf den Menschen liegen noch keine gesicherten Ergebnisse vor. Im Tierexperiment mit Ratten konnte eine krebserzeugende Wirkung und Neurotoxizität von TCEP festgestellt werden [Industrie B.d.c., 1995]. Ein verminderter Eintrag der persistenten chlorierten Flammschutzmittel in die aquatische Umwelt im Sinne des Vorsorgeprinzips ist deshalb zu fordern.

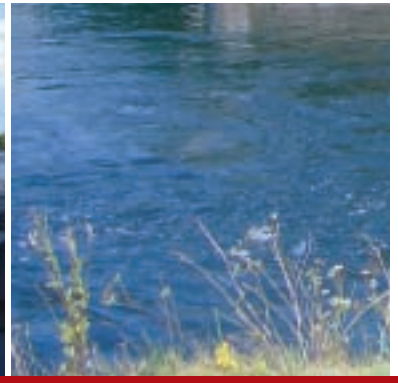
Die Gewässerqualitätsverordnung legt Qualitätsziele und Programme zur Verringerung der Verschmutzung oberirdischer Gewässer für 132 Stoffe fest. Das Qualitätsziel für die Organophosphorverbindung Tributylphosphat (TBP) beträgt 0,1 µg/l. Dieser Wert wird bei einer Vielzahl von Proben in der Ruhr und deren Nebenflüssen nicht eingehalten (Abbildung 5). Für die anderen in diesem Projekt untersuchten Organophosphate existieren keine Qualitätsziele. Ob Verbindungen wie TCEP und TCPP, welche ebenfalls deutlich oberhalb von 0,1 µg/l bestimmt wurden (Abbildung 4), in das Programm zur Verringerung der Oberflächenwasserverschmutzung aufgenommen werden sollten, bleibt zu klären.

Grundlage der Risikobewertung von Stoffen für den Umweltbereich ist der Vergleich der Umweltkonzentration (PEC) mit deren Wirkung in den entsprechenden Umweltkompartimenten (PNEC). Dieses Risk Assessment gibt je nach Verhältnis von PEC zu PNEC eines Stoffes den möglichen Handlungsbedarf zur Verringerung des Eintrages in die Umwelt vor. Für TCEP wird vom UBA ein vorläufiger PNEC von 65 µg/l und für TCPP von 120 µg/l angegeben [persönliche Mitteilung]. Die TCEP-Konzentration wurde in den Oberflächengewässern mit bis zu 0,15 µg/l und in Kläranlagenabläufen mit bis zu 0,43 µg/l bestimmt. TCPP wurde in den Oberflächengewässern bis zu 0,38 µg/l und im gereinigten Abwasser bis zu 6,7 µg/l aufgefunden. Die

gemessenen Konzentrationen sind somit für beide Verbindungen geringer als der PNEC. Bei einem PEC/PNEC kleiner als 1 gibt der Stoff keinen Anlass zu unmittelbarer Besorgnis [Richtlinie 67/548/EWG]. Das Prinzip der Konzentrations-Additivität für Umweltkontaminanten ist hier jedoch zu bemerken. Dieses besagt, dass Verbindungen auch in Konzentrationen unterhalb der Einzelstoffwirkungsschwellen zur Gesamtoxizität eines Substanzgemisches beitragen können.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, durch technische Maßnahmen in der Betriebsführung von Kläranlagen eine bessere Entfernung der Organophosphate zu erreichen. Hierzu ist es notwendig, detaillierte Untersuchungen der einzelnen Behandlungsschritte in Kläranlagen durchzuführen. Zudem sollten noch unbekannte Eintragspfade aufgeklärt und der mögliche partikelgebundene Transport der Verbindungen im Rohabwasser näher untersucht werden.

► 8 Literatur



► 8 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
- ARGE (2000) ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR DIE REINHALTUNG DER ELBE, Ausgewählte organische Spurenverunreinigungen in der Elbe und Elbenebenflüssen im Zeitraum 1994 - 1999
- AssTech (2004) Newsletter FSM, im internet unter: www.asstech.com
- Aston, L.S., Noda, J., Seiber, J.N. (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
- BASF AG (1999), Sicherheitsdatenblatt von TCPP gemäß 91/155/EWG
- Bayer AG (1999), Sicherheitsdatenblatt von Levargard PP
- 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
- BrüggemannChemical (2004) Technische Informationen Flammenschutzmittel Brüggolen,
- BUA (1988) Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe: Tris(2-chlorethyl)-phosphat, *BUA-Stoffbericht* 20, VCH Weinheim
- BUA (1991) Tributylphosphat/Dibutylphosphat *Bericht Nr. 108*, S. Hirzel-Verlag Stuttgart
- Charlsson, H., Nilsson, U., Östman, C. (2000) Video Display Units: An Emission Source of the Contact Allergenic Flame Retardant Triphenyl Phosphate in the Indoor Environment, *Environ SciTechnol* 34, 3885-3889
- Clausen, P.A., Wolkoff, (1999) Preliminary Study of Semivolatile Organic Compounds in some Danish Indoor Environments. Indoor Air 99, Edinburgh, Construction Research Communication Ltd
- Davenport, R.E., Fink, U., Ishikawa, Y. (1999) Flame Retardants, SRI International
- Deroux, J. M., Gonzalez, C., Le Cloirec, P., Kovacsik, G. (1996) Analysis of extractable organic compounds in water by gas chromatography mass spectrometry : applications to surface water, *Talanta* 43, 365-380
- Fooker, C., Gühr, R., Häckl, M., Seel, P. (1997) Orientierende Messungen gefährlicher Stoffe. Landesweite Untersuchungen auf organische Spurenverunreinigungen in hessischen

- Fließgewässern, Abwässern und Klärschläm-
men, 1991 – 1996, Hrsg. Hessischen
Landesanstalt für Umwelt - Wiesbaden
- Fooker, C., Gühr, R., Seel, P. (2000)
Orientierende Messungen gefährlicher Stoffe.
Landesweite Untersuchungen auf organische
Spurenverunreinigungen in hessischen
Fließgewässern, Abwässern und
Klärschlämmen, 1991 - 1998. Ergänzender
Bericht zu 1997 - 1998, Bericht der Hessischen
Landesanstalt für Umwelt für die hessischen
Wasserbehörden
- Friedle, A. (1999) Umweltmonitoring organisch
substituierte Trisphosphate, *Umed – info*, PMA
Sindelfingen GmbH
- Fries, E. & 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
- Great Lakes (2004), Sicherheitsdatenblätter von
PHT4-DIOL/70 (TCPP), *REOFOS TPP* und
DURAD TBEP
- Grundmann, A. (2002) Methodenentwicklung
zur Bestimmung von Alkylphosphaten unter
besonderer Berücksichtigung von Tris (2-chlor-
propyl) phosphat und Tris (2- chlorethyl) phos-
phat aus wässrigen Proben, *Diplomarbeit*
Universität Dortmund, Fachbereich Chemie,
Institut für Umweltforschung (INFU)
- Hankemeier, T., Steketeer, P.C., Vreuls, J.J.,
Brinkman, U.A.T. (1999) At – line SPE – GC –
MS of micropollutants in water using the
PrepStation, *Fresenius J Anal Chem* 364, 106-
112
- Hansch, C., Leo, A., Hoekmann, D. (1995)
Exploring QSAR, Hydrophobic, Elektronic, and
Steric Constants, *DC: American Chemical*
Society, Washington.
- Hansen, D., Volland, G., Zöltzer, D. (2001)
Bestimmung und Vorkommen von phosphor-
organischen Verbindungen in Hausstaub und
Raumluft, *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft*
61, 13-17
- Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H., Gursipe,
E. (1986) Effects of steroid hormones and anti-
steroids on alkaline phosphatase activity in
human endometrial cancer cells (Ishikawa line).
Cancer Res 46, 2771-2774
- Industrie B.d.c. (1995) Toxikologische
Bewertung: TCEP, Nr.33. Programm zur
Verhütung von Gesundheitsschädigungen durch
Arbeitsstoffe
- 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
- IUCLID TCEP (1995a) Datensatz (International
Uniform Chemical Information Database) zu
Tris(2-chloroethyl)phosphate, Stand Oktober
1995

- IUCLID TCPP (1995b) Datensatz (International Uniform Chemical Information Database) zu Tris(2-chloro-1-methylethyl)phosphate, Stand Oktober 1995
- Kawagoshi, Y., Fukunaga, I., 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
- Kemmlin, S., Hahn, O., Jann, O. (2003) *Atmospheric Environment*, 37, 5485-5493
- Kuhlmann, B. (1991) Auftreten und Verhalten von Triarylphosphaten und Triaryl-alkylphosphaten in Gewässern. Institut für Wasserforschung GmbH Dortmund und der Dortmunder Stadtwerke AG, Dortmund
- 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
- Marklund A., Andersson B., Haglund P. (2003) Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments, *Chemosphere*, 53 (9): 1137-1146,
- Marnett, L.J. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagen in Salmonella tester strain TA 104. *Mutat Res* 148, 25-34
- Maron, D.M., Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173-215
- Metzger, J. W. & Möhle, E. (2001) Flammschutzmittel in Oberflächenwässern, Grundwässern und Abwässern – Eintragspfade und Gehalte, Institut 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
- MUNLV (2000) Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in NRW 2000, Datensammlung
- NICNAS, Triphosphates (2001) Priority Existing chemical Assessment Report No. 17, ISBN 0 642-70984-X
- Nielsson, H., Carlsson, U., Becker, G., 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., Yanagisawa, Y. (2001) Analysis of Organic Esters of Plasticizer in Indo Air by GC- MS and GC – FPD, *Environ. Sci Technol* 36, 3099-3102
- Paxeus, N., (1996) *Water Research*, 30, 1115-1122
- Prösch, J., Puchert, W., Gluschke, M. (2000) Vorkommen von Chloralkylphosphaten in den Abläufen kommunaler Kläranlagen des deutschen Ostsee-Einzugsgebietes, *Vom Wasser* 95, 87-96
- Prösch, J. & Puchert, W. (2003) Kontaminierte Textilien - eine Ursache für die TCPP-Belastung kommunaler Abwässer? *Vom Wasser*, 100, 1-8
- Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe
- Richtlinie 76/464/EWG des Rates vom 4. Mai 1976 betreffend die Verschmutzung; infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft
- Römpp, (1997) Chemie-Lexikon, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Routledge, E., & Sumpter, J.P. (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., Scheutwinkel, M. (1997) Tris(2-chlorethyl)-phosphat, *Umweltmed Forsch Prax* 2, 185-192
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (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., 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
- UBA (2001) Texte des Umweltbundesamtes 25-27/2001
- UFOPLAN (2004) Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit , Emissionen von Flammschutzmitteln aus Bauprodukten und Konsumgütern
- WHO (2000) IPCS Environmental Health Criteria 218: Flame Retardants

► 9 Anhang



9 Anhang

Tabelle 14 Übersicht über die Konzentrationen im Ablauf der Nachklärung (NK) und im Gesamtablauf des Klärwerkes Köln-Stammheim

Datum	Probenart	TiBP [ng/l]	TnBP [ng/l]	TCEP [ng/l]	TCPP [ng/l]	TDCP [ng/l]	TBEP [ng/l]	TPP [ng/l]
17.02.2003	NK Köln Ablauf1	180	95	190	1400	71	190	49
17.02.2003	NK Köln Ablauf2	220	130	230	1700	86	210	59
18.02.2003	Köln Ablauf1	120	110	260	2500	79	270	45
18.02.2003	Köln Ablauf2	120	110	270	2500	81	310	58
19.02.2003	NK Köln Ablauf1	810	340	700	9700	170	1500	110
19.02.2003	NK Köln Ablauf2	372	150	330	4500	83	750	51
25.02.2003	Köln Ablauf1	48	32	200	470	54	590	18
25.02.2003	Köln Ablauf2	290	590	410	4500	100	420	445
26.02.2003	Köln Ablauf1	140	190	320	2200	74	380	290
26.02.2003	Köln Ablauf2	150	310	330	2300	76	350	210
27.02.2003	Köln Ablauf1	200	270	420	1900	86	390	140
27.02.2003	Köln Ablauf2	170	180	360	1800	80	410	130
06.03.2003	Köln Ablauf1	210	2300	260	4800	180	330	92
06.03.2003	Köln Ablauf2	190	2300	230	5200	180	270	99
07.03.2003	Köln Ablauf1	200	1600	360	6400	170	330	81
07.03.2003	Köln Ablauf2	210	1600	380	6700	180	340	85
11.03.2003	Köln Ablauf1	100	150	300	2800	160	330	37
11.03.2003	Köln Ablauf2	100	170	320	2900	170	370	37
12.03.2003	Köln Ablauf1	110	120	360	2100	140	330	28
12.03.2003	Köln Ablauf2	110	140	380	2100	140	370	30
13.03.2003	Köln Ablauf1	160	170	360	1600	110	740	22
13.03.2003	Köln Ablauf2	170	160	400	1700	120	910	23
13.03.2003	NK Köln Ablauf1	180	650	410	1500	170	540	46
13.03.2003	NK Köln Ablauf2	190	690	410	1600	180	590	51
14.03.2003	Köln Ablauf1	150	500	420	1700	150	770	32
14.03.2003	Köln Ablauf2	140	480	400	1600	150	810	32
18.03.2003	Köln Ablauf1	130	160	350	2700	120	460	16
18.03.2003	Köln Ablauf2	150	170	420	3300	140	420	21
17.03.2003	NK Köln Ablauf1	350	230	320	2000	120	560	23
17.03.2003	NK Köln Ablauf2	350	250	350	2100	120	640	25
19.03.2003	NK Köln Ablauf1	350	190	410	3400	110	550	19
19.03.2003	NK Köln Ablauf2	360	230	450	3700	120	620	19
21.03.2003	NK Köln Ablauf1	310	170	320	2300	75	380	15
21.03.2003	NK Köln Ablauf2	360	190	400	2700	86	500	20
26.03.2003	Köln Ablauf1	140	180	370	2400	89	530	14
26.03.2003	Köln Ablauf2	120	150	340	2300	85	520	13

Tabelle 15 Übersicht über die Konzentrationen im Zulauf zum Klärwerk Köln-Stammheim und im Ablauf der Zwischenklärung

Datum	Probenart	TiBP [ng/l]	TnBP [ng/l]	TCEP [ng/l]	TCPP [ng/l]	TDCP [ng/l]	TBEP [ng/l]	TPP [ng/l]
17.02.2003	ZK Köln Ablauf1	1000	290	280	710	76	3100	68
17.02.2003	ZK Köln Ablauf2	1000	240	270	690	76	2500	68
18.02.2003	Köln Zulauf1	860	200	140	520	52	2300	48
18.02.2003	Köln Zulauf2	1200	250	190	710	68	2500	62
19.02.2003	ZK Köln Ablauf1	1800	300	380	5900	110	6100	140
19.02.2003	ZK Köln Ablauf2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
25.02.2003	Köln Zulauf1	1000	320	250	840	78	3400	220
25.02.2003	Köln Zulauf2	820	260	210	660	56	2100	150
26.02.2003	Köln Zulauf1	1600	370	350	930	96	4500	160
26.02.2003	Köln Zulauf2	1400	320	300	820	76	3400	130
27.02.2003	Köln Zulauf1	2100	1600	630	2700	120	5900	280
27.02.2003	Köln Zulauf2	2200	1800	640	2900	140	6300	300
06.03.2003	Köln Zulauf1	1400	6200	270	5100	98	3000	180
06.03.2003	Köln Zulauf2	1000	4800	220	3900	74	2600	140
07.03.2003	Köln Zulauf1	1400	860	260	6000	99	4500	220
07.03.2003	Köln Zulauf2	1300	730	240	5500	89	4000	200
11.03.2003	Köln Zulauf1	740	260	170	590	80	2300	57
11.03.2003	Köln Zulauf2	790	290	190	620	87	2400	62
12.03.2003	Köln Zulauf1	1300	390	380	1500	92	3300	110
12.03.2003	Köln Zulauf2	1400	400	400	1600	95	3100	100
13.03.2003	Köln Zulauf1	1100	960	330	1600	200	5000	150
13.03.2003	Köln Zulauf2	760	670	240	1100	150	3400	110
13.03.2003	ZK Köln Ablauf1	1200	4800	230	1700	190	3400	130
13.03.2003	ZK Köln Ablauf2	1100	4400	230	1600	170	3000	120
14.03.2003	Köln Zulauf1	1300	2100	230	1500	120	3900	91
14.03.2003	Köln Zulauf2	1600	2600	280	1900	150	4700	110
18.03.2003	Köln Zulauf1	550	360	65	270	41	1600	34
18.03.2003	Köln Zulauf2	1100	620	170	570	80	3200	59
17.03.2003	ZK Köln Ablauf1	970	270	200	600	85	2300	62
17.03.2003	ZK Köln Ablauf2	950	260	200	590	85	2300	59
19.03.2003	ZK Köln Ablauf1	2300	420	260	3300	80	4100	88
19.03.2003	ZK Köln Ablauf2	1300	240	150	1900	50	3000	56
21.03.2003	ZK Köln Ablauf1	2100	480	170	2000	56	3100	68
21.03.2003	ZK Köln Ablauf2	3100	620	270	3100	86	4300	83
26.03.2003	Köln Zulauf1	1000	870	190	1900	60	3000	85
26.03.2003	Köln Zulauf2	1300	1400	320	3000	81	4200	126

Abbildung 31 EI-Massenspektrum von TCEP

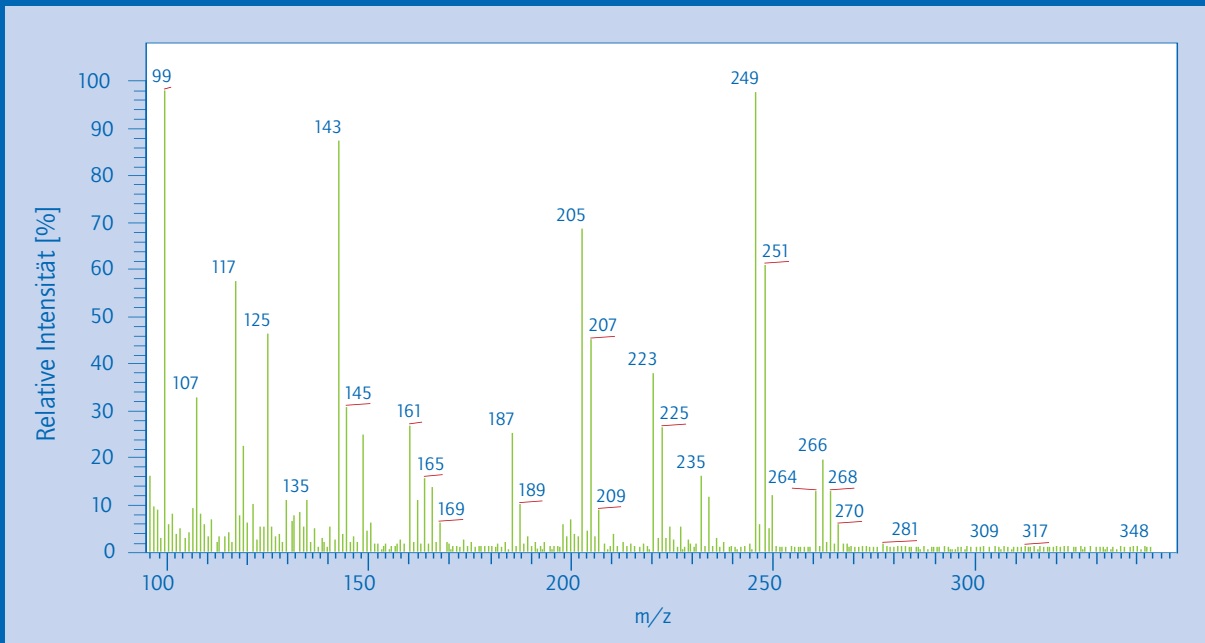


Abbildung 32 EI-Massenspektrum von TCPP

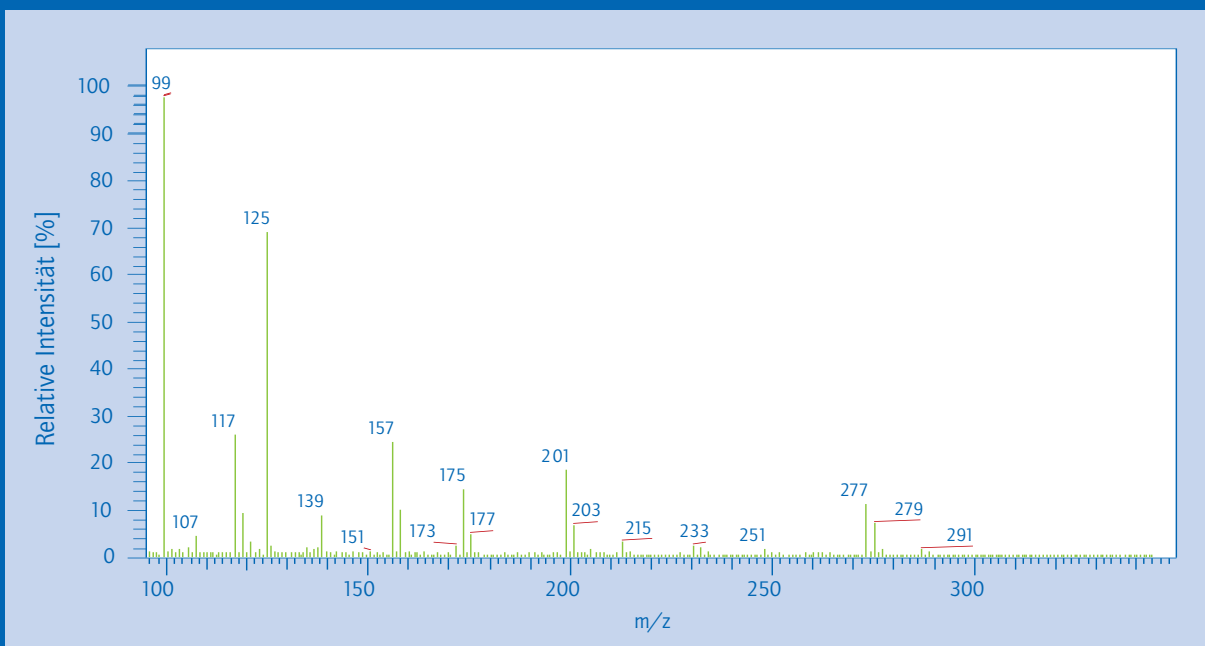


Abbildung 33 EI-Massenspektrum von TDCP

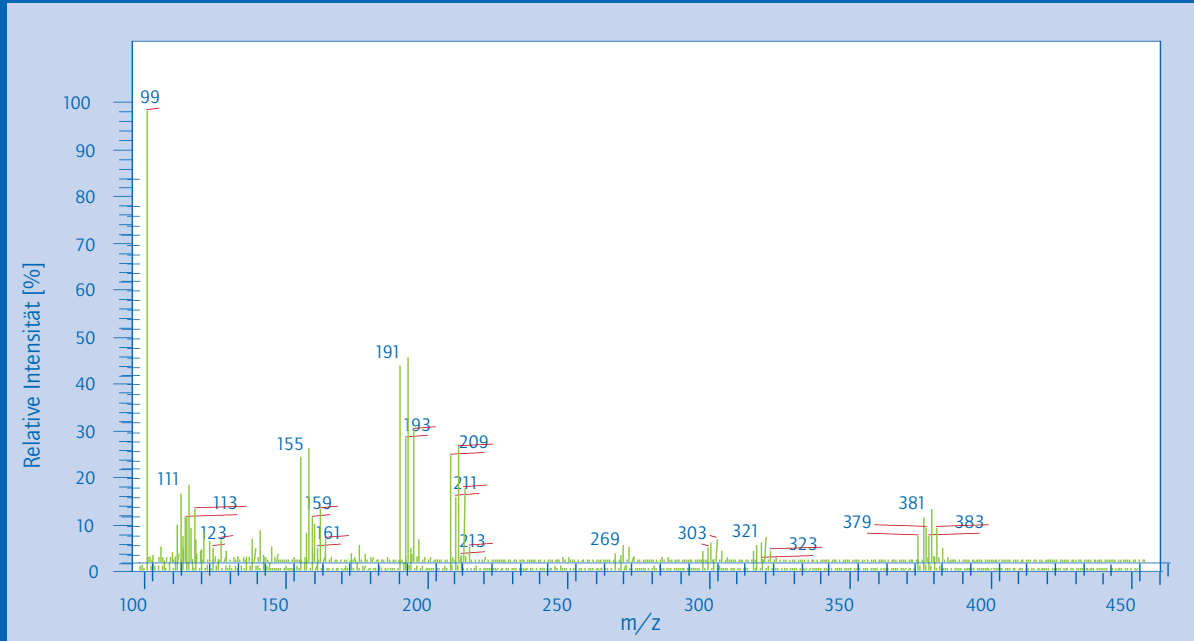


Abbildung 34 EI-Massenspektrum von TiBP

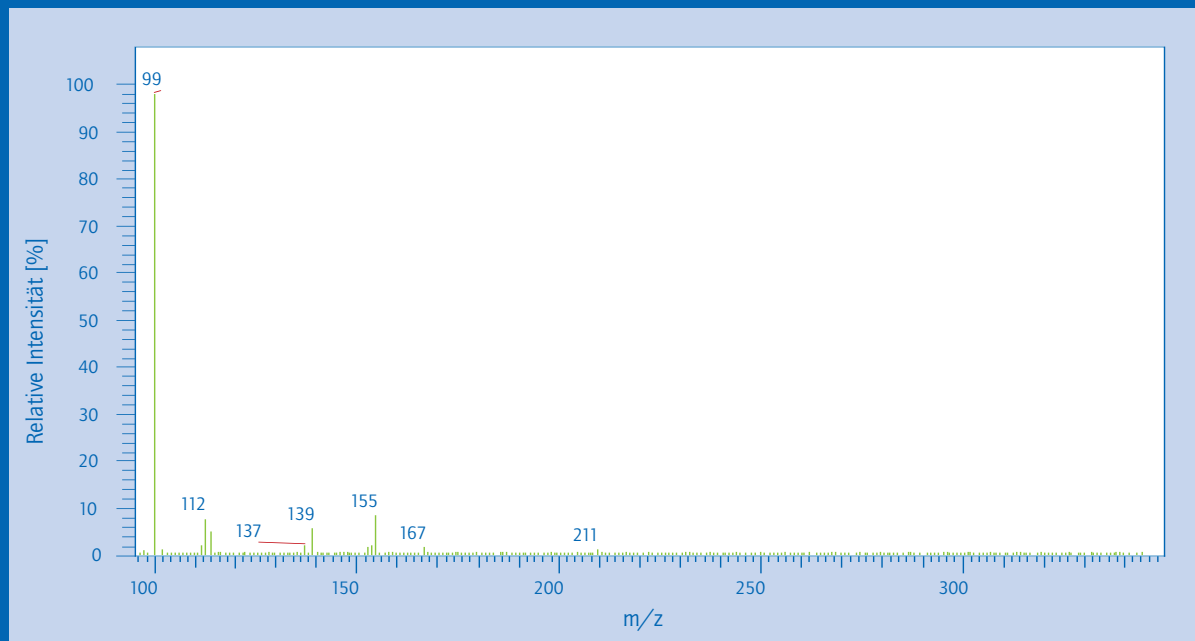


Abbildung 35 EI-Massenspektrum von TnBP

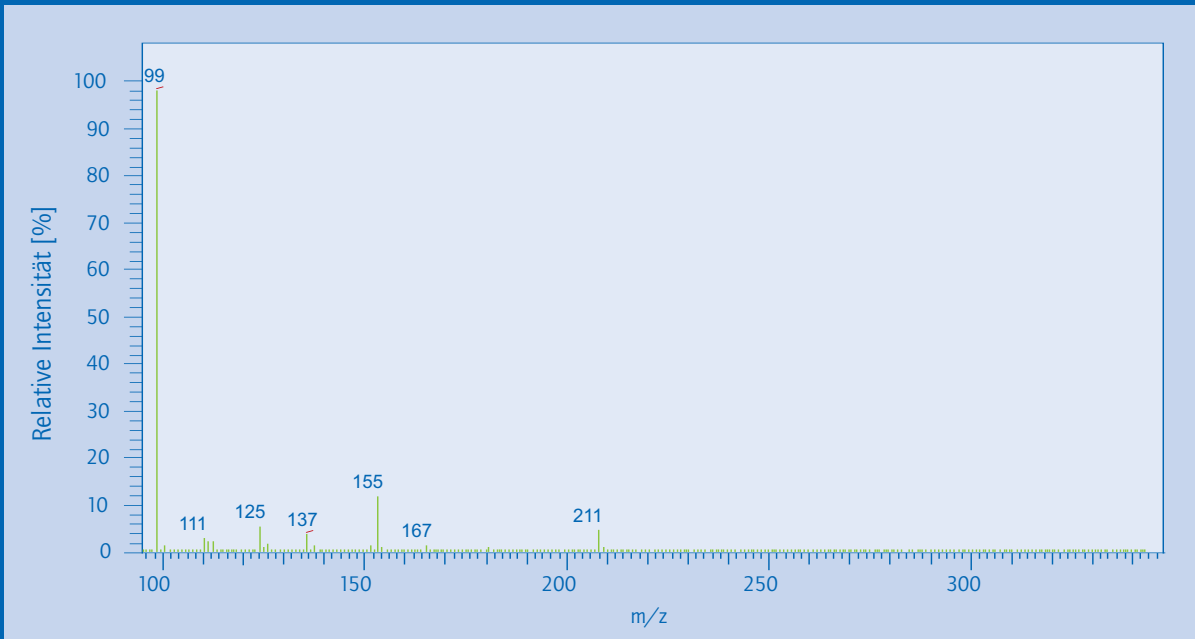


Abbildung 36 EI-Massenspektrum von TPP

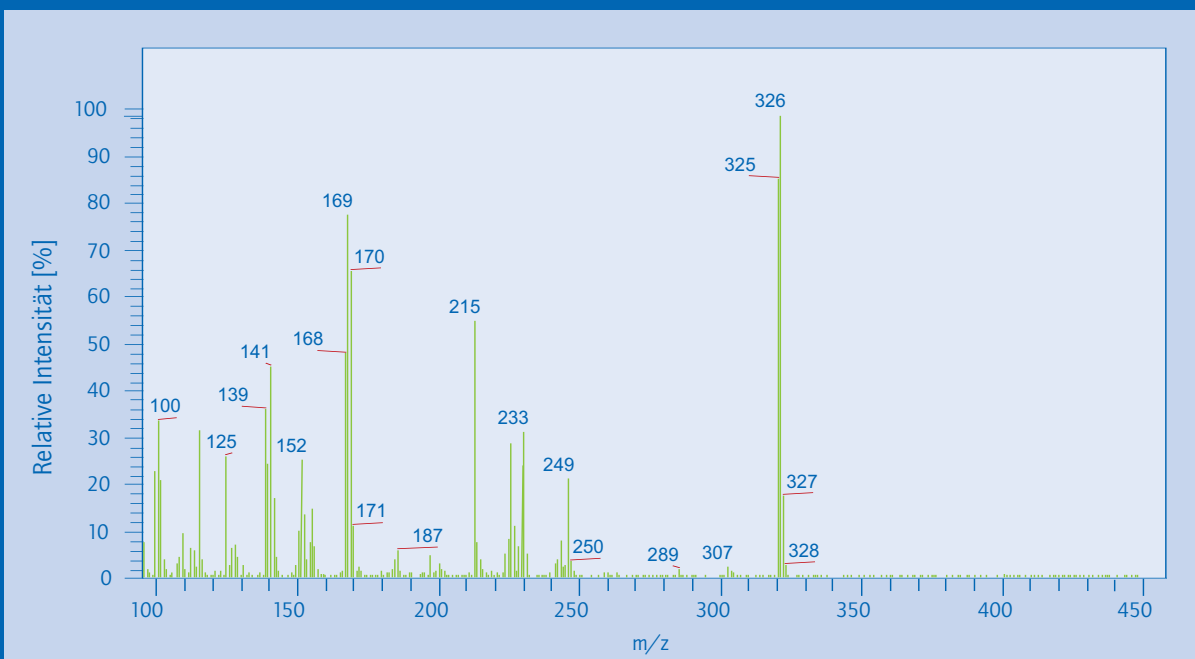
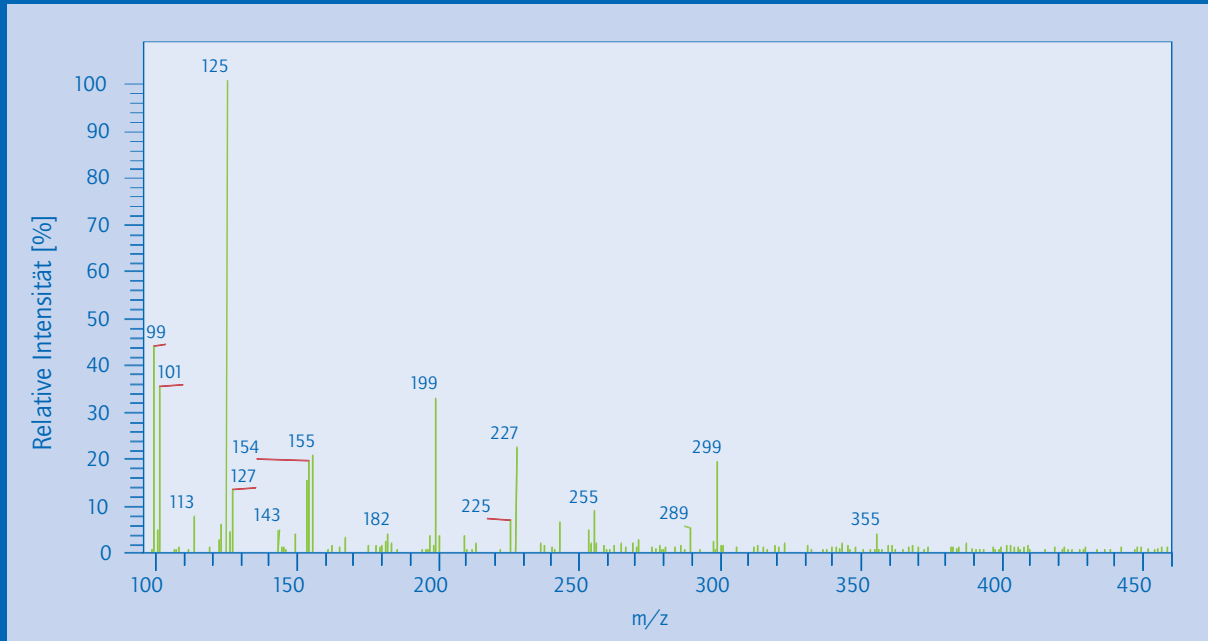
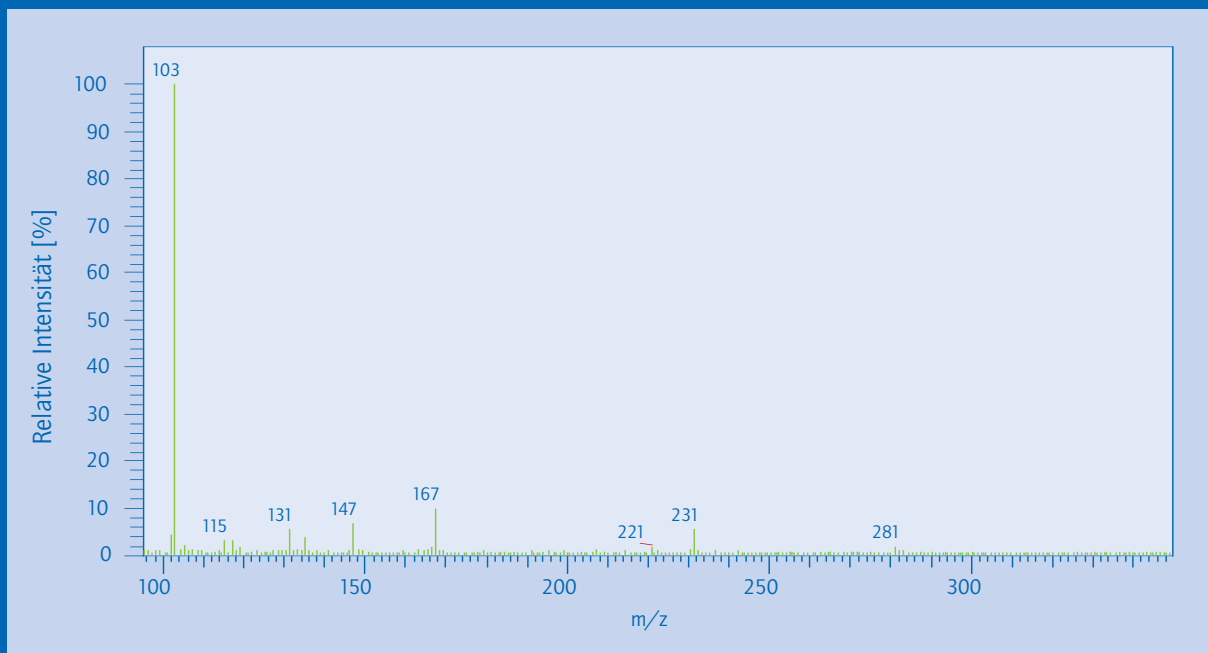


Abbildung 37 EI-Massenspektrum von TBEP

Abbildung 38 EI-Massenspektrum des internen Standards TBP-d₂₇

Geräte und Chemikalien

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%) Dr. Ehrendorfer 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

Durchführung des Zytotoxizitäts-Assays

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 Neutral-

rot-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.

Durchführung des Comet-Assays

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.

Durchführung des Amestests

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 angezchteten Bakterien suspension 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 zytotoxischer Effekt vor und die Bakterien sind vor der ersten Teilung abgestorben.

Durchführung des rekombinierten Hefeassays

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 Probenextraktes AF = 100.

Durchführung des Ishikawa-Tests

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.

► Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Probenahmeorte an der Ruhr und deren Nebenflüssen	21
Tabelle 2	Vergleich der Organophosphatkonzentrationen im Juli/September 2002 im Oberflächenwasser	27
Tabelle 3	Vergleich der Organophosphatkonzentrationen in Ruhr (Quelle bis Mündung), Rhein (bei Köln) und Lippe (Bereich Dortmund)	28
Tabelle 4	Zuordnung der Probenahmestellen des Kanalnetzes.	29
Tabelle 5	TCPP-Konzentrationen an fünf Tagen im Klärwerk Deusen	41
Tabelle 6	Abgeschätzte TCPP-Emissionen mehrerer Kläranlagen	41
Tabelle 7	Referenzmutagene für die verwendeten Stämme (\pm metabolische Aktivierung)	49
Tabelle 8	Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCPP; Zugabe von S9-Mix; SD = absolute Standardabweichung	55
Tabelle 9	Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCPP; ohne S9-Mix	56
Tabelle 10	Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCEP; Zugabe von S9-Mix	68
Tabelle 11	Salmonella typhimurium- (Ames-) Assay zur Detektion mutagener Effekte; Inkubation mit TCEP; ohne S9-Mix	69
Tabelle 12	Wiederfindungen der Analyten (Festphasenextraktion)	68
Tabelle 13	Methodenkenndaten der Gesamtmethode	69
Tabelle 14	Übersicht über die Konzentrationen im Ablauf der Nachklärung (NK) und im Gesamtablauf des Klärwerkes Köln-Stammheim	82
Tabelle 15	Übersicht über die Konzentrationen im Zulauf zum Klärwerk Köln-Stammheim und im Ablauf der Zwischenklärung	83

► Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Flammschutzmittelverbrauch in Westeuropa 1998	11
Abbildung 2	Eintragungspfade von Alkyl- und Arylphosphaten in die Umwelt; nach Grundmann [2000]	18
Abbildung 3	Übersicht der einzelnen Probenahmestellen entlang der Ruhr	22
Abbildung 4	Darstellung der Konzentrationen der halogenierten FSM im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002	25
Abbildung 5	Darstellung der Konzentrationen von TiBP und TBEP im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002	27
Abbildung 6	Darstellung der Konzentrationen von TPP und TnBP im Wasser der Ruhr, ihrer Nebenflüsse und eingebrachter Kläranlagenabläufe; September 2002	28
Abbildung 7	TCPP-Konzentration im Dortmunder Kanalnetz	32
Abbildung 8	Minimale und maximale Konzentrationen von TCEP, TCPP, TDCP und TBEP im Dortmunder Kanalnetz entlang der Emscher; ohne Regenwasserüberlauf; logarithmische Auftragung	33
Abbildung 9	TCEP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	35
Abbildung 10	TCPP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	36
Abbildung 11	TDCP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	37
Abbildung 12	TBEP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	38
Abbildung 13	TiBP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	39
Abbildung 14	TnBP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	40
Abbildung 15	TPP-Konzentrationen im Zulauf und Gesamtablauf des Klärwerks Köln-Stammheim; Februar/März 2003	41

Abbildung 16	Mittlere Konzentrationen der Organophosphate im Klärwerk Köln-Stammheim	42
Abbildung 17	TCCP Belastung von 20 Klärschlämmen aus Klärwerken NRWs	45
Abbildung 18	Zytotoxizität von TCCP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem	48
Abbildung 19	Zytotoxizität von TCEP in V79-Zellen mit (oben) und ohne (unten) S9-Mix-Zusatz als externes enzymatisches Metabolisierungssystem	49
Abbildung 20	Ablaufschema des Comet-Assay	50
Abbildung 21	Angefärbte DANN im Comet-Assay	51
Abbildung 22	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCCP in V79-Zellen Median der Tail-Länge, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)	52
Abbildung 23	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TCEP in V79-Zellen Median der Tail-Länge, 1. Quartil (Balken nach unten) und 2. Quartil (Balken nach oben)	53
Abbildung 24	Durchführung des Ames-Testes [nach Andrae, 1996]	55
Abbildung 25	Östrogene Wirkung von TCCP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1	62
Abbildung 26	Östrogene Wirkung von TCCP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2	63
Abbildung 27	Östrogen Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 1	64
Abbildung 28	Östrogene Wirkung von TCEP in Glaxo ERa-Hefe - Versuch 2	65
Abbildung 25	Alkalische Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen	66
Abbildung 30	Selected ion monitoring (SIM) Chromatogramme von TCCP einer Standardlösung und einer Abwasserprobe	70
Abbildung 31	EI-Massenspektrum von TCEP	84
Abbildung 32	EI-Massenspektrum von TCCP	84
Abbildung 33	EI-Massenspektrum von TDCP	85

Abbildung 34	El-Massenspektrum von TiBP	85
Abbildung 35	El-Massenspektrum von TnBP	86
Abbildung 36	El-Massenspektrum von TPP	86
Abbildung 37	El-Massenspektrum von TBEP	87