

**Non-Target-Screening
organischer Substanzen in Sedimenten**

Mikrobieller Abbau aromatischer Verbindungen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Michael Specht

aus Hamburg

Hamburg 2006

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart

Tag der Disputation 2.6.2006

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 1997 bis Dezember 2003 unter der Leitung von Herren Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, anregende Diskussionen, und die freundschaftliche Betreuung.

Für meine Eltern

Danksagung

Meinen Eltern möchte ich für ihre unendliche Geduld von ganzem Herzen danken. Für ihre tatkräftige Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit bin ich ihnen sehr dankbar.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die vielen schönen Stunden während Arbeit und Freizeit. Besonderen Dank gilt meinen Laborkollegen Omid Taghizadeh und Karsten Fehler, den Kollegen des Oderprojektes Christiane Meyer und Nicolas Heinzl und Till Tolasch und Susanne Sölter für Tipps, Humor und lange (Doppelkopf-) Nächte.

Dr. Stephan Franke gilt mein herzlicher Dank für seine intensiven Unterweisungen auf dem Gebiet der Massenspektrometrie, angeregten Diskussionen und Hilfe bei Messungen und Auswertung von Daten.

Allen Kolleginnen und Kollegen im IOP-Projekt und im mikrobiologischen Institut der Universität Greifswald danke ich für die sehr gute interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Volker Sinnwell und dem NMR-Service-Team möchte ich mich herzlich für die professionelle Durchführung der NMR-Messungen und die Diskussionen der Ergebnisse bedanken.

Allen Praktikantinnen und Praktikanten möchte ich für ihren tatkräftigen Einsatz bei der Durchführung von Messungen und Synthesen danken.

Für das Korrekturlesen gilt der Dank erneut Dr. Stephan Franke.

Für Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich meinen Freunden, den Hamburg Dodgers und, für die wertvolle Hilfe in der letzten Phase, Janine Jürgensen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Themenstellung	7
3	Non-Target-Screening von Sedimenten des Odersystems	9
3.1	Hydrologie und Morphologie des Fluss-Systems Oder	9
3.1.1	Morphologie	9
3.1.2	Hydrologie	10
3.2	Das Hochwasserereignis im Juli/August 1997	14
3.3	Belastungssituation	18
3.4	Analytische Methodik	21
3.4.1	Probenahme und Lagerung	25
3.4.2	Probenaufarbeitung	25
3.4.3	Fraktionierung	27
3.4.4	Derivatisierung	29
3.4.5	Gaschromatographie	29
3.4.6	Massenspektrometrie	30
3.5	Probendaten	32
3.6	Übersicht ausgewählter identifizierter Sedimentinhaltsstoffe	35
3.6.1	Substanzen biogenen Ursprungs	35
3.6.1.1	Aliphatische Carbonsäuren	35
3.6.1.2	n-Alkane	37

3.6.1.3	Terpenoide Verbindungen	39
3.6.2	Substanzen anthropogenen Ursprungs	41
3.6.2.1	Fäkalsteroide	43
3.6.2.2	Oberflächenaktive Substanzen	44
	<i>Alkylphenol(poly)ethoxylate und Alkylphenole</i>	45
	<i>Alkylbenzolsulfonate und Alkylbenzole</i>	57
3.6.2.3	Synthetische Duftstoffe	61
3.6.2.4	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe	65
	<i>Oxidierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (Oxy-PAK)</i>	70
3.6.2.5	Chlorierte Kohlenwasserstoffe	72
3.6.2.6	Pestizide	74
3.6.3	Austrag von Sedimenten durch das Flutereignis 1997	78
3.6.4	Vergleichsuntersuchungen 1997 / 1998 / 1999	83
	<i>Benzothiazole</i>	85
	<i>Beispielchromatogramme</i>	88
4	Identifizierung einer unbek. Grundwasserkontaminante	93
4.1	GC/MS-Analytik	93
4.2	Herkunft und Bedeutung der identifizierten Kontaminante	96
4.3	Synthese von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)- N,N-dimethyl-2-oxoacetamid (130)	96
5	Mikrobieller Abbau aromatischer Verbindungen	99
5.1	Biphenyl-Abbau durch <i>Debaryomyces vanrijiae</i>	101

5.2	Biphenyl-Abbau durch <i>Paecilomyces lilacinus</i>	110
5.3	Biphenyl-Abbau durch <i>Trichosporon mucoides</i>	120
5.4	Dibenzofuran-Abbau durch <i>Trichosporon mucoides</i>	131
5.5	Dibenzofuran-Abbau durch <i>Ralstonia sp.</i>	139
5.6	Enzymatische Synthese von Imidazol-Derivaten mit Hilfe von <i>Trametes versicolor</i>	148
6	Zusammenfassung	159
6.1	Summary	162
7	Literatur	164
A	Anhang A: Tabellen Sedimentinhaltsstoffe	177
	Tabelle 3.9: Probenkampagne 1997	178
	Tabelle 3.10: weitere Probenkampagnen	190
	Tabelle 3.11: Vergleich 1997-1999	196
	Tabelle 3.12: ausgetragene Sedimente 1997	208
B	Anhang B: Sicherheitshinweise	214

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1	Chlorierte Diarylether und verwandte Verbindungen in der Umwelt	5
Abb. 1.2	Initiale Metabolisierungsschritte des Abbaus aromatischer Verbindungen	6
Abb. 3.1	Untersuchungsgebiet und Probenahmepunkte der Oder und ihrer Nebenflüsse	11
Abb. 3.2	Abfluss, Schwebstofffracht und -konzentration, Monatsmittel 1992-1996	13
Abb. 3.3	links: Regensmengen vom 3. Juli 20.00 Uhr bis 8. Juli 20.00 Uhr 1997, akkumuliert; rechts: vom 17. Juli 20.00 Uhr bis 21. Juli 20.00 Uhr 1997, akkumuliert [22]	15
Abb. 3.4	Verhältnis der Regensmengen im Juli 1997 zu der durchschnittlichen Regenmenge im Juli, in % [22]	15
Abb. 3.5	Schwebstofftransport während des Oderhochwassers 1997, km 667	17
Abb. 3.6	Industrie und potentielle Schadstoffquellen im Odereinzugsgebiet	19
Abb. 3.7	Analyseschema der Untersuchungen von Odersedimenten - Arbeitsschritte	24
Abb. 3.8	„Mini-Kieselgel-Chromatographie“, Verteilung verschieden polarer Inhaltsstoffe auf die säulenchromatographischen Fraktionen	28
Abb. 3.9	Kettenlängenverteilung der n-Alkylcarbonsäuren (C ₁₂ -C ₃₀) in den Sedimenten F2 (Raciborz), F9 (Urad) und H2 (Stettiner Haff, Tor IV)	36
Abb. 3.10	Kettenlängenverteilung der n-Alkane (C ₁₄ -C ₃₅) in den Sedimenten F2 (Raciborz), F9 (Urad) und H2 (Stettiner Haff, Tor IV)	38
Abb. 3.11	Diagenese von Abietinsäure 7	39
Abb. 3.12	Diagenese von Phytol 17 unter oxidierenden (oben) und reduzierenden (unten) Bedingungen	40
Abb. 3.13	Verhältnis Pristan:Phytan in Sedimenten der Oder 1997	41
Abb. 3.14	Pfade anthropogener Einträge in Fließgewässer	42
Abb. 3.15	Fäkalsteroid	43
Abb. 3.16	Siedlungszentren im Wassereinzugsgebiet der Oder (in Tsd. Einwohnern)	44
Abb. 3.17	Alkylphenolpolyethoxylate	46
Abb. 3.18	Bakterieller Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten	47
Abb. 3.19	Endokrine Eigenschaften und strukturelle Ähnlichkeiten: NP und Östradiol	49
Abb. 3.20	Initiale Fragmentierungsmöglichkeiten isomerer acetylierter Nonylphenole	50

Abb. 3.21	Massenspektren (acetylierter) Nonylphenol-Isomerer aus Sediment H3	50
Abb. 3.22	GC/MS-Analyse, Spuren prominenter Fragment-Ionen von Nonylphenolen am Probenahmepunkt H3	52
Abb. 3.23	Fragmentierungsmöglichkeiten isomerer Nonylphenolmonoethoxylate	53
Abb. 3.24	Massenspektren von Nonylphenolmonoethoxylaten am Probenahmepunkt F2	53
Abb. 3.25	GC/MS-Analyse, Spuren prominenter Fragment-Ionen von Nonylphenolmonoethoxylaten am Probenahmepunkt F2	56
Abb. 3.26	Lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS)	58
Abb. 3.27	Mikrobieller Abbau von 2-C12-LAS	59
Abb. 3.28	Typische Isomerenverteilung der C ₁₀ - bis C ₁₃ - LAB (Probenahmepunkt F8)	60
Abb. 3.29	Isomerenverteilung der C ₁₀ - bis C ₁₃ - LAB in Sedimenten nach Raciborz (Probenahmepunkt F2)	61
Abb. 3.30	Vertreter synthetischer Moschusduftstoffe	62
Abb. 3.31	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten	67
Abb. 3.32	N-, O- und S-haltige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten	68
Abb. 3.33	Verhältnis Σ Fluoranthen+Pyren / Σ C2-+C4-Phenanthrene (1997)	69
Abb. 3.34	Verhältnis Σ Methyl-Naphthaline / Naphthalin (1997)	70
Abb. 3.35	Oxidierete polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten	71
Abb. 3.36	Chlorierte Verbindungen in Odersedimenten	73
Abb. 3.37	Pestizide in Odersedimenten	75
Abb. 3.38	Nonylphenolmono- 117 und Nonylphenoldiethoxylatcarbonsäure 118	80
Abb. 3.39	Strukturen von Endosulfan 119 , Endosulfansulfat 120 und 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en 121	81
Abb. 3.40	Massenspektren von Endosulfansulfat 120 und 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en 121	82
Abb. 3.41	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): in der methylierten 6. Fraktion identifizierte Benzothiazole	85
Abb. 3.42	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): Totalionenstromchromatogramm der methylierten 6. Fraktion	87
Abb. 3.43	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 1. Fraktion	88
Abb. 3.44	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 2. Fraktion	89
Abb. 3.45	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 3. Fraktion	90

Abb. 3.46	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 4. Fraktion	91
Abb. 3.47	Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 5. Fraktion	92
Abb. 4.1	Massenspektrum (70 eV) der unbekannten Verbindung aus Elbmarschproben.	94
Abb. 4.2	Mögliches MS-Fragmentierungsverhalten von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid 130	95
Abb. 4.3	Phenazon 131	96
Abb. 4.4	Synthese 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid 130 aus 4-Dimethylaminoantipyrin 132	97
Abb. 4.5	Korrelationsdaten aus NMR-Untersuchungen (HMBC/HMQC) von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid	98
Abb. 5.1	Metabolisierung von Bis-Aryl-Verbindungen am Beispiel von Dibenzofuran	100
Abb. 5.2	Massenspektrum Metabolit II: 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure-methylester 133	102
Abb. 5.3	¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ CN) von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure 133	102
Abb. 5.4	Synthese von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure 133	103
Abb. 5.5	Korrelationsdaten der NMR-Untersuchungen von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure 133	104
Abb. 5.6	Synthesen von 2,3,4-Trihydroxybiphenyl 134 , 3,4,5-Trihydroxybiphenyl 135 und 3,4,4'-Trihydroxybiphenyl 136	111
Abb. 5.7	Wichtige Ringspaltungsprodukte des Biphenyl-Abbaus mit <i>Paecilomyces lilacinus</i>	112
Abb. 5.8	Massenspektren der Methylderivate von 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyron-6-carbonsäure 137 und 3-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyron-6-carbonsäure 143	121
Abb. 5.9	Korrelationsdaten der NMR-Untersuchungen von 3-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure 142	122
Abb. 5.10	Massenspektrum von [2-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-3(2H)-yliden]glycolsäure bzw. [3-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-2(3H)-yliden]glycolsäure 144 , dreifach methyliert	132
Abb. 5.11	¹ H-NMR (500 MHz, Methanol) von [2-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-3(2H)-yliden]glycolsäure bzw. [3-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-2(3H)-yliden]glycolsäure 144	133
Abb. 5.12	Metabolit des Abbaus Dibenzofurans mit <i>Trichosporon mucoides</i>	133

Abb. 5.13	Massenspektren des methylierten (oben) und silylierten (unten) Metaboliten aus Dibenzofuran Abbau mit <i>Ralstonia sp.</i>	140
Abb. 5.14	NMR-Signalzuordnung und Kopplungen von 2-Hydroxy-4-(3'-oxy-3'H-benzofuran-2'-yliden)-2-butensäure 145 , zweifach silyliert	141
Abb. 5.15	Synthese von 1,2-Dihydroxydibenzofuran 150	142
Abb. 5.16	Mechanismus der Bildung von 148 aus 147 unter Ringschluss	143
Abb. 5.17	N-[4-Phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamid 151 (Substrat) und zwei identifizierte Metaboliten: N-[5-Formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]acetamid 152 und 4-Phenyl-2-(propylamino)imidazol 153	149
Abb. 5.18	2-{ {2-{[2-Acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino]carbonyl-amino}-2-phenylvinyl} }-4-propylsemicarbazid 154 und Zuordnung der NMR-Signale	150
Abb. 5.19	Massenspektren von N-(3-Hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid 155 und N-(5-Oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid 156	151
Abb. 6.1	Strukturen identifizierter Verbindungen	161
Tab. 3.1	Landhöhen und Oderkilometrierung [13, 15]	10
Tab. 3.2	Konzentrationen ausgewählter Verbindungen in Sedimenten der Oder 1997	21
Tab. 3.3	Relative Extraktionsausbeuten für Verbindungen verschiedener Fraktionen. Ultra-Turrax: sequentielle Extraktion mit Aceton+Hexan; Soxhlet: 1: Aceton+Hexan, 2: Hexan; SFE: Supercritical-Fluid-Extraction: CO ₂ +5% MeOH; WDD: Wasserdampfdestillation	26
Tab. 3.4	Probenahmeorte der Oder (F) und ihrer Nebenflüsse (N) 1997	33
Tab. 3.5	Probenahmeorte der Oder (F) und ihrer Nebenflüsse (N) 1998 und 1999	34
Tab. 3.6	Duftstoffe in Sedimenten im Verlauf der Oder (1997)	64
Tab. 3.7	PAK Emissionen in EU-Staaten (aus Boström 2002 [103])	65
Tab. 3.8	Probenahmeorte für Vergleichsuntersuchungen an ausgetragenen Sedimenten (1997)	78
Tab. 3.9	Probenkampagne 1997	178
Tab. 3.10	Weitere Probenkampagnen	190
Tab. 3.11	Vergleich 1997-1999	196
Tab. 3.12	Ausgetragene Sedimente 1997	208

1 Einleitung

Bewusstsein und Sensibilität der Öffentlichkeit gegenüber Zustand und Entwicklung der lokalen und globalen Umwelt haben in den letzten Jahren stark zugenommen, vor allem gefördert durch den zunehmenden Nachweis und die breite Information über ernsthafte Beeinflussungen des eigenen Lebensraumes. Die stetig zunehmende Produktion synthetischer Substanzen, der gesteigerte Verbrauch von Stoffen auch natürlichen Ursprungs, sowie die über Jahrzehnte der Industrialisierung und Technisierung angesammelten Altlasten, bringen eine Vielzahl von Verbindungen in die verschiedenen Umweltkompartimente ein [1]. Viele dieser Substanzen beeinträchtigen sowohl Gesundheit und Wohlergehen von Millionen von Menschen wie auch die Ökosysteme weltweit. Zusätzlich bedingt die Globalisierung der Wirtschaftssysteme eine stark erhöhte Mobilisierung natürlicher und synthetischer Stoffe und erhöht die Gefahr des Einbringens potentiell schädlicher Substanzen in die Umwelt. Neben der direkten Freisetzung aus Produktionsanlagen gelangt der größte Anteil an solchen Fremdstoffen durch Anwendung, Verarbeitung und Entsorgung in die Umwelt. Zu den Handelsprodukten der Industrie und den bei der Herstellung anfallenden bekannten Abfällen kommen zahlreiche bislang nicht erfasste Neben- und Abbauprodukte hinzu. Pfade des Eintrages, Mengen, räumliche Verteilung und Persistenz vieler Fremdstoffe in Umweltkompartimenten sind häufig noch unbekannt.

Für die örtliche Verbreitung spielen besonders aquatische Systeme eine bedeutende Rolle, da sie unmittelbar in Produktions- und Entsorgungsprozesse eingebunden sind. Limnische Systeme sind starken Belastungen durch Industrie- und Haushaltsabwässer, Verkehrswege sowie landwirtschaftliche Nutzung der Flächen im Einzugsgebiet ausgesetzt. Durch ihre Verbindung mit marinen Ökosystemen hat ihr Zustand direkte Einwirkung auf das globale Umweltsystem durch ihre Fracht an biogenen, geogenen und anthropogenen Materialien. Für die Verteilung und die Umwandlung organischer Substanzen in Gewässern ist das vorhandene partikuläre Material ein bestimmender Faktor. Schwebstoffe und Sediment stehen hierbei sowohl untereinander als auch jeweils mit dem Wasserkörper in einem dynamischen Gleichgewicht. Die hohe Adsorptionsfähigkeit des Sediments, vor allem für lipophile organische Substanzen, bedingt eine starke Akkumulation einer Vielzahl (potentieller) Schadstoffe und führt, in Abhängigkeit von Transport- und Austauschprozessen, zur Ausbildung des Sediments als Senke für organische

Substanzen und damit zu einem beständigen Reservoir vormals eingetragener Schadstoffe.

Zur Überwachung und Beurteilung der organischen Belastung limnischer Systeme werden meist Summenparameter wie chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), totaler organischer Kohlenstoffgehalt (TOC) und die Menge adsorbierbarer organischer Halogenverbindungen (AOX) verwandt. Diese Angaben sind jedoch für eine genaue Aussage über die Art der Verschmutzung unspezifisch. Auch werden in diesen Parametern viele natürliche Vorgänge miteingefasst, so dass sie keine Differenzierung zwischen natürlicher und anthropogener Beeinflussung zulassen. Nur spezielle bekannte Kontaminanten mit bewiesenem Schädigungspotential, die erhöhte öffentliche Aufmerksamkeit hervorrufen (z.B. Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Polychlorierte Biphenyle (PCB), chlorierte Dioxine und Furane sowie Pestizide), werden routinemäßig in Umweltanalysen einbezogen. Zur Abschätzung der Belastungssituation eines Gewässers gehören, neben dem Nachweis bekannter umweltrelevanter Substanzen (Schadstoffe und Leitsubstanzen), auch das Auffinden und die Identifizierung neuer oder im Kontext dieses Umweltkompartiments bislang nicht bekannter Substanzen im Wasser bzw. Sediment. Ein solches „Non-Target-Screening“, eine möglichst umfassende Identifizierung aller im ausgewählten Umweltkompartiment vorkommenden Verbindungen, ist zur Beschreibung eines „Ist-Zustandes“ unabdingbar.

Durch ein umfassendes Einzelstoff-Screening können Fremdstoffe potentiellen Quellen zugeordnet, punktförmige Belastungen erkannt, diffuse Einträge charakterisiert und Kontaminationsverläufe beschrieben werden. Solche Untersuchungen können Anhaltspunkt und Leitfaden für Überwachung (Monitoring), wasserbauliche Maßnahmen, Sanierungskonzepte für belastete Gebiete und Maßnahmen zur Verminderung bzw. Verhinderung von Einleitungen sein.

Neben der allgemein gesteigerten Sensibilität der Gesellschaft gegenüber der Umwelt und der damit verbundenen Ausweitung der chemischen Analytik, führte vor allem die dramatische Steigerung der Empfindlichkeit moderner analytischer Geräte zum Nachweis immer neuer Fremdstoffe und damit zur Kenntnis neuer potentieller Schadstoffe und Schadstoffquellen. Zusätzlich zu dem Gedanken einer frühzeitigen Vermeidung von Bildung und Eintrag eines Schadstoffes, wird heute besonderer Wert auf die Beseitigung vorhandener Schadstoffquellen und insbesondere von Altlasten gelegt.

Dieses Bestreben schlägt sich auch in zunehmenden staatlichen Regulierungen zum Schutz von Natur und Ressourcen nieder, die unter anderem die Produktion und den Handel bestimmter Chemikalien, z.B. chlorierte Biphenyle, Dibenzofurane und Dioxine, verbieten und den Eintrag belasteter Abfälle in die Natur minimieren sollen [2-4].

Bei der Entsorgung von Schadstoffen durch Verbrennung, Deponierung oder chemische Umwandlung entstehen oft zusätzliche Probleme. Eine, nicht immer mögliche, vollständige Verbrennung erfordert bei den meisten Schadstoffen hohe Temperaturen und damit zusätzlichen Einsatz von Brennstoffen. Eine unvollständige Verbrennung dagegen kann nicht nur zur weiteren Mobilisierung des Schadstoffes durch Abgase führen, sondern eventuell entstehende Umsetzungsprodukte können ein ähnliches oder sogar höheres Gefährdungspotential als die Ausgangssubstanzen besitzen. Aus Deponien können abgelagerte Abfälle und erst später im Deponiekörper gebildete Stoffe ausgelaugt werden und durch Sickerwasser oder Deponiegas in die Atmosphäre gelangen. Der Weg einer Detoxifizierung über eine chemische Umwandlung bedingt den Einsatz weiterer Chemikalien (wie Lösungsmittel oder Oxidationsmittel), benötigt oft erhöhte Temperaturen und kann ebenfalls weitere unerwartete Schadstoffe als Abfall- und Nebenprodukte erzeugen.

Als Alternative zu den herkömmlichen Vorgehensweisen erfahren seit einiger Zeit die sogenannten 'biologischen' Verfahren des Schadstoffabbaus besondere Beachtung. Hierbei sollen idealerweise natürliche Zersetzungsprozesse, wie sie für biogene Verbindungen existieren, auf Xenobiotika angewendet werden. In der Natur werden organische Substanzen in Boden und Gewässer entweder durch chemisch-physikalische Prozesse (photochemisch oder durch chemische Oxidation) abgebaut oder unterliegen biologischen Transformationen. Die Übertragung solcher Metabolisierungswege auf biotechnologische Prozesse würde zu besonders schonenden Verfahren der Schadstoffbeseitigung führen, da solche Verfahren überwiegend ohne den Einsatz spezieller Lösungsmittel und bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden können. Der Einsatz biologischer Verfahren zur Rückführung industrieller Schadstoffe in den natürlichen Stoffkreislauf ist somit äußerst attraktiv, da er kostengünstig und mit minimalen Eingriffen in die zu behandelnden Ökosysteme erfolgen könnte.

Für die Dekontamination von Altlasten und belasteten Abfällen werden daher zunehmend mikrobiologische Verfahren favorisiert, da Mikroorganismen in der Lage sind, eine Vielzahl chemischer Strukturen abzubauen oder co-metabolisch umzuwandeln [5-7]. Genutzt werden solche Stoffwechseleigenschaften großtechnisch in den biologischen Stufen von Kläranlagen, jedoch sind Auswahl und Einsatz der beteiligten Mikroorganismen, hier meist Bakterien, unspezifisch und für ein breites Spektrum an Substanzen ausgelegt.

Mikroorganismen haben durch ihre hohe Wachstums- und Mutationsrate eine enorme Kapazität, sich an neue Verhältnisse oder Substrate anzupassen. So können aus einer Vielzahl verschiedener natürlich vorkommender Organismen, die Substanzen mit spezifischen Strukturmerkmalen verstoffwechseln können, einzelne Vertreter ausgewählt werden, die durch Züchtung oder gentechnische Veränderungen für den Abbau spezieller Schadstoffe geeignet erscheinen. Die Probleme bei der Suche nach geeigneten Organismen und der Erarbeitung sinnvoller Methodiken zu ihrer Anwendung sind jedoch vielschichtig, da sich kontaminierte Umweltsysteme in Bezug auf Schadstoffzusammensetzung, Schadstoffkonzentration, chemische und physikalische Bedingungen, sowie Mikroorganismuspopulationen stark voneinander unterscheiden [8].

Unter der Vielzahl anthropogener Kontaminanten bergen die bereits erwähnten halogenierten aromatischen Verbindungen durch ihr hohes toxisches Potential und die stark ausgeprägte Persistenz besonders große Gefahren für die Umwelt. Polychlorierte Biphenyle (PCB, **1**), polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD, **2** inkl. „Seveso-Dioxin“, **6**), polychlorierte Dibenzofurane (PCDF, **3**) und polychlorierte Diphenylether (PCDE, **4**) sind über Jahrzehnte in ihrem Potential nicht als Schadstoffe eingeschätzt und somit auch nicht mit ausreichender Aufmerksamkeit angewandt worden. Resultat ist ihre ubiquitäre Verteilung in der Umwelt. Weltweit sind z.B. zwischen der ersten industriellen Herstellung 1929 und der Einstellung der Produktion in Deutschland im Jahr 1983 ca. 1,2 Mio. Tonnen PCB produziert worden und als Transformatorenöle, Hydraulikflüssigkeiten, Schmieröle und flammenhemmende Zusätze eingesetzt worden [1]. Man geht davon aus, dass ca. 30% der gesamten Produktionsmenge in die Umwelt gelangt sind [9]. Besonders seit dem Seveso-Unfall von 1976, bei dem aus einer Produktionsanlage zur Herstellung des Pflanzenschutzmittels 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T, **5**) zwischen 60 und 135 kg 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD, **6**) in die Umgebung freigesetzt wurden [10-11], sind intensive Anstrengungen gemacht worden, Technologien zur Vernichtung hochchlorierter Schadstoffe zu entwickeln.

Die Erforschung der biologischen Mechanismen von Umwandlung, Detoxifikation und biologischem Abbau von Substanzen mit Di-Aryl- oder Di-Arylether-Struktur wurden so immer weiter intensiviert [12]. Die Untersuchung der biologisch-chemischen Grundlagen dieser Metabolisierungsvorgänge ist für die Entwicklung von Techniken zum Abbau chlorierter Schadstoffe mittels mikrobieller „Biokatalysatoren“ in Laborsystemen oder am Ort der Kontamination unabdingbar.

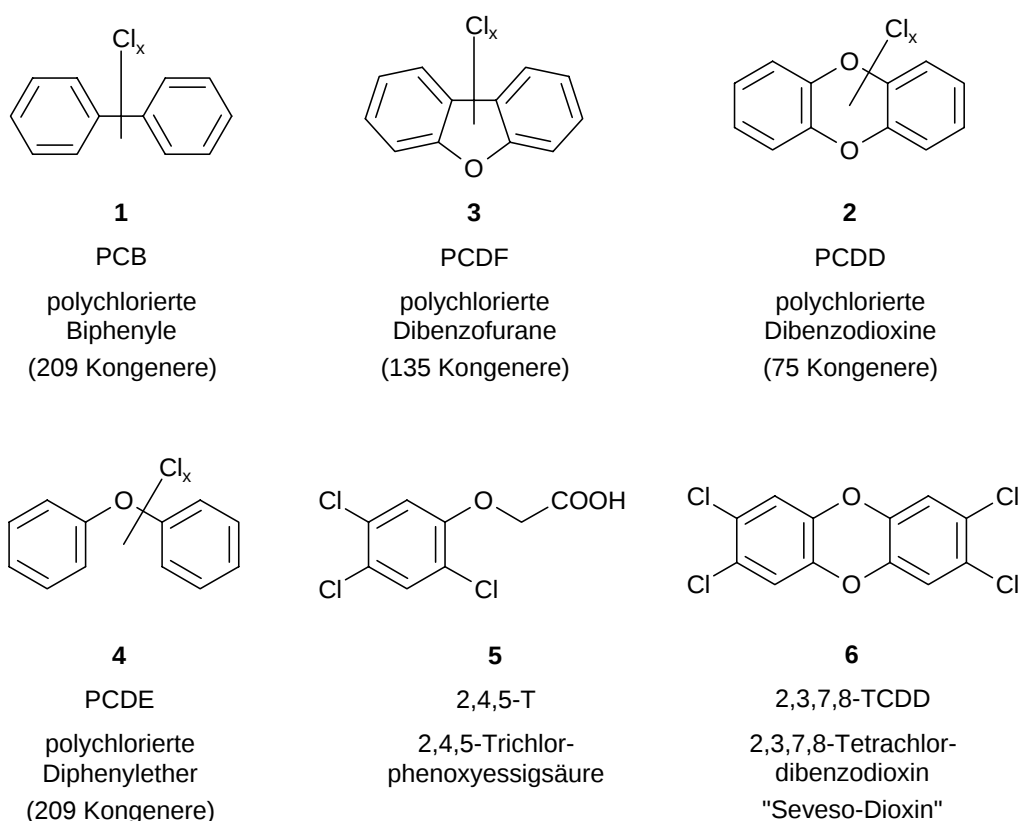
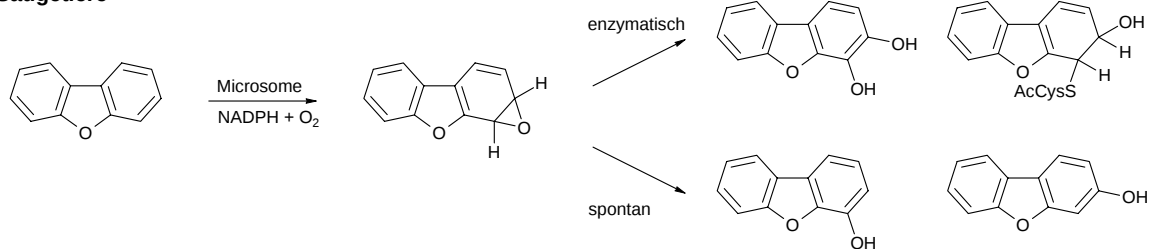


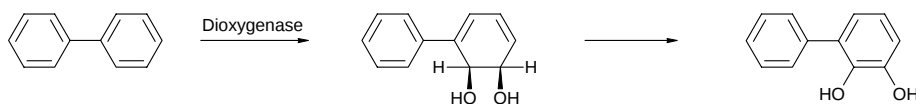
Abb. 1.1 Chlorierte Diarylether und verwandte Verbindungen in der Umwelt

Bakterien, Pilze und Hefen sind in der Lage, verschiedene aromatische Substanzen zu metabolisieren und können bestimmte Verbindungen sogar als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Der entscheidende Schritt für eine Metabolisierung ist dabei die aerobe Hydroxylierung der aromatischen Struktur. Auch in Säugetieren werden Aromaten zur Entgiftung und Ausscheidung zunächst hydroxyliert (Abbildung 1.2).

Säugetiere



Bakterien



Pilze / Hefen

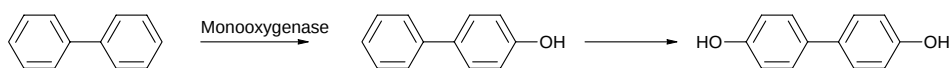


Abb. 1.2 initiale Metabolisierungsschritte des Abbaus aromatischer Verbindungen

Sowohl der Angriff des Sauerstoffs als auch die weiteren Metabolisierungsschritte differieren stark zwischen verschiedenen Substraten und Organismen, erfolgen aber überwiegend unter Öffnung des aromatischen Ringes. Verschiedene Substituenten am aromatischen Ring beeinflussen den weiteren Verlauf des Abbaus und führen zur Bildung grundsätzlich unterschiedlicher Metabolisierungsprodukte. Je nach Substitution können diese Substanzen dann als sogenannte „Dead-End-Produkte“ nicht weiter umgesetzt werden oder sogar durch Blockierung früher Abbauwege den weiteren Umsatz der Ausgangsverbindung verhindern. So scheint ein aerober Abbau zur Zeit limitiert auf schwach oder nicht-halogenierte Substanzen [12]. Hier können weitere Untersuchungen der verschiedenen Abbauwege entscheidende Informationen für eine mögliche Überwindung dieser Limitierung liefern oder, im Zusammenspiel mit anderen Technologien (z.B. Dechlorierung durch anaeroben mikrobiellen Abbau oder reduktive Dehalogenierung), Möglichkeiten des vollständigen Abbaus oder zumindest zur Detoxifikation aufzeigen.

2 Themenstellung

Das Einzugsgebiet der Oder nimmt nach der Wiedervereinigung Deutschlands und der Öffnung des ehemaligen Ostblocks nicht mehr nur geographisch eine zentrale Stellung in Europa ein. In seiner räumlichen Ausdehnung zwischen Tschechien, Polen und Deutschland hat es für Wirtschaft und Verkehr und besonders auch für Fragen des Umwelt- und Naturschutzes in Mitteleuropa verstärkt auch politische Bedeutung erlangt. Die Oder ist bei ca. 912 km Flusslänge der sechstgrößte Zufluss der Ostsee und mit einem dicht besiedeltem Einzugsgebiet von 118 861 km² ein bedeutendes Sammel- und Transportsystem für Substanzen natürlicher und anthropogener Quellen. Eine detaillierte Beschreibung der organischen Inhaltsstoffe der Oder ist für die Einschätzung ihrer Belastungssituation und zur Erstellung von Kriterien, Zielen und Maßnahmen eines modernen Flussmanagements unverzichtbar. Die vorliegende Dissertation soll mit der Analytik lipophiler organischer Inhaltsstoffe der Sedimente der Oder und wichtiger Nebenflüsse im Rahmen des 'Internationalen Oder Projektes' (IOP) einen Beitrag dazu liefern. Die erarbeiteten Kenntnisse über Einzelsubstanzen und charakteristische Substanzmuster sollen neben einer allgemeinen Beschreibung von organischen Sediment-Inhaltsstoffen dazu dienen, Quellen, diffuse Einträge und Belastungsschwerpunkte zu erkennen sowie die Mobilität und Transformation identifizierter Schadstoffe im Verlauf der Oder zu beschreiben. Dies beinhaltet auch die Festlegung und Verfolgung von Leitsubstanzen für typische Kontaminationen diffuser oder lokaler Emissionsquellen. Ein besonderes Interesse soll auf den Nachweis neuer oder in dem vorliegenden System nicht oder bisher wenig beschriebener Fremdstoffe und umweltrelevanter Substanzklassen gelegt werden. Der Einsatz der Kopplung von Kapillar-Gaschromatographie und Massenspektrometrie gewährleistet in diesem Zusammenhang bei großer Empfindlichkeit die erforderliche Breite und Spezifität der analytischen Methodik für ein „Non-Target-Screening“ einer Vielzahl von Sedimentproben.

Die Flutkatastrophe 1997 entlang der Oder bedingte eine stark erhöhte Mobilität und Verteilung organischen Materials auf Flächen auch über die üblichen Überflutungsbereiche hinaus. Die Überprüfung einer möglichen Belastung umliegender Nutzflächen durch den Austrag von Odersediment aber auch der Schadstoffeintrag durch Überflutung von Fabrikanlagen, Lagern, Tankstellen und ähnlichen Kontaminationsquellen ist eine weitere Aufgabe dieser Arbeit.

Über diesen Beitrag zur Beschreibung der Sedimentbelastung des Odersystems hinaus, bildet die Strukturaufklärung einer im Elbwasser und im elbnahen Grundwasser auftretenden unbekannten organischen Substanz einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit. Dazu wurden Wasserproben eines Tiefbrunnens in der Ortschaft Marschacht (Niedersachsen), sowie aus Elbwasser gewonnene Extrakte untersucht.

Neben der analytischen Beschreibung von Belastungen der Umweltkompartimente ist der biologische Abbau ausgetragener Schadstoffe ein zentraler Aspekt der aktuellen Umweltchemie. Für die Dekontamination vorhandener Altlasten und chlororganisch belasteter Abfälle werden heute mikrobiologische Verfahren favorisiert, da eine Verbrennung oder Deponierung gewaltiger Mengen kontaminierter Erde, Sediment oder anderer Matrices durch hohe Kosten, hohen Energieaufwand, fehlende Lagerkapazitäten und limitierte Eindämmungstechniken kaum noch in Frage kommen. Die Fragen einer möglichen vollständigen Metabolisierung bestimmter Schadstoffe, der Detoxifikation eines Substrates oder des hierbei eventuellen Auftretens toxischer Metabolite sind von zentraler Bedeutung für die Entwicklung praxisorientierter mikrobieller Verfahren. Daher ist zur Auswahl geeigneter Mikroorganismen und der Ausarbeitung geeigneter Verfahren eine detaillierte Einsicht in die grundlegenden biochemischen Stoffwechselvorgänge unabdingbar. Zusätzlich kann das Wissen über solche mikrobiellen Stoffwechselvorgänge ein Auffinden von Metaboliten der in Umweltkompartimente eingetragenen Schadstoffe erleichtern und bei der Bewertung von Schadstoffpotentialen hilfreich sein.

In dieser Arbeit werden als Modellsubstanzen für mikrobiologische Abbauversuche nicht oder wenig chlorierte aromatische Substanzen und Heterocyclen eingesetzt, da sie nur niedrige Toxizitäten aufweisen und daher relativ leicht abbaubar sein sollten. Das Ziel der Untersuchungen des aeroben Stoffwechsels von Biphenylen und Dibenzofuranen durch Pilze, Hefen und Bakterien ist es, durch Strukturaufklärung von Metaboliten genaueren Einblick in die Mechanismen der verschiedenen Abbauwege und -schritte zu erhalten. Hierzu werden Metabolite initialer Abbaureaktionen synthetisiert und den betrachteten Systemen als Substrate angeboten, um deren weitere Metabolisierung genauer verfolgen zu können. Allgemeine Mechanismen einzelner Abbauschritte sollen erkannt und konvergierende oder divergierende Abbauwege einzelner Organismen beschrieben und diskutiert werden.

3 Non-Target-Screening von Sedimenten des Odersystems

3.1 Hydrologie und Morphologie des Fluss-Systems Oder

Die Gesamtlänge des Oderlaufs beträgt 912 km von der Quelle im tschechischen Oder-Gebirge (Oderské vrchy), 25 km östlich von Olmütz (Olomouc), bis zur Mündung in die Ostsee an der Pommerschen Bucht (Zatoka Pomorska). Die Fließstrecke bis in das Stettiner Haff (Zalew Szczecinski) beträgt 855 km. Das Einzugsgebiet von 118.861 km² verteilt sich zu 6 % auf die tschechische Republik, 89 % auf Polen und 5 % auf die Bundesrepublik Deutschland [13].

Geographisch wird das Fließsystem der Oder unterteilt in Obere Oder (inklusive Quelloder), Mittlere Oder und Untere Oder. Die Obere Oder reicht von der Quelle (tschechische Oderkilometrierung 127.5) auf tschechischem Gebiet über die Mündung der Olse bei Olza (tschech.-km 0, poln.-km 27.7) auf polnischem Gebiet bis zur Widawa-Mündung (Widzawa, km 266.9) hinter Breslau (Wroclaw). Der mittlere Abschnitt führt bis zur Mündung der Warthe (Warta, km 617.6) bei Küstrin (Kostrzyn). Die Untere Oder umfaßt den Abschnitt von der Warthe-Mündung bis zur Oder-Mündung in das Stettiner Haff (km 762) [14]. Das Stettiner Haff ist ein eigenständiger morphologischer Abschnitt.

3.1.1 Morphologie

Die Oder fließt als typischer Tieflandfluß überwiegend in einem mehrere Kilometer breiten Stromtal. Nur in den ersten ca. 50 Fließkilometern ab der Quelle auf 634 m ü. NN in den tschechischen Ostsudeten besitzt sie Mittelgebirgscharakter. Sie verläuft zunächst nordöstlich, passiert die Mährische Pforte (310 m ü. NN) nahe Ostrava und tritt in ein breites Becken ein, in dem sie in nordwestliche Richtung abschwenkt. Nach Passieren einer weiteren Mittelgebirgs-Engstelle bei Krapkowice und der Mündung des wichtigsten Nebenflusses der Oberen Oder, der Nysa Klodzka, tritt die Oder bei Wroclaw in das erste von vier in ost-westlicher Richtung verlaufenden Urstromtälern ein. Entlang den eiszeitlichen, breiten Urstromtälern verläuft die Oder bei niedrigem Längsgefälle Richtung Westen (s. Tabelle 3.1). Die Durchbrüche Richtung Norden bei Scinawa, Nowa Sol und Eisenhüttenstadt zeichnen sich jeweils durch ein stärkeres Gefälle aus. In dem weiteren im wesentlichen nordwestlich ausgerichteten Verlauf nimmt die Oder mit Bobr

(Bober), Nysa Luzycka (Lausitzer Neisse) und Warta (Warthe) die drei Hauptzuflüsse der Mittleren und Unteren Oder auf und wird dann ab Widuchowa (km 704) durch Wehranlagen in West- und Ostoder (Strom-Oder) aufgespalten. Nach Vereinigung der beiden Oderarme in Szczecin und Passieren des Jez Dabie (Dammscher See) mündet die Oder als Domiaza in das Stettiner Haff (Zalew Szczecinsky). Das Haff erstreckt sich auf eine Fläche von 687 km² bei einer durchschnittlichen Tiefe von 4 m. Der Ablauf in die Ostsee erfolgt über die drei Arme Peene, Swina und Dzwina.

	m über NN	Km
Oderquelle	634	127.5 Cz.
Ostrava	209	17.5 Cz.
Olza		27.7 Pol. 0 Cz.
Raciborz	185	50
Kozle	165	95
Opole	150	150
Brzeg	148	200
Olawa	130	215
Wroclaw	118	260
Lubiaz	99	310
Glogow	74	395
Krosno	39	515
Nysa Luzycka	33	542
Slubice	23	585
Kostrzyn	12	617
Hohensaaten	2	665

Tab. 3.1 Landhöhen und Oderkilometrierung [13, 15]

3.1.2 Hydrologie

Mit einem Jahresabfluss von ca. 17 Mrd. Kubikmeter am Pegel Hohensaaten (km 665, letzter repräsentativer Wasserpegel), dies entspricht einem mittleren Abfluss von ca. 540 m³/s, ist die Oder der sechstgrößte Süßwasserzufluss der Ostsee (Jahresreihen 1921-1996 ohne 1945). Die mittlere Abflussmenge entspricht ca. 30 % des durchschnittlichen Gebietsniederschlages. Die Warthe trägt hierzu, bei gleich großem Einzugsgebiet (Warthe 54 529 km², Oder bis zur Warthe-Mündung 53 536 km²), einen mittleren Abfluss von 224 m³/s bei [13, 16].

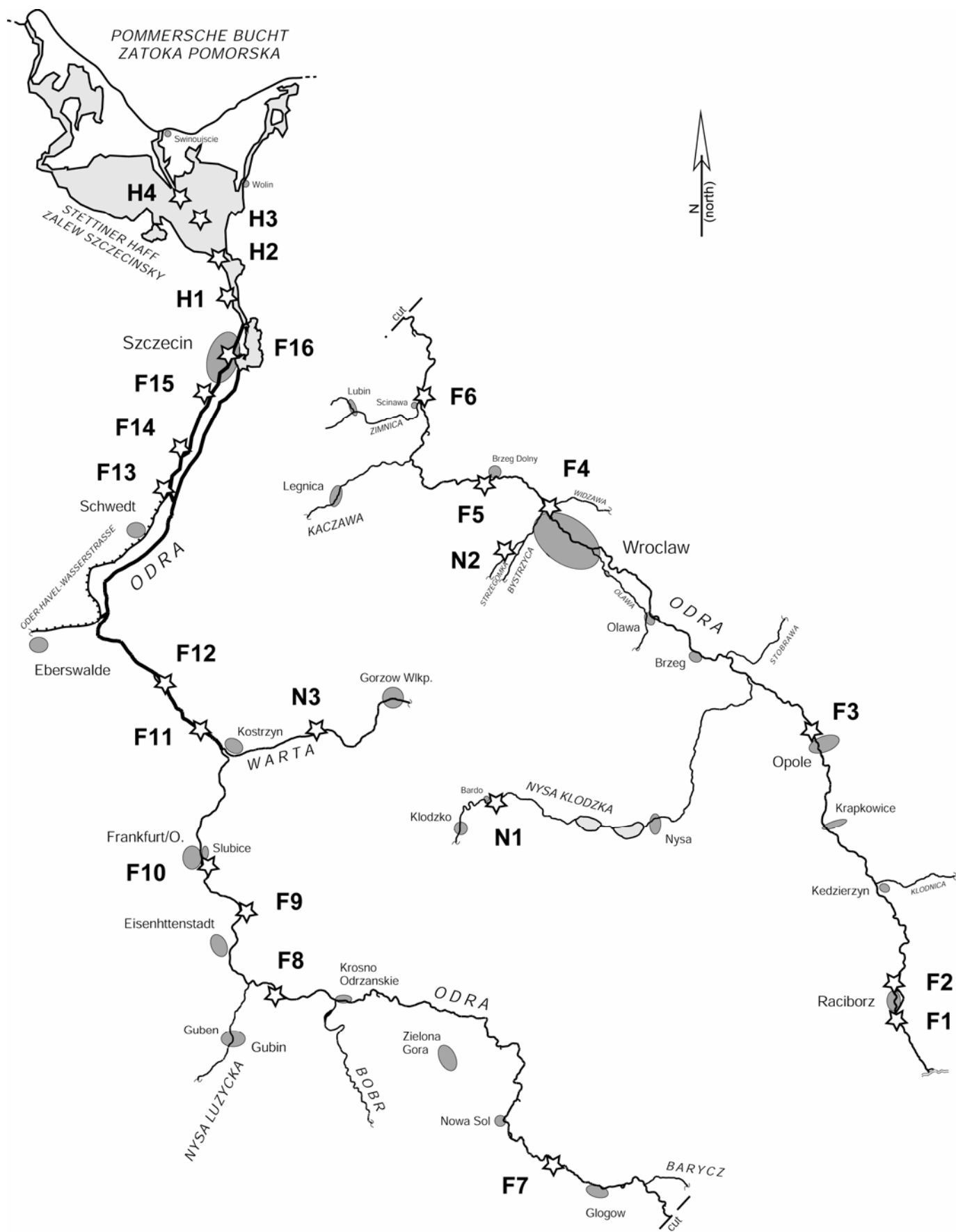


Abb. 3.1 Untersuchungsgebiet und Probenahmepunkte der Oder und ihrer Nebenflüsse

Die jahreszeitliche Verteilung der Abflüsse zwischen Winter und Sommerhalbjahr (1.11.- 30.4 bzw. 1.5-31.10) liegt bei einem Verhältnis von ca. 1.4 auf Seiten der niederschlagsreicheren Wintermonate. Prägend sind neben den jahreszeitlichen Hochwasserwellen, einem Frühjahrshochwasser im März/April und weniger häufig aber oft stark ausgeprägt, einem Sommerhochwasser im Juni/Juli, auch lang andauernde Niedrigwasserperioden in den Wintermonaten.

Das Stettiner Haff wird als Brackwasser-Gebiet einerseits durch den Abfluß der Oder mit Süßwasser (ca. 17 Mrd m³/a) gespeist, andererseits fließen ca. 7.5 Mrd m³/a Salzwasser aus der Ostsee hinzu [17]. Die Entwässerung erfolgt, beeinflusst durch meteorologische und hydrologische Parameter, durch periodische Austauschvorgänge mit der Ostsee.

Der Flußverlauf wurde mit großen Auswirkungen auf Abfluß, Erosion und Sedimentation über mehrere Jahrhunderte zur Landgewinnung, Schiffbarmachung und besonders aus Gründen des Hochwasserschutzes modifiziert. Die ehemals ausgeprägte Mäandrierung im Bereich der Urstromtäler wich durch viele einzelne Durchstiche einem eher geraden Verlauf. Zwischen 1717 und 1932 wurde in drei Etappen der Flußverlauf zwischen Olza (km 27) und Hohensaaten (km 665) von 822 km auf 635 km verkürzt [18]. Die Obere und Mittlere Oder zeichnen sich durch intensive Nutzung als Wasserressource mit diversen Speicherbecken und eine kanalisierte Fließstrecke von 186 km bis Brzeg Dolny (km 285) aus. Insgesamt gibt es 22 Staustufen in diesem Bereich. Unterhalb der letzten und höchsten Staustufe bei Brzeg Dolny (6 m Stauhöhe) beginnt der bis zur Mündung freifließende Teil der Oder mit einer Länge von ca. 500 km. Die Untere Oder ist durch eine durchgehende Eindeichung und geringes Längsgefälle charakterisiert. Der Oderbruch (Trockenlegung 1747-1753) und die westliche Uferstrecke von Hohensaaten bis Szczecin (Anfang 20. Jahrhundert) sind von Überflutungen durch Deichbauten vollständig abgetrennt. Insgesamt sind 75% des natürlichen Überflutungsgebietes durch Eindeichung und Flußlaufveränderung verloren gegangen. Die gesamte Überflutungsfläche (rezente Auenfläche) beträgt heute ca. 860 km² von ehemals 3710 km² [19]. Die Oder ist durchgehend auf einer Länge von 724 km von Kozle bis zur Mündung in die Ostsee schiffbar.

Über den Sedimenthaushalt der Oder ist wenig bekannt. Für die Jahre 1992-1996 wird für den Bereich Hohensaaten eine Geschiebefracht von 130 000 t und eine Schwebstofffracht von 380 000 t pro Jahr genannt [20]. Schwebstofffracht und

Sedimentation sind nicht nur stark abhängig von Fließgeschwindigkeit und Abfluß, sondern variieren auch mit der Jahreszeit. Abbildung 3.2 zeigt die Schwebstoffkonzentration und Schwebstofffracht in Bezug zur bewegten Wassermenge. Die Fließgeschwindigkeit ist in der Oder im allgemeinen gering (Gefälle durchschnittlich 27 cm/km ab Ostrava, unterhalb von Schwedt kleiner 5 cm/km) und nur in den Durchbruchstrecken und bei Flutereignissen erhöht.

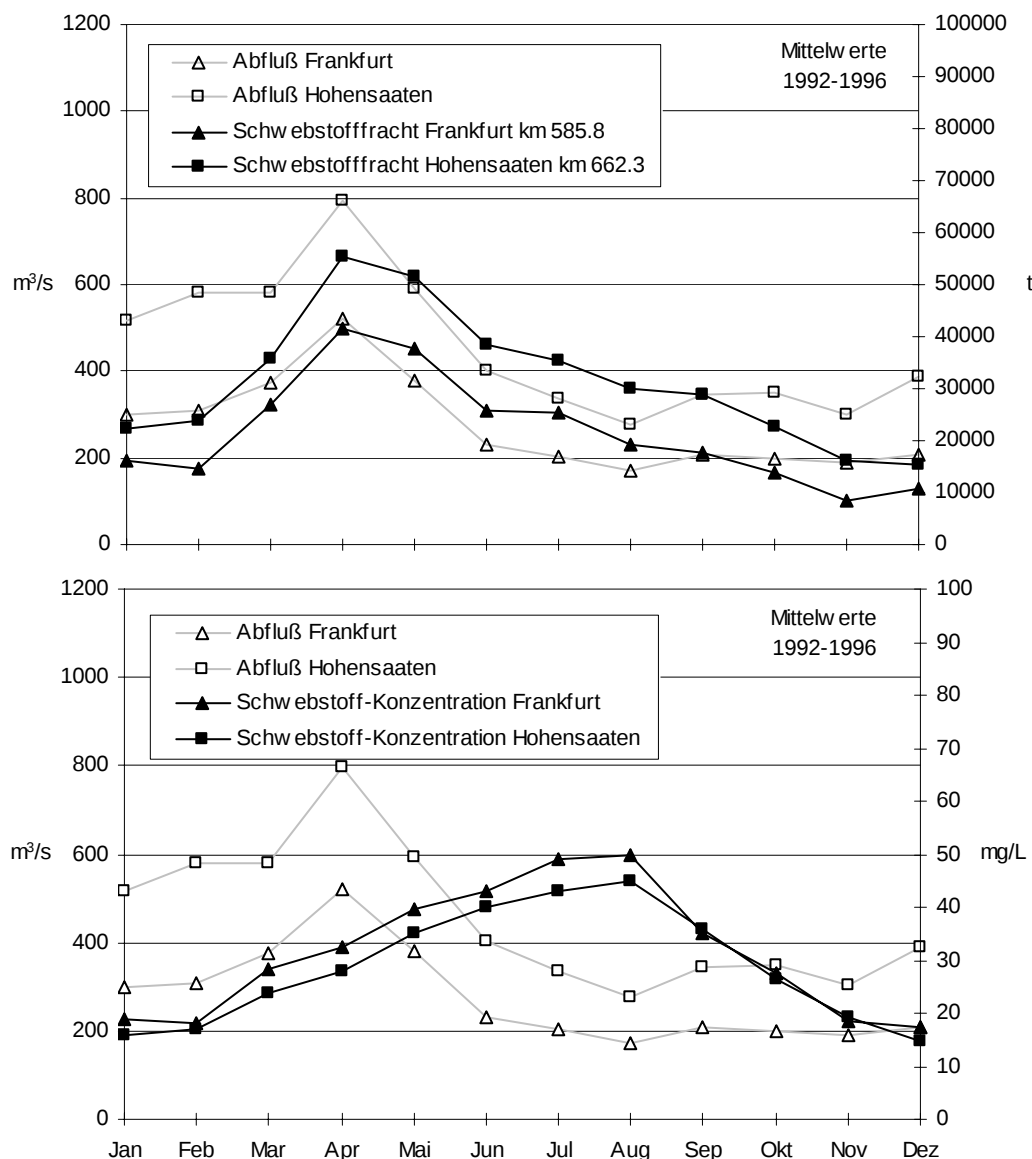


Abb. 3.2 Abfluss, Schwebstofffracht und -konzentration, Monatsmittel 1992-1996

Geschiebe und Schwebstoff bestehen überwiegend aus mittleren und groben Sanden der eiszeitlichen Urstromtäler, in den Durchbruchsstrecken mit erhöhter Fließgeschwindigkeit sind gröbere Sedimente zu finden (40-100% 0.2-0.63 mm, 0-40% 0.63-2.00 mm, 0-20% > 2.00 mm). Allgemein verringert sich die Korngröße des Sediments in Flussrichtung, unterliegt aber lokalen Schwankungen. Das Stettiner Haff ist vorübergehender Speicher der Sedimentfracht der Oder. Aufgrund wechselhafter hydrologischer und meteorologischer Konditionen und der geringen Tiefe erfolgt jedoch permanent Resuspendierung und Wiederablage.

3.2 Das Hochwasserereignis im Juli/August 1997

Von Juli bis August 1997 waren die Tschechische Republik, Polen und Deutschland von einem Flutereignis erheblichen Ausmaßes entlang der gesamten Oder betroffen. Insgesamt wurde eine Fläche von ca. 2050 km², mehr als doppelt so groß wie die eingedeichte Auenfläche, überflutet. Das Hochwasser kostete 115 Menschen in Polen und der tschechischen Republik das Leben und verursachte in den Anrainerstaaten Schäden in Milliardenhöhe an Gebäuden, Deichen, Wirtschaft und Infrastruktur.

Ursache für Stärke und Dauer des Hochwassers waren zwei extreme Niederschlagsperioden im oberen Einzugsgebiet der Oder. Intensive Regenfälle im Quellbereich der Oder in der ersten Juliwoche (4.7. - 7.7.) führten zu ersten starken Überflutungen, vor allem in der tschechischen Republik. Das Auftreten einer zweiten Episode mit starken Niederschlägen zwischen dem 18. und 21. Juli verschärfte die Situation drastisch. Die verantwortlichen *van Bebbers* Wetterlagen (ein massives Tief über Mitteleuropa führt am Rand feuchtwarme Meeresluft aus dem Mittelmeerraum nach Norden) zeichnen sich durch großflächige und ergiebige Niederschläge in Südostmitteleuropa aus. Sie führen häufig zu Hochwasser in Elbe und Oder. Abbildung 3.3 zeigt jedoch die außergewöhnliche Konzentrierung der starken Niederschläge (bis zu 400 mm) der beiden ungewöhnlich dicht aufeinanderfolgenden Ereignisse auf den Oder-Oberlauf [21].

Insgesamt fiel im Juli 1997 in wenigen Tagen ein Vielfaches (> 400%) der gesamten Niederschlagsmenge eines durchschnittlichen Julis in diesem Gebiet (siehe Abbildung 3.4)

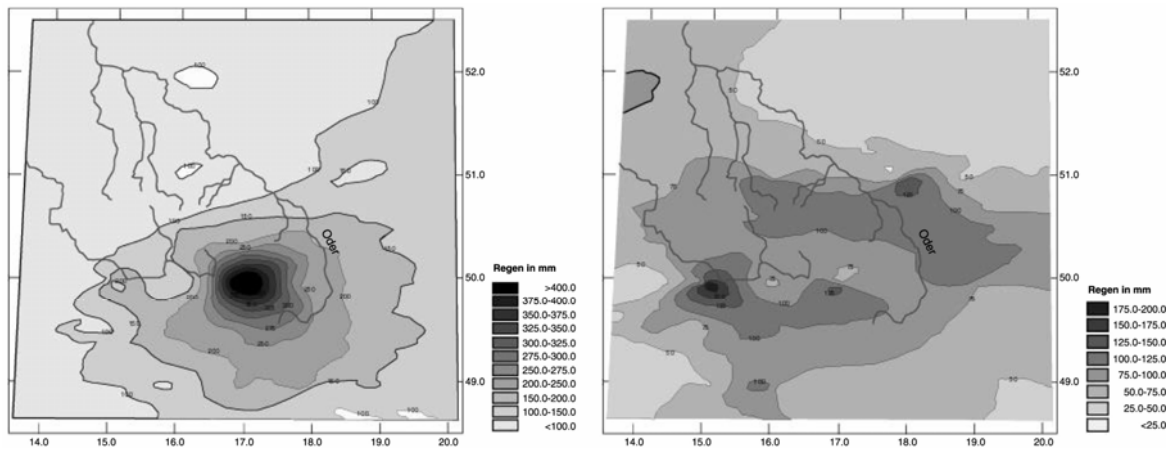


Abb. 3.3 links: Regenmengen vom 3. Juli 20.00 Uhr bis 8. Juli 20.00 Uhr 1997, akkumuliert; rechts: vom 17. Juli 20.00 Uhr bis 21. Juli 20.00 Uhr 1997, akkumuliert [22]

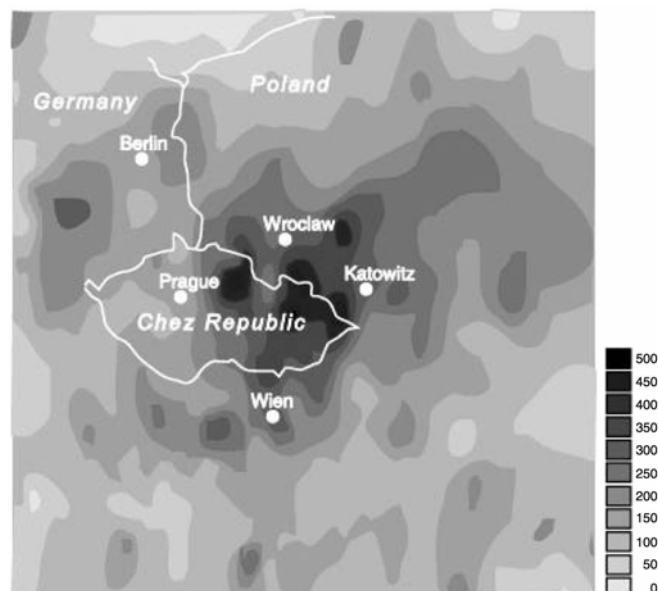


Abb. 3.4 Verhältnis der Regenmengen im Juli 1997 zu der durchschnittlichen Regenmenge im Juli, in % [22]

Schon in der ersten Niederschlagsperiode Anfang Juli war die maximale Wassersättigung der Böden schnell erreicht, und die Niederschläge flossen oberirdisch ab. Dies führte zu katastrophalen Überschwemmungen: bereits am 09.07. standen mehr als 30% der tschechischen Republik unter Wasser. Während in den Bergregionen die Flutwellen heftig aber kurz von Dauer waren, stiegen die Pegel im Flachland der Urstromtäler schnell stark an, hatten aber aufgrund des geringen Abflusses eine lange Verweildauer. Nach mehrfachen Deichbrüchen stand am 13.07. bereits die drittgrößte Stadt Polens, Wroclaw, bis zu 1.5 m unter Wasser. Die erste Hochwasserwelle erreichte am 17.07. Deutschland an der Neisse-Mündung.

Die Niederschläge der zweiten Periode (18.-21.07.) flossen aufgrund der vollständigen Sättigung des Bodens nun sofort oberflächlich ab und füllten zusätzlich die Flutbereiche in den Flusstälern. Durch zusätzliche Wassermassen und erneute Deichbrüche waren in Polen nun 254 Städte und Ortschaften, davon 17 vollständig, überflutet und 140 000 Menschen waren evakuiert. Die extrem lange Verweildauer des Hochwassers (erst am 02.08. konnten erstmals sinkende Pegelstände gemessen werden) führte zu erheblichen Problemen bei der Deichverteidigung im unteren Verlauf der Oder. So brach am 24.07. die Eindeichung der Ziltendorfer Niederung, die bis zu einer Höhe von 5 m überflutet wurde. Der höchste Pegel in Frankfurt (Oder) wurde am 28.7. mit 6.57 m verzeichnet. Am 31.07. erreichte die Flut in Hohenwutzen die Deichobergrenze und gefährdete den bis zu 9 m unter der Oder liegenden Oderbruch. Erst am 25.08. hatte sich die Hochwasserlage weitgehend entschärft.

Dieses herausragende Flutereignis hatte starke Auswirkungen auf Mobilisation, Verteilung und Fracht der Schwebstoffe bzw. Sedimente. Die Schwebstoffkonzentration während der Flut war mit 10 - 25 mg/L gegenüber einem Durchschnitt von 50 - 55 mg/L in den Jahren 1992 - 1995 deutlich erniedrigt. Dies wurde jedoch durch den extrem erhöhten Abfluss überkompensiert, so dass insgesamt eine starke Erhöhung der Schwebstoff- und Geschiebefracht zu verzeichnen war. Für die Periode vom 1.7. - 28.8.1997 wurde bei Hohensaaten ein mittlerer Abfluss von 1523 m³/s gegenüber 526.9 m³/s für die gleiche Periode 1996 gemessen [23]. Mit dem zunehmenden Abfluss wurden vermehrt gröbere Sedimentpartikel mobilisiert. Abbildung 3.5 zeigt die Zunahme der Partikelgröße und der Menge der transportierten Partikel während des steigenden Abflusses im Juli 1997 [20].

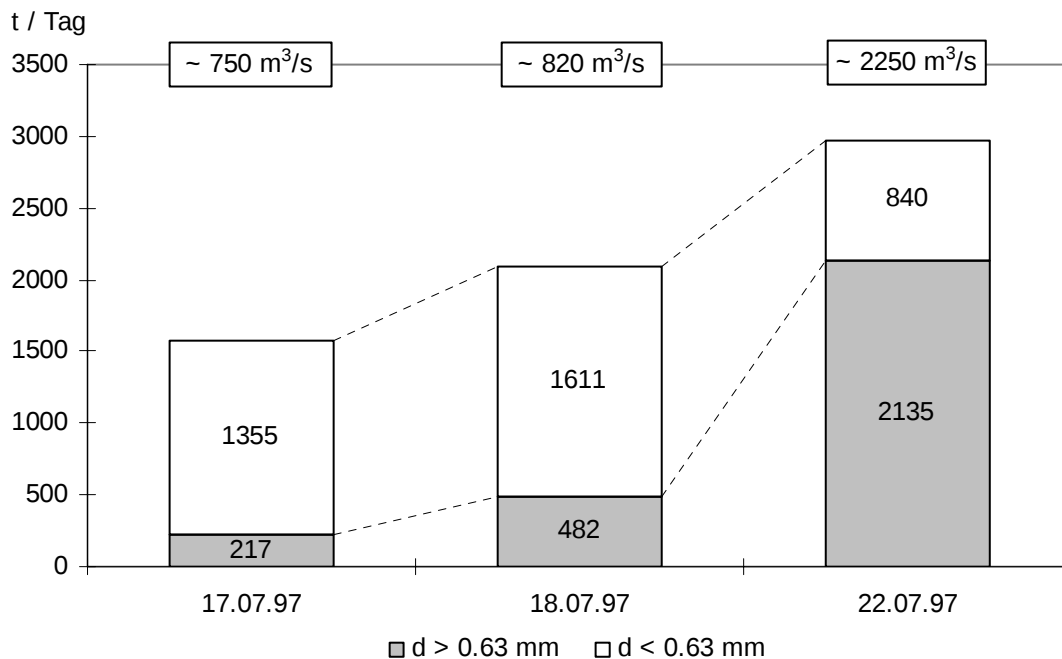


Abb. 3.5 Schwebstofftransport während des Oderhochwassers 1997, km 667

Einhergehend mit der Steigerung der Menge transportierten partikulären Materials erhöhte sich die Fracht der an die Partikel adsorbierten Substanzen. Dies lässt sich anhand der gesteigerten Jahresfracht an adsorbiertem organischen Kohlenstoff (TOC, total organic carbon) abschätzen. Während der Flut vom 16.7. bis 14.8.1997 betrug die Fracht TOC 9037 t, mehr als ein Viertel der jährlichen Fracht von 1996 mit 34110 t [24]. Die nach der Flut 1997 gesammelten Sedimente unterscheiden sich in ihren partikulären Eigenschaften nicht von den vor dem Flutereignis beobachteten Sedimenten. Sie bestehen aus mittleren bis groben Sanden mit organischen Anteilen von 2-40 % [25].

3.3 Belastungssituation

Das Einzugsgebiet der Oder zeichnet sich durch Gebiete mit hoher Urbanisation und hoher Industrialisierung, sowie durch Gebiete mit starker landwirtschaftlicher Nutzung aus. Die Industrie ist hier stark auf die städtischen Bereiche lokalisiert. Allgemein wird die Gewässergüte der Oder durch Einleitungen aus diffusen und punktförmige Quellen bestimmt. Punktförmige Quellen repräsentieren überwiegend kommunale und industrielle Einleitungen sowie Deponien, diffuse Quellen sind dominiert von Einträgen aus Landwirtschaft, Verkehr und der Verbrennung fossiler Brennstoffe. Intensive Landwirtschaft ist im gesamten Verlauf der Oder stark vertreten. Die Lage weiterer potentieller Schadstoffeinleitungen im Odereinzugsgebiet zeigt Abbildung 3.6.

Die aus punktuellen Quellen in Oberflächengewässer eingeleitete Abwassermenge im Einzugsbereich der Oder beträgt etwa 1367 Mio. m³/a. Die tschechische Republik trägt hierzu 225 Mio. m³, Polen 1061 Mio. m³ und Deutschland 81 Mio. m³ Abwässer bei (Daten für 1998) [13]. Das Verhältnis zwischen kommunalen und industriellen Abwässern beträgt annähernd 1:1. Die bei der Klärung kommunaler Abwässer eingesetzten Reinigungsstufen variieren je nach Land stark: In der tschechischen Republik unterliegen 5.8 % aller Haushaltsabwässer nur einer mechanischen Reinigungsstufe, 53.4 % einer zweiten biologischen Reinigungsstufe (biologisch), und 40.8 % werden unbehandelt eingeleitet. In Polen unterliegen 6 % nur einer ersten, 31.1 % einer zweiten und 9.5 % einer zusätzlichen dritten chemischen Reinigungsstufe, 53.4 % der Abwässer bleiben hier unbehandelt. In Deutschland werden 88.6 % der Abwässer geklärt (72.3 % Stufe III, 12.2 Stufe II, 4.1 % Stufe I) [26]. Für den Unterlauf der Oder ab der Warthe-Mündung, inklusive Stettiner Haff, wird eine eingeleitete Abwassermenge von 83.3 Mio. m³/a genannt. Von dieser Menge unterliegen nur 43.2 Mio. m³/a einer Klärung. Allein die Stadt Szczecin (450 000 Einwohnern) leitet ihre gesamte Menge von 16.9 Mio. m³/a Abwässer ungeklärt in Reglica und Westoder [17].

Die Einstufung der Oderabschnitte in Gewässergüteklassen erfolgt aufgrund verschiedener chemischer und biologischer Parameter und ist in den Anrainerstaaten unterschiedlich festgelegt. Berücksichtigt werden hierbei Daten wie Sauerstoffgehalt, biologischer Sauerstoffbedarf (BSB), chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), Nährstoffgehalte (N, P), Schwermetalle, Salzgehalte und bakteriologische Kontaminationen.

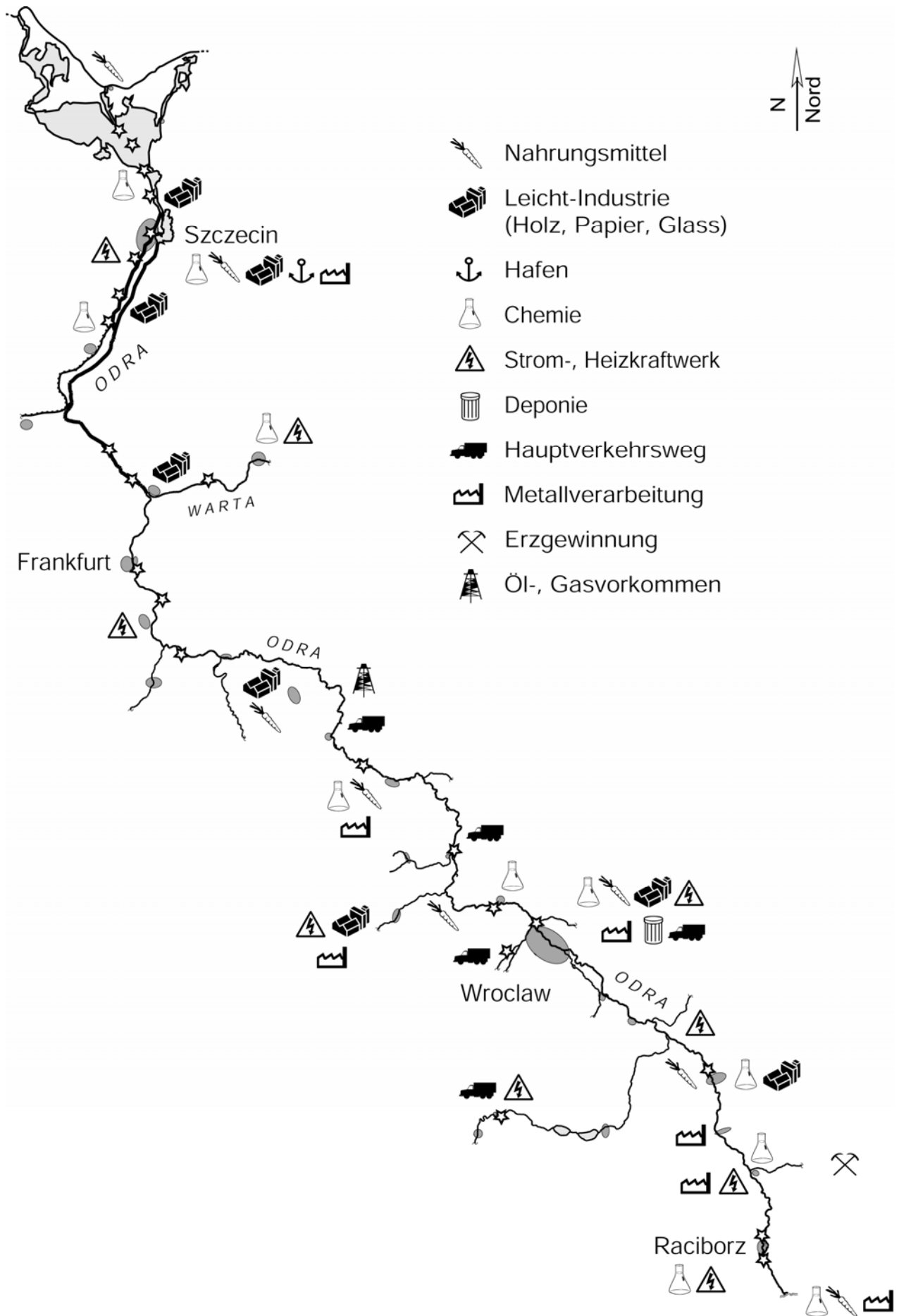


Abb. 3.6 Industrie und potentielle Schadstoffquellen im Odereinzugsgebiet

Auf dem Gebiet der tschechischen Republik hat die Oder in Bezug auf organische Parameter durchschnittlich die Klasse III („verunreinigtes Wasser“) von insgesamt 5 definierten Klassen. Ab km 57 (tschech. Kilometrierung) entspricht die Oder wegen stark erhöhter Nährstoffbelastung nur noch der tschechischen Klasse V. Die Belastung im polnischen Teil der Oder entspricht in Bezug auf BSB und Nährstoffgehalt den Klassen II-III von insgesamt drei definierten Klassen. Erhöhte BSB₅-Werte werden im Bereich Raciborz und im gesamten Unterlauf der Oder ab Widuchowa vermerkt. Stark erhöhte Nährstoffgehalte finden sich im Grenzgebiet zur tschechischen Republik, im Bereich Wroclaw, um Frankfurt/Oder und ab der Warthe-Mündung bis in das Stettiner Haff [13]. Insgesamt waren in den 1990er Jahren 742 km der Oder nach polnischen Standards aufgrund chemischer, physikalischer und biologischer Kontaminationen der höchsten Verschmutzungs-kategorie zuzuordnen [27]. In den letzten Jahren ist allgemein ein Rückgang der Werte in Richtung der Güteklasse II festzustellen [14].

Eine Beschreibung der Gewässergüte aufgrund der im vorigen Abschnitt genannten Parameter kann jedoch nur ein undifferenziertes und unvollständiges Bild der Belastungssituation bieten. Aussagen über Art, Umfang, Relevanz und Verbleib einzelner Kontaminanten werden so nicht erfasst. Weitergehende Untersuchungen in Bezug auf organische Schadstoffe in Oder und Nebenflüsse beschränken sich überwiegend auf wenige, im Kontext der Umweltchemie prominente Verbindungen im Wasserkörper. Für PAK und chlorierte Verbindungen wie PCB und Organochlor-Pestizide wurden wenige stichprobenartige Untersuchungen durchgeführt. Allgemein wurden geringe Mengen chlororganischer Verbindungen ermittelt. Quantitative Untersuchungen in den Jahren 1988 - 1991 ergaben für DDT und DDE mittlere Konzentrationen im Wasser zwischen 15 - 30 ng/L Methoxychlor und Lindan wurden sporadisch in ähnlichen Konzentrationen nachgewiesen. Der durchschnittliche PCB-Gehalt wird mit weniger als 10 ng/L angegeben [28]. Die PAK-Konzentrationen bewegten sich 1992 im Bereich von 80 - 145 ng/L [29].

Wenig Daten finden sich über Schadstoffbelastungen in Sedimenten der Oder. In Bezug auf PCB wurden für das Stettiner Haff lokal stark schwankende Werte zwischen 10 pg/g und 10 ng/g TM angegeben (1994 - 1996). Für p,p'-DDT ergab sich eine homogene Verteilung auf einem geringen Level von 7 ng/g TM. Die Metabolite DDE und DDD waren in leicht höheren Konzentrationen nachzuweisen, was auf keine aktuellen DDT-Einträge schließen ließ. [30].

Eine weitere Sediment-Untersuchung im Oberlauf der Oder hinsichtlich bekannter umweltrelevanter Schadstoffe ergab PAK-Konzentrationen von 5-11 mg/kg TM und einen Belastungsschwerpunkt im Bereich Glogow mit erhöhten AOX- und HCB-Konzentrationen [31].

Eine im Rahmen des Internationalen Oderprojektes 1997 durchgeführte quantitative Bestimmung ausgewählter organischer Kontaminanten zeigt Tabelle 3.2. [32].

Ort	Bezeichnung	Gesamt-PAK µg/kg TM	Dichlorbenzol µg/kg TM	DDE µg/kg TM
Raciborz	F1	60	< 1.0	< 1.0
Raciborz	F2	6550	< 1.0	10.0
Strzegomka	T2	32490	4.0	< 1.0
Brzeg Dolny	F5	10980	15.6	8.0
Scinawa	F6	10780	17.7	8.0
Brzeg Glogowski	F7	6800	6.7	3.0
Polecko	F8	8490	11.4	3.5
Urad	F9	29660	1.5	6.0
Slubice	F10	2650	6.1	6.0
Warta/Swierkocin	T3	530	< 1.0	< 1.0
Kostrzyn	F11	1230	< 1.0	1.2
Czelin	F12	750	< 1.0	< 1.0

Tab. 3.2 Konzentrationen ausgewählter Verbindungen in Sedimenten der Oder 1997

3.4 Analytische Methodik

Selektivität und Nachweisgrenze stehen in der organischen Analytik der Breite des erfassbaren Substanzspektrums, dem analytischen Informationsgehalt der Untersuchungsmethode und einem vertretbaren Mess- und Zeitaufwand konträr gegenüber. Allgemein haben die chemisch-physikalischen Eigenschaften der vorhandenen Substanzen, ihre Wechselwirkungen mit der Matrix, die Art der Matrix und die Komplexität des Stoffgemisches Einfluss auf die Wahl des Analyseverfahrens und damit auf das erfassbare Substanzspektrum und die jeweiligen Bestimmungsgrenzen.

Die meisten organischen Analysen im Bereich der Umweltchemie beziehen sich auf wenige Substanzen oder Substanzklassen, die aufgrund behördlicher oder gesetzlicher Regelungen sowie bekannter Belastungskriterien ausgesucht werden. Bei einer solchen Fokussierung auf ausgewählte Substanzen bzw. Substanzklassen lassen sich mit Hilfe selektiver Verfahren häufig niedrige Nachweisgrenzen erreichen („Target-Screening“). Die dabei angewandten selektiven Anreicherungsverfahren, Trennungen und Detektionen bedingen eine Diskriminierung anderer vorhandener Substanzen und damit eine Reduzierung des Informationsgehaltes bezüglich der gesamten Probe. Das bei einem „Non-Target-Screening“ eingesetzte analytische Verfahren muss jedoch ein möglichst umfassendes Substanzspektrum abdecken, einen hohen Informationsgehalt bezüglich Art und Struktur der Inhaltsstoffe liefern und einen vertretbaren Mess- und Zeitaufwand besitzen.

Das in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der Oder auf lipophile organische Sedimentinhaltsstoffe angewandte Verfahren ermöglicht eine Aufarbeitung und Anreicherung unter geringer Diskriminierung vorhandener Substanzklassen und erlaubt die Detektion einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen unter hohem strukturellen Informationsgehalt - auch in Spurenkonzentrationen. Einschränkungen der gewählten Methodik sind bedingt durch die Limitierung auf lipophile, extrahierbare Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter ca. 500 Dalton. Stark polare Substanzen, die sich einer geeigneten Derivatisierung entziehen oder starke Wechselwirkungen mit der Matrix besitzen („bound residues“) können ebenso wie Verbindungen, die die thermische Belastung durch die Bedingungen der Gaschromatographie nicht überstehen, nicht erfasst werden.

Die grundsätzliche Vorgehensweise des durchgeführten Non-Target-Screenings im Einzugsgebiet der Oder zeigt die folgende schematische Aufstellung der Arbeitsschritte. Ein detailliertes Schema der Bearbeitung einer entnommenen Sedimentprobe zeigt Abbildung 3.7

1. Auswahl bzw. Sichtung geeigneter Probenahme-Orte im Verlauf der Oder
2. Entnahme einer repräsentativen Sedimentprobe mittels Van-Veen-Greifer bzw. Teleskopstange (Fluss-Sedimente, Mischprobe aus drei Proben längs des Querschnittes) oder Stahlspatel (Ufer-Sedimente).
3. Matrixabtrennung und unselektive Anreicherung durch schrittweise Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität.
4. Schwefelentfernung.
5. Säulenchromatographische Fraktionierung an aktiviertem Kieselgel mit Elutionsmitteln steigender Polarität.
6. Derivatisierung polarer Fraktionen zur verbesserten gaschromatographischen Erfassung polarer Verbindungen.
7. Analyse der Fraktionen durch gaschromatographische und gaschromatographisch-massenspektrometrische Methoden.
8. Auswertung und Bewertung der Analyseergebnisse

Im genannten methodischen Rahmen ermöglicht diese Vorgehensweise eine umfangreiche Charakterisierung organischer Substanzen im Sediment und erlaubt qualitative und halb-quantitative Aussagen zur Einschätzung lokaler Kontaminationen, deren Zuordnung zu potentiellen Quellen sowie die Beschreibung der allgemeinen Belastungssituation im Verlauf der Oder. Einzelne Schwerpunkte können erkannt und gebietsspezifische, diffuse und punktförmige Quellen von überregionalen oder ubiquitären Einflüssen abgegrenzt werden.

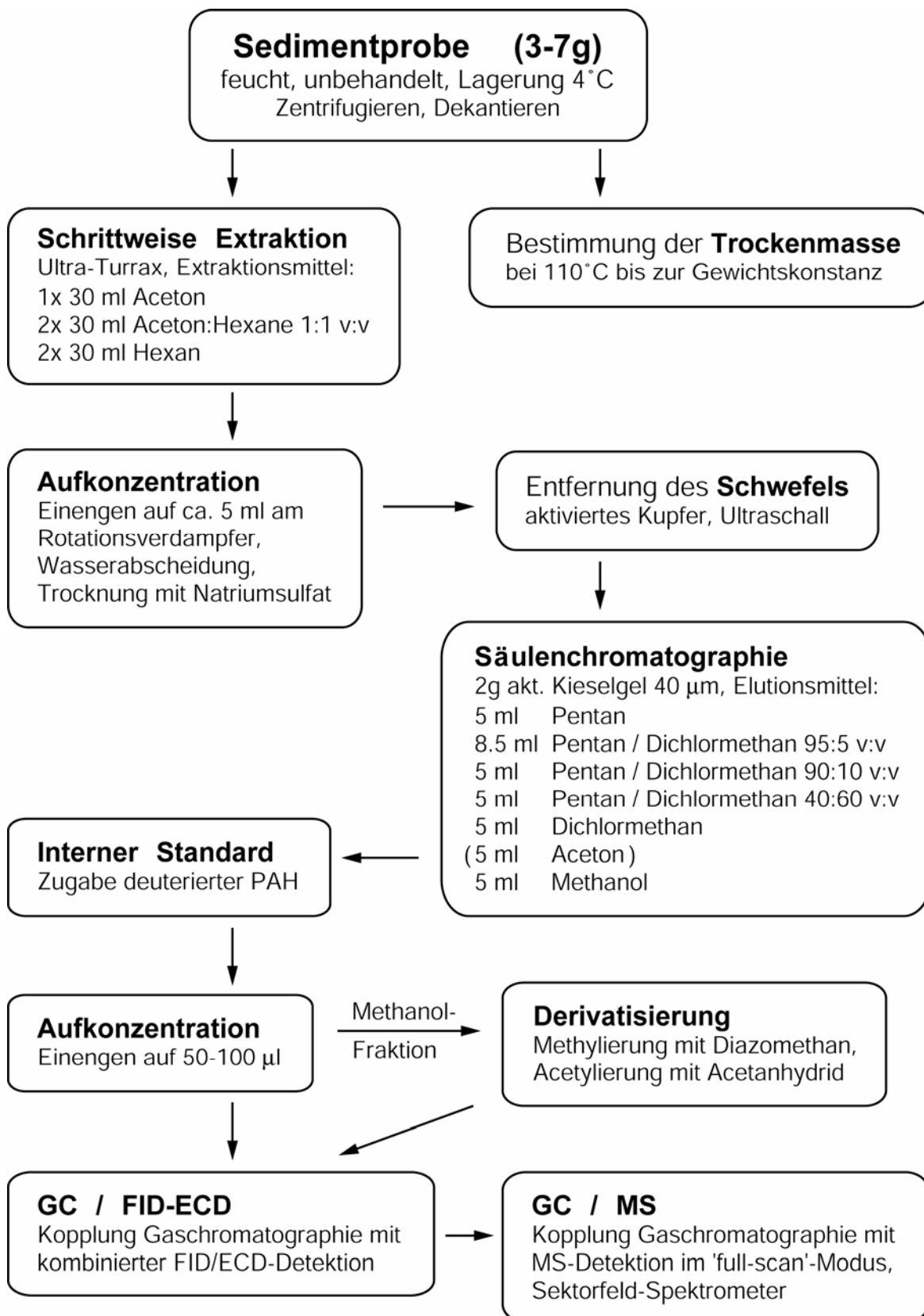


Abb. 3.7 Analyseschema der Untersuchungen von Odersedimenten - Arbeitsschritte

3.4.1 Probenahme und Lagerung

Der erste kritische Schritt der Analyse von organischen Sedimentinhaltsstoffen ist die Probenahme. Sie muss sowohl repräsentativ für die jeweilige Probenahmeregion sein als auch einem statistisch ausreichenden lokalen Querschnitt entsprechen. Schon während Probenahme und Abfüllung müssen Kontaminationen weitgehend verhindert werden und eine mögliche Veränderung des Probengutes während der anschließenden Lagerung ausgeschlossen werden. Zur Vermeidung von Kontamination und Minimierung der Adsorption von Inhaltsstoffen an der zur Probenahme eingesetzten Ausrüstung, bestehen die verwendeten Geräte aus Glas oder Edelstahl. Gefäße werden mit gespülten, Teflon-beschichteten Gummidichtungen bzw. Septen luftdicht verschlossen.

Zur Entnahme einer Fluss-Sedimentprobe vom Boot aus wurde an drei Stellen des jeweiligen Flussquerschnittes mit einem Van-Veen-Greifer Sediment entnommen und zu einer Gesamtprobe vermischt. Von dieser Probe wurden etwa 100 g in ein verschraubbares Glasgefäß überführt. Die übrigen Fluss-Sedimente wurden mit einer Teleskopstange aus 2-5 m Entfernung vom Ufer entnommen. Für Sedimente aus Uferregionen oder für auf umliegende Gebiete ausgeschwemmte Sedimente wurden ca. 50 g Probe aus einem Umfeld von mehreren Metern mit einem Stahlspatel entnommen. Alle Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

3.4.2 Probenaufarbeitung

Zur Extraktion organischer Inhaltsstoffe aus Böden oder Sedimenten wird eine Vielzahl von Extraktionsverfahren verwandt. Die überwiegend eingesetzten Flüssigextraktionen zeichnen sich durch einen hohen Anreicherungsgrad und einen geringen apparativen Aufwand aus. Eine effektive Durchführung in möglichst wenig Arbeitsschritten verringert zudem das Risiko von Kontamination. Zur Extraktion finden hierbei verschiedene Extraktionsmittel und Gemische bei unterschiedlichen Bedingungen (Druck, Temperatur), sowie technische Extraktionshilfen Verwendung. Besonders für die Analytik von Pflanzenschutzmitteln, PCB und PAK sind verschiedene Extraktionsverfahren ausgearbeitet und verglichen worden. Die klassische Soxhlet-Extraktion wird zunehmend durch verschiedene neu- und weiterentwickelte Methoden ersetzt. Zu diesen Techniken zählen Extraktionen mit überkritischen Flüssigkeiten (SFE: „supercritical fluid

extraction“ [33, 34]), mit Flüssigkeiten unter Druck (PSE: „pressurized solvent extraction“; z.B. ASE: „accelerated solvent extraction“ [35] und „subcritical water extraction“ [36]), Wasserdampf [37], sowie mikrowellenunterstützte (MAE) [38] oder ultraschallunterstützte Flüssigextraktionen [39]. Vergleiche der verschiedenen Extraktionsmethoden zeigen für jeweils ausgesuchte Zielanalyten annähernd gleiche Wiederfindungsraten. Jedoch werden gute Extraktionsausbeuten überwiegend nur durch spezielle Randbedingungen der Methode, wie z.B. Extraktionsmittel-Zusammensetzung, Extraktions-Temperatur und Extraktions-Zeit erhalten. [40-46].

In dieser Arbeit wird eine Flüssigextraktionsmethode unter Einsatz eines Dispergiergerätes (Ultra-Turrax) verwendet, die im Vergleich mit Soxhlet-Extraktion, SFE und Wasserdampfdestillation sehr gute Extraktionsausbeuten für ein breites Substanzspektrum liefert [47]. Dies ist Voraussetzung für das beabsichtigte umfassende Non-Target-Screening von Sedimentinhaltsstoffen eines weiten Polaritätsbereiches. Tabelle 3.3 zeigt die relativen Extraktionsausbeuten für beispielhaft ausgewählte Verbindungen nach der Ultra-Turrax-Extraktion und der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Aufarbeitung im Vergleich mit vier weiteren Extraktionsmethoden.

	Ultra Turrax	Soxhlet 1	Soxhlet 2	SFE	WDD
n-Pentacosan (Fraktion 1)	100	98	1	48	40
Phytadien (Fraktion 2)	100	91	n.n.	38	49
Cadalen (Fraktion 3)	100	97	23	29	58
Fluoranthen (Fraktion 4)	85	100	n.n.	6	54

Tab. 3.3 Relative Extraktionsausbeuten für Verbindungen verschiedener Fraktionen.
Ultra-Turrax: sequentielle Extraktion mit Aceton+Hexan; Soxhlet: 1:
Aceton+Hexan, 2: Hexan; SFE: Supercritical-Fluid-Extraction: CO₂+5%
MeOH; WDD: Wasserdampfdestillation

Zur Matrixabtrennung und Anreicherung der Inhaltsstoffe wurden die Sedimente ohne Vorbehandlung sequentiell mit Aceton/Hexan (1:1) unter Einsatz eines Dispergiergeräts (Ultra-Turrax) extrahiert. Aus dem organischen Rohextrakt wurde

mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei verringertem Druck das leichtflüchtige Aceton ohne Thermostatisierung des Destillationsgefäßes abdestilliert. Die entstehende Verdunstungskälte verhindert dabei den Verlust leichtflüchtiger Verbindungen während der Konzentrierung des Extraktes. Nach Entfernen des sich im Verlauf des Prozesses abscheidenden Wassers wurde der restliche Hexanextrakt auf wenige Milliliter eingeeengt und durch eine mit wasserfreiem Natriumsulfat befüllte Pasteurpipette filtriert und getrocknet.

Zur Vermeidung von Störungen und Überlagerungen bei den folgenden gaschromatographischen Untersuchungen wurde der Extrakt zur Schwefelentfernung mit aktiviertem Kupferpulver versetzt, 15 Minuten mit Ultraschall behandelt und einige Stunden in Dunkelheit bei 4 °C stehengelassen [48].

3.4.3 Fraktionierung

Sedimente von Flüssen innerhalb dichtbesiedelter, industriell und landwirtschaftlich genutzter Gebiete beinhalten eine Vielzahl extrahierbarer organischer Substanzen biogener und anthropogener Herkunft [47, 49]. Diese Komplexität und der extrem große Konzentrationsbereich dieser Inhaltsstoffe (von einigen ng/kg bis mehrere mg/kg TM Sediment) erfordern eine sorgfältige Auftrennung des Rohextraktes, um Überlagerungen zu vermeiden und die Detektion auch von Spurenkomponenten zu ermöglichen.

Für Sediment-, Boden oder Schwebstoffuntersuchungen werden meist selektive „clean-ups“ unter Kombination verschiedener Reinigungs- und Trennmethoden verwandt. Hierzu zählen neben dem Einsatz flüssigchromatographischer Verfahren auch Kodestillation, Flüssig-Flüssig-Verteilung und Membrantrennung [50], sowie Festphasenextraktion (SPE: „solid phase extraction“) mit geeigneten Phasen und Lösungsmitteln [51]. Die geeignete Kombination verschiedener Verfahren soll eine selektive Anreicherung der Zielsubstanzen zur Verbesserung ihrer Nachweisgrenze und zur Ausschaltung von Störungen beim Einsatz entsprechender Detektionsverfahren sichern. Als flüssigchromatographische Verfahren werden überwiegend Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Hochdruck-Gelpermeationschromatographie (GPC) und Chromatographie an Kieselgel-, Florisil- oder Aluminiumoxidphasen bei Normaldruck eingesetzt. Säulenchromatographie unter Normaldruck wird in einer Vielzahl analytischer Anwendungen benutzt. Besonders im Bereich

der Pestizid-Analytik hat sich diese Methode in Verbindung mit der Gelpermeationschromatographie etabliert [52-54].

Zur Erfassung des gewünschten breiten Substanzspektrums im Rahmen von Screening-Untersuchungen ist die Abtrennung höhermolekularer Matrix-Bestandteile und die Auftrennung der Rohextrakte zwar notwendig, darf aber nicht zur Diskriminierung wesentlicher oder gewünschter Untersuchungsbereiche führen. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren einer sequentiellen Flüssigchromatographie mit Elutionsmitteln steigender Polarität an einem Kieselgel besonders enger Korngrößenverteilung, bietet eine Fraktionierung unter bestmöglichem Erhalt des detektierbaren Substanzspektrums [47]. Der Einsatz einer definierten Menge aktivierten Kieselgels und definierter Lösungsmittelgemische sichert hierbei eine scharfe, reproduzierbare Trennung der Fraktionen nach Polarität. Überschneidungen einzelner, vor allem in größerer Menge vorhandener Komponenten sind jedoch nicht zu vermeiden. Das Elutionsprofil ausgewählter Fraktionsinhaltsstoffe zeigt Abbildung 3.8.

Mini-Kieselgel-Chromatographie 2 g aktiviertes Kieselgel (40 µm)

	<i>Elutionsmittel:</i>	<i>Fraktion:</i>	<i>Elutionsfolge:</i>
	Methanol (+ Derivatisierung)	6	Steroidalkohole, Fettsäuren, polare Organochlorpestizide, Alkylphenole, Abietinsäure
	Dichlormethan (Aceton)	5	n-Aldehyde, Fluorenol Dichlorbenzophenon n-Alkan-2-one, Wachsester Bischlorpropylether, HCH Phthalate, Benzocarbazole
	Pentan:Dichlormethan 40:60	4	Benzfluoren, Coronen, Carbazol Diphenylether, Benzonaphthofuran Fluoranthren, Benzanthracen, Squalen Fluoren, Pyren, Dibenzothiophen
	Pentan:Dichlormethan 90:10	3	Alkylphenanthrene, Reten Phenanthren, Anthracen, Dibenzofuran Acenaphthen, Alkyl-naphthalene
	Pentan:Dichlormethan 95:5	2	Naphthalin, Biphenyl, Alkylbenzole, Indan, Phenylalkane PCBs, DDT, DDD, DDE, Phytadien
	Pentan	1	chlorierte Benzole Alkane, Pristan

Abb. 3.8 „Mini-Kieselgel-Chromatographie“, Verteilung verschieden polarer Inhaltsstoffe auf die säulenchromatographischen Fraktionen

Der nach der Aufarbeitung erhaltene Extrakt wurde auf ca. 0.5 ml eingeeengt und auf eine mit 2 g aktiviertem Kieselgel beladene und mit Teflonfritten verschlossene Mikrosäule aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte mit Elutionsmitteln steigender Polarität von Pentan zu Dichlormethan. Zur Erfassung stark polarer Inhaltsstoffe wurde die Säule abschließend mit Methanol gespült.

3.4.4 Derivatisierung

Voraussetzungen für gaschromatographische Untersuchungen von organischen Substanzen sind eine ausreichende Flüchtigkeit, Temperaturbeständigkeit bei der Verdampfungstemperatur und das Fehlen starker Wechselwirkung mit der stationären Phase. Bestimmte Substanzgruppen entziehen sich aufgrund ihrer chemischen oder physikalischen Eigenschaften diesen Untersuchungen oder zeigen ein nur unzureichendes Elutionsverhalten. Zu ihnen zählen die nach Aufarbeitung und Fraktionierung in den polaren Fraktionen enthaltenen Alkohole, Amine und Phenole, sowie aromatische und nicht-aromatische Carbonsäuren. Durch chemische Veränderungen an den funktionellen Gruppen können Flüchtigkeit und Elutionsverhalten dieser Substanzen so optimiert werden, daß sie gaschromatographischen Untersuchungen und anschließenden Detektionen zugänglich werden.

Die aus der Fraktionierung erhaltenen methanolischen Fraktionen wurden zunächst mit Diazomethan in Lösung methyliert und anschließend mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Dabei wurden vorhandene Carbonsäuren und acide Phenole in ihre korrespondierenden Methylester bzw. -ether sowie Alkohole und Amine in die entsprechenden Acetate bzw. Acetamide umgewandelt.

3.4.5 Gaschromatographie

Die aus Probenahme, Aufarbeitung und Fraktionierung erhaltenen Proben wurden kapillar-gaschromatographisch untersucht. Es erfolgte zunächst Detektion mit einer Kombination von FID und ECD zur Abschätzung der Komplexität und Menge der vorhandenen Substanzgemische. Der zusätzliche Einsatz eines Electron Capture Detector (ECD) zum FID ermöglicht das Erkennen spezieller Inhaltsstoffe auch in Spurenkonzentrationen, da bestimmte Substanzen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften eine stark erniedrigte Nachweisgrenze im ECD aufweisen. Besonders gut detektiert werden Verbindungen mit hoher Elektronenaffinität, z.B. Substanzen

die Halogen- und Nitro-Gruppen enthalten, sowie eine Vielzahl von Schwefel- und Phosphorverbindungen [55-57]. Diese Kombination eignet sich damit hervorragend zur ersten Differenzierung der Fraktionsinhalte und im Besonderen zum Nachweis von chlorhaltigen Verbindungen wie chlorierte Kohlenwasserstoffe, Organochlor-Pestizide und PCB, die aufgrund ihrer eventuell geringen Konzentration von anderen Substanzen im GC-FID überlagert sein können. Durch die simultane FID-Detektion lassen sich ECD-aktive Substanzen später einfach zu Signalen in den Chromatogrammen der unselektiveren Detektoren zuordnen.

Als stationäre, flüssige Phase der Kapillarsäulen kamen chemisch gebundene unpolare Silikonphasen mit 5% Phenylgruppen zum Einsatz. Diese Säulen ermöglichen mit einem gut definierbaren Elutionsverhalten das Verwenden von bekannten und publizierten Retentionsabfolgen bzw. Retentionsindices [58-61]. Das injizierte Probenvolumen betrug jeweils 1 µl, wobei die optimale Konzentration vor der Messung durch Einengen bzw. Verdünnung des Extraktes mit Dichlormethan eingestellt wurde. Das überwiegend benutzte Injektionssystem war ein unbeheizter on-column Injektor. Dieser Injektor erlaubt das Auftragen des Probenextraktes direkt auf die Trennsäule unter schonenden Bedingungen. Der Nachteil einer Verschmutzung durch schlecht verdampfbare Extraktinhalte wird durch den Einsatz eines austauschbaren 'Retention Gaps' (unbelegte, vorgeschaltete Säule, Länge 1m) ausgeglichen. Als weiteres Aufgabesystem diente ein beheizter split/splitless-Injektor im splitless-Modus.

3.4.6 Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Inhaltsstoffen der einzelnen Fraktionen erfolgte durch massenspektrometrische Detektion. Eingesetzt wurde ein doppelt fokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer. Der gescannte Massenbereich betrug 35-500 bzw. 35-700 Dalton.

EI⁺-Massenspektren besitzen einen hohen strukturellen Informationswert. Die Verteilung und Intensitäten der aus dem Zerfall durch Beschuss mit Elektronen (70 eV) entstehenden Massenfragmente (m/z) lassen Aussagen über Struktur, funktionelle Gruppen und das Vorhandensein bestimmter Heteroatome zu. Art und Häufigkeit der Fragmentationen ergeben substanzspezifische Massenspektren, die, zusammen mit weiteren Informationen, eine eindeutige Identifizierung einer Substanz erlauben bzw. Hinweise für einen Strukturvorschlag liefern. Heteroatome

werden anhand einer spezifischen Isotopenverteilung erkannt, besonders Elemente mit mehreren häufig vorkommenden Isotopen, wie Chlor (^{35}Cl , ^{37}Cl), Brom (^{79}Br , ^{81}Br) oder Schwefel (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S), liefern gut erkennbare Isotopenmuster im Massenspektrum. Der höchste registrierte Massenpeak entspricht oft dem Molekülion M^+ , womit man dann die Molekülmasse erhält. Ist M^+ ungerade liegt eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen im Molekül vor. Massendifferenzen prominenter Fragmentationen, aber auch ungewöhnliche oder selten auftretende Fragmentierungen, lassen sich als charakteristische Zerfallsreaktionen bestimmter Struktureinheiten interpretieren [62]. Der Basispeak, als relativ stabiles Zerfallsprodukt, liefert weitere wertvolle Strukturaussagen. Diese spezifischen Informationen lassen sich hervorragend zur Strukturzuordnung der GC-Peaks anhand von Massenspektrenbibliotheken oder Vergleichssubstanzen nutzen oder geben wichtige Grunddaten für Strukturvorschläge von unbekannten Verbindungen.

In dieser Arbeit wurden umfangreiche elektronische Massenspektren-Bibliotheken zur Identifizierung bekannter Massenspektren bzw. Substanzen verwendet. Auswerte-Programme waren Masslab/Masslynx (Finnigan/Fisons, Cheshire, England) mit den Bibliotheken NIST und LIBTX, Masslib (Max Planck Institut für Kohleforschung, Mühlheim) mit NIST/EPA/NIH, Wiley und Chemical Concepts, sowie OPUS (Micromass, Manchester, England) mit NIST, Wiley und intern erstellten Datenbanken [63].

Die Identifizierung einer Substanz gilt als gesichert, wenn Massenspektrum und Retentionszeit der detektierten Verbindung mit Daten entsprechenden Referenzmaterials bei gleichen experimentellen Bedingungen übereinstimmen oder wenn weitere Informationen (zusätzliche massenspektrometrische Untersuchungen, Spektrenbibliotheken bzw. Retentionszeiten und -indices) eine zweifelsfreie Zuordnung zulassen [58, 59, 61, 64, 65]. Besondere Schwierigkeiten traten bei Isomerengemischen auf, bei denen die Zuordnung aufgrund von Retentionsdaten eine übereinstimmende Selektivität der Trennphasen, vergleichbare Trennbedingungen und die exakte Identifikation der Bezugskomponente voraussetzen. Ergänzende Informationen boten publizierte Daten von Elutionsverhalten und Retentionsabfolgen der in den Gemischen enthaltenen Verbindungen oder strukturell verwandter Substanzen, die mit den in dieser Arbeit verwandten gaschromatographischen Phasen erhalten worden waren [47, 66].

3.5 Probendaten

Die untersuchten Proben entstammen den Probenkampagnen des Internationalen Oder-Projektes (IOP) unter Beteiligung von Forschungseinrichtungen der Bundesrepublik Deutschland, Polen und der Tschechischen Republik. Aufgabe des Projektes war die Beschreibung des Status, der Dynamik und des Verbleibs vorhandener Schadstoffe zur Verbesserung bzw. Entwicklung eines Oder-spezifischen Monitorings, zur Definition lokaler Qualitätskriterien und der Begründung von Maßnahmen der Schadstoffreduzierung. Die erste der von mir begleiteten Probenahme-Kampagnen des Jahres 1997 erfolgte im August, unmittelbar nach den dramatischen Hochwasserereignissen dieses Jahres. Im November 1997 erfolgte die Beprobung des Unterlaufes der Oder vom Wehr bei Widuchowa (Westoder) bis zum Kanal Piastowski (Swina), der das Stettiner Haff zur Ostsee entwässert. Aus den folgenden Probekampagnen der Jahre 1998 und 1999 wurden ausgewählte Proben unter Berücksichtigung der Analyseergebnisse der ersten Probenserie einem weiteren Screening unterzogen. Aus Nebenflüssen wurden Sedimente der Nysa Klodzka, Strzegomka und Warta untersucht. Die Tabellen 3.4 (Kampagne 25.-29. August und 16.-19.-November 1997) und 3.5 (Kampagnen 5.-15. Mai 1998 und 16.-25. Juni 1999) listen die jeweiligen Probenahmepunkte stromabwärts von der Quelle auf. Die Nebenflüsse sind an der Stelle ihres Zuflusses in die Tabelle eingereiht.

Ort (Nebenfluss)	Bezeichnung	Art	Probenahme	Datum	Zusatz
Raciborz	F1	Fluss	Teleskop	08.97	flussaufwärts
Raciborz	F2	Fluss	Teleskop	08.97	Miedonia
Opole	F3	Fluss	Teleskop	08.97	
Bardo (Nysa Klodzka)	N1	Fluss	Teleskop	08.97	
Wroclaw	F4	Fluß	Teleskop	08.97	Janowek
	F4-U	Ufer	Spatel	08.97	
	F4-F	Feld	Spatel	08.97	
Bogdaszowice (Strzegomka)	N2	Fluss	Teleskop	08.97	
Brzeg Dolny	F5	Ufer	Spatel	08.97	
	F5-F	Feld	Spatel	08.97	
Scinawa	F6	Fluß	Teleskop	08.97	
Czerna	F7	Fluss	Teleskop	08.97	
	F7-U	Ufer	Teleskop	08.97	
	F7-F	Feld	Teleskop	08.97	
Polecko	F8	Fluss	Teleskop	08.97	
	F8-U	Ufer	Spatel	08.97	
	F8-F	Feld	Spatel	08.97	
Urad	F9	Fluss	Teleskop	08.97	
	F9-F	Feld	Spatel	08.97	
Slubice	F10	Fluß	Teleskop	08.97	
	F10-U	Ufer	Spatel	08.97	
	F10-F	Feld	Spatel	08.97	
Swierkocin (Warta)	N3	Fluss	Teleskop	08.97	
Kalensko	F11	Fluss	Teleskop	08.97	
Czelin	F12	Fluss	Teleskop	08.97	
Friedrichsthal	F13	Fluss	Greifer	11.97	Westoder
Mescherin	F14	Fluss	Greifer	11.97	Westoder
Skosnica	F15	Fluss	Greifer	11.97	Westoder
Szczecin	F16	Fluss	Greifer	11.97	
Roztoka Odranska	H1	Fluss	Greifer	11.97	Boje 22/24
Stettiner Haff	H2	Fluss	Greifer	11.97	Tor IV
Stettiner Haff	H3	Fluss	Greifer	11.97	Tor II

Tab. 3.4 Probenahmeorte der Oder (F) und ihrer Nebenflüsse (N) 1997

Ort (Nebenfluss)	Bezeichnung	Art	Probenahme	Datum	Zusatz
Bogdaszowice (Strzegomka)	N2	Fluss	Teleskop	05.98	Police Tor I
Brzeg Dolny	F5	Fluss	Teleskop	05.98	
Slubice	F10	Fluss	Teleskop	05.98	
Roztoka Odranska	H1	Fluss	Greifer	05.98	
Stettiner Haff	H4	Fluss	Greifer	05.98	
Raciborz	F2	Fluss	Teleskop	06.99	Malczyce Police Tor I
Bogdaszowice (Strzegomka)	N2	Fluss	Teleskop	06.99	
Brzeg Dolny	F5	Fluss	Teleskop	06.99	
Scinawa	F6	Fluss	Teleskop	06.99	
Swierkocin (Warta)	N3	Fluss	Teleskop	06.99	
Roztoka Odranska	H1	Fluss	Greifer	06.99	Police
Stettiner Haff	H4	Fluss	Greifer	06.99	Tor I

Tab. 3.5 Probenahmeorte der Oder (F) und ihrer Nebenflüsse (N) 1998 und 1999

3.6 Übersicht ausgewählter identifizierter Sedimentinhaltsstoffe

Die Beprobungen der Kampagne 1997 erfolgten im August ausgehend von der tschechischen Grenze bis Czelin und im November von Friedrichsthal bis in das Stettiner Haff. Probenbezeichnungen und Daten sind den Tabellen 3.4 und 3.5 zu entnehmen. Die nach der Aufarbeitung (siehe Abschnitt 3.4) erhaltenen Extrakte wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch zur Identifizierung von Sedimentinhaltsstoffen untersucht. Die vollständigen Analyseergebnisse spiegeln sich in den Tabellen 3.9 bis 3.12 (Anhang A, Seite 177) wieder.

3.6.1 Substanzen biogenen Ursprungs

Substanzen biogenen Ursprungs, wie aliphatische Carbonsäuren, Alkane und terpenoide Verbindungen (zumeist Abbauprodukte des Phytols und der Abietinsäure) wurden 1997 erstmals unterhalb der Stadt Raciborz (polnische Oder-Kilometrierung km 50) gefunden, steroidale Verbindungen sind weiter stromabwärts ab Opole (km 100) nachweisbar.

3.6.1.1 Aliphatische Carbonsäuren

Unverzweigte aliphatische Carbonsäuren sind typisch für die beprobten Sedimente mit hohem organischem Anteil. Die beobachtete bimodale Verteilung zwischen geradzahligen und ungeradzahligen Säuren mit einem überwiegenden Schwerpunkt bei den geradzahligen C_{16} - bis C_{18} -Säuren zeigt den starken Einfluss der Mikroorganismen (planktonischen Organismen sowie Bakterien) auf die Sedimentbeschaffenheit (Abbildung 3.9) [67]. Die längerkettigen n-Alkylcarbonsäuren (C_{20} bis C_{37}) entstammen hauptsächlich den Pflanzenwachsen des terrestrischen Detritus. Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der mikrobiellen Biomasse ist das Vorkommen von verzweigten iso- und anteiso-Carbonsäuren (im Bereich von C_{15} bis C_{18}), die durch die sedimentbewohnenden Bakterien produziert werden. Ein hoher Anteil dieser Säuren zeigt eine starke mikrobielle Aktivität des entsprechenden Sedimentes. Die Gehalte der iso- und anteiso-Fettsäuren variieren im Verlauf einer Proben-Kampagne und zwischen den Kampagnen der verschiedenen Jahre aufgrund schwankender Populationen in Abhängigkeit von Temperatur und Sedimentbeschaffenheit stark.

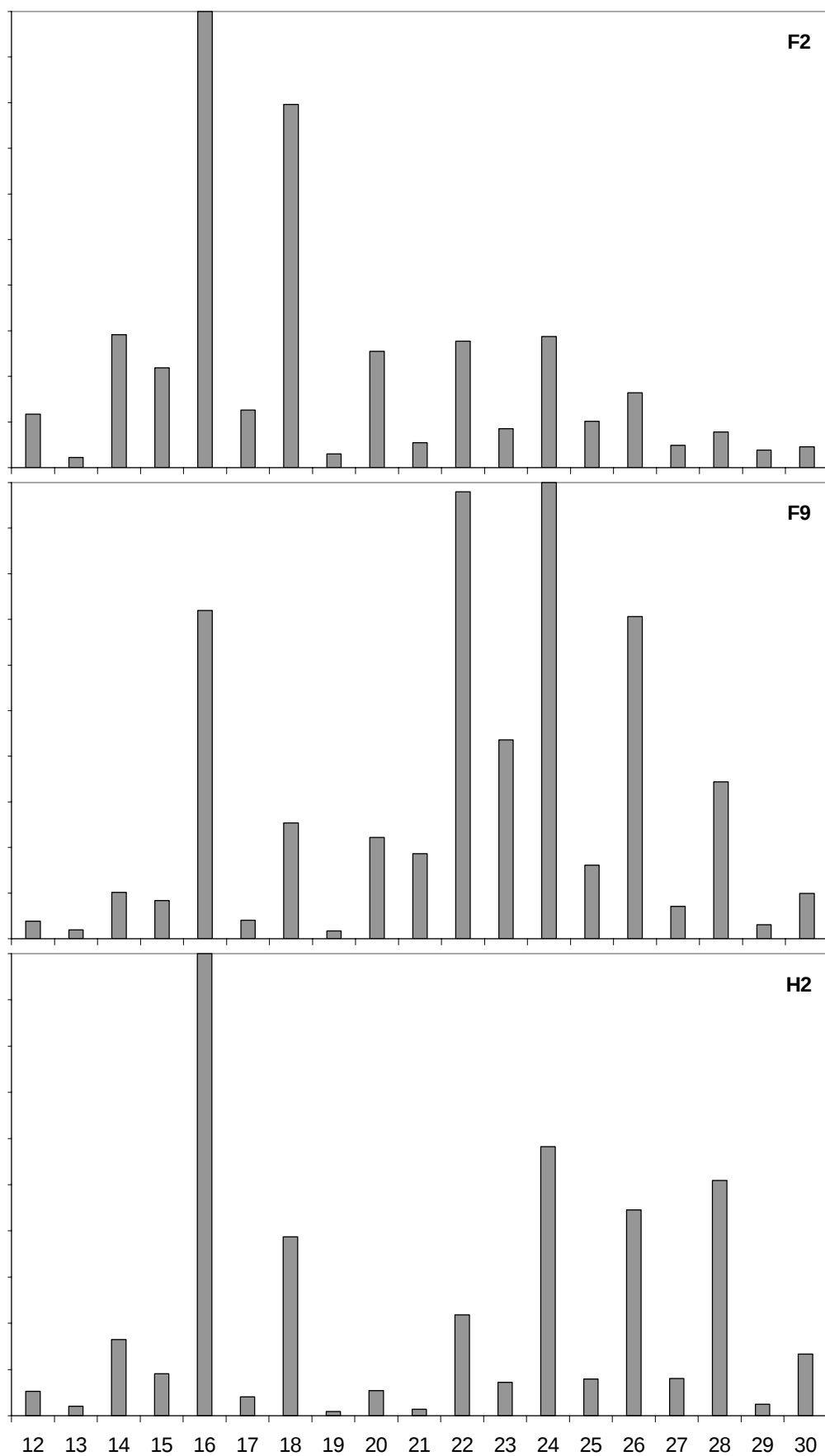


Abb. 3.9 Kettenlängenverteilung der n-Alkylcarbonsäuren (C_{12} - C_{30}) in den Sedimenten F2 (Raciborz), F9 (Urad) und H2 (Stettiner Haff, Tor IV)

3.6.1.2 n-Alkane

Auch die Verteilung der n-Alkane (Abbildung 3.10) zeigt mit dem lokalen Maximum bei C_{17} im kürzerkettigen Bereich als Indikator für autochtones Material von Algen und Bakterien den Einfluss der mikrobiellen Biomasse.

Abbildung 3.10 zeigt drei typische Alkanverteilungen in Sedimenten des Oderlaufs. Erkennbar ist hier die ebenfalls bimodale Verteilung der n-Alkane mit Schwerpunkten bei C_{17} (Algen und Bakterien) und C_{27} - C_{31} (Cuticula höherer Landpflanzen). Während am Probenahmeort Urad (F9) der Einfluss des terrestrischen Detritus vorherrscht, ist im Stettiner Haff (H2) eine stärkere mikrobielle Aktivität festzustellen. Das in Raciborz 1997 entnommene Sediment (F2) zeigt ein auffällig verändertes Pattern: Zu der bimodalen Ausprägung durch pflanzlichen und mikrobiellen Einfluss gesellt sich eine gleichförmige Verteilung von kürzerkettigen n-Alkanen. Hierbei handelt es sich offensichtlich um eine anthropogene Verschmutzung durch Mineralölprodukte. Für die gesamte Probenkampagne 1997 sind solche anthropogenen Einträge lokal zu beobachten (F2, F4, F5, F8, F12), wobei bei der Suche nach Emissionsquellen zu beachten ist, dass es sich um einmalige lokale Einträge durch die Überflutung 1997 handeln kann.

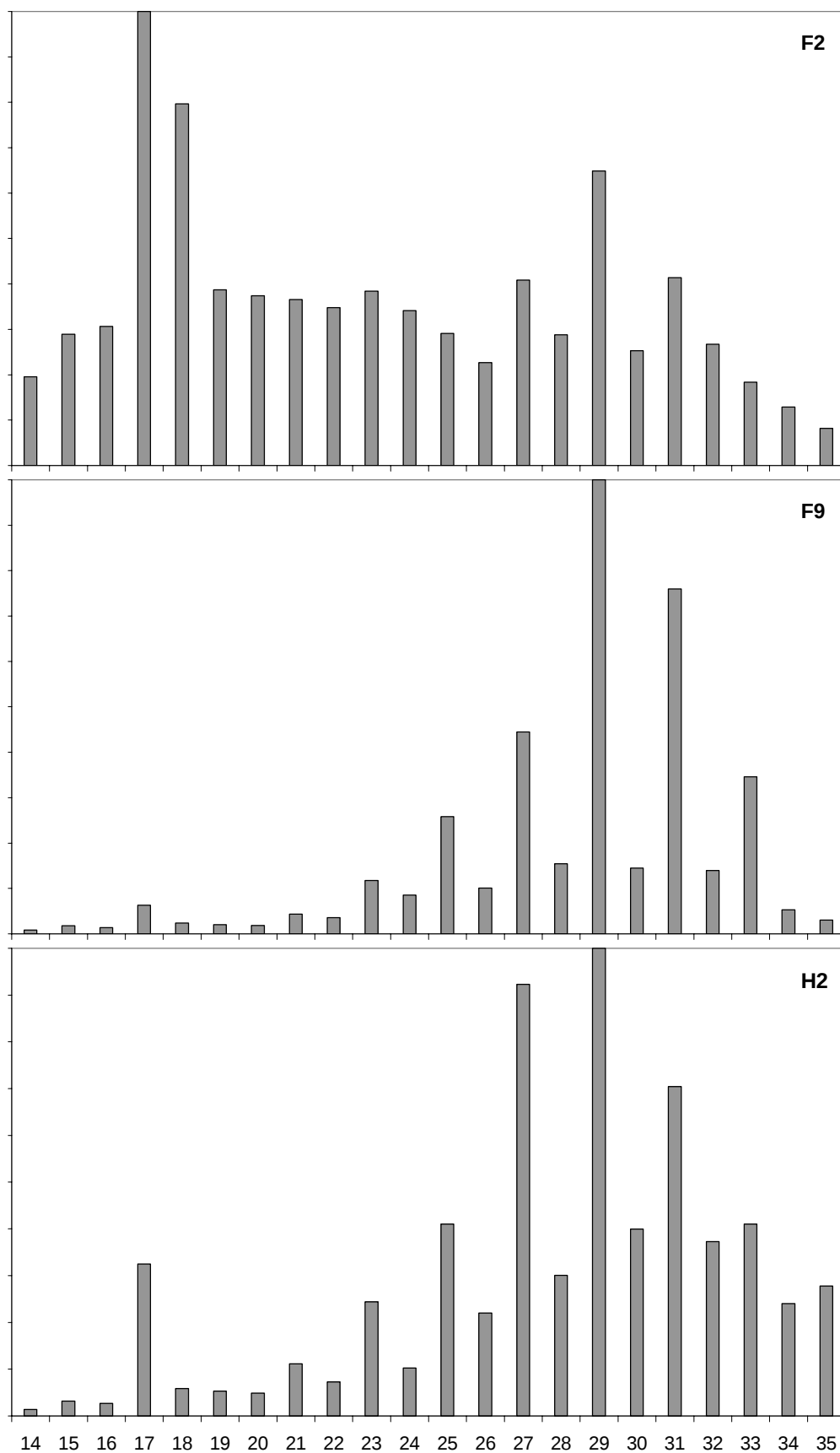


Abb. 3.10 Kettenlängenverteilung der n-Alkane (C_{14} - C_{35}) in den Sedimenten F2 (Raciborz), F9 (Urad) und H2 (Stettiner Haff, Tor IV)

3.6.1.3 Terpenoide Verbindungen

Ein anthropogener Anteil des Eintrags ist auch bei den meist als Hauptkomponenten nachgewiesenen terpenoiden Verbindungen aus dem Kontext des Harzsäuren-Abbaus (Abietinsäure **7**, Dehydroabietinsäure **8**, Tetrahydroabietinsäure **9**, Dehydroabietin **10**, Tetrahydroreten **11**, Reten **12**, Dehydroabietan **13**) wahrscheinlich. Abietinsäure **7** ist Bestandteil der Baumharze und Hauptbestandteil des hieraus industriell gewonnenen Kolophoniums. Das in der Holz- und Papierverarbeitung aber auch zur Gummierstellung großtechnisch verwandte Kolophonium wird hierfür zu Harzseifen und weiteren Hilfsprodukten verarbeitet. Die nötige chemische Aufbereitung des Harzes (thermische, katalytische Disproportionierung) liefert ein Produkt, das reich an Dehydroabietinsäure **8** ist. Die Dehydroabietinsäure ist im gesamten Verlauf der Oder 1997 der prominenteste Vertreter der cyclischen Diterpene, mit Schwerpunkten an den Orten F8, F10, F12, F15 und F16.

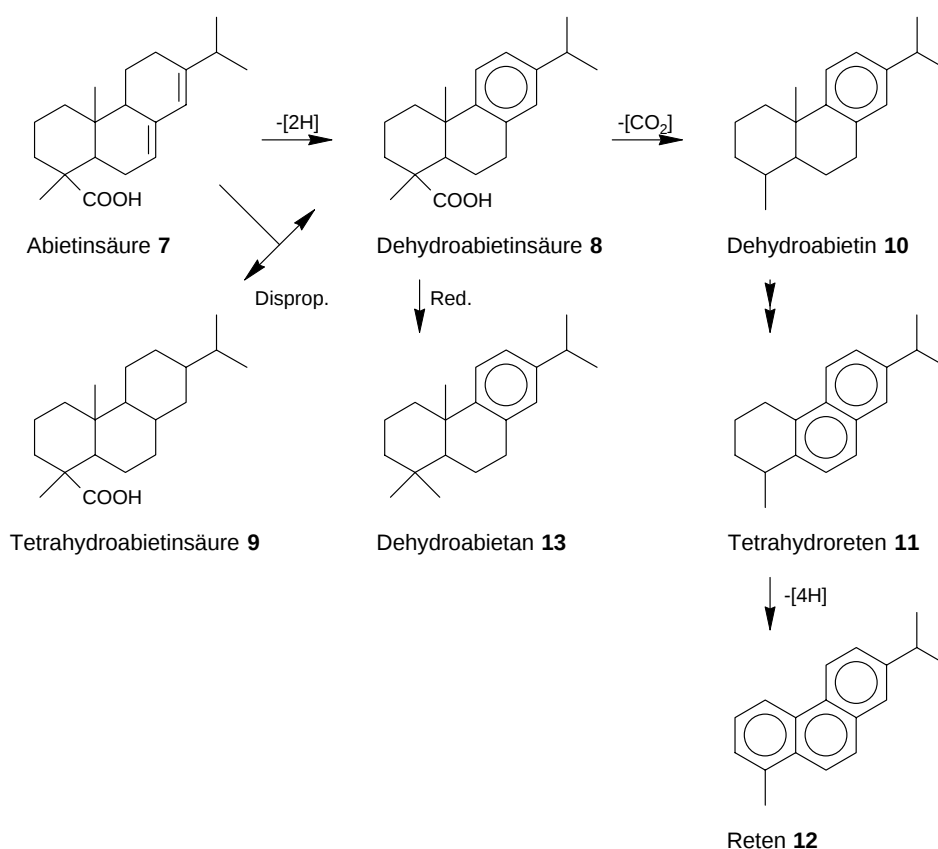


Abb. 3.11 Diagenese von Abietinsäure **7**

Die in allen Sedimenten angetroffenen acyclischen Terpene Pristan **14**, Phyten **15**, Phytan **16** und Phytadien entstammen der Diagenese des Phytols **17**, das als Seitenkettenalkohol des Chlorophylls in allen photosynthetisierenden Organismen vorkommt. Die nachgewiesenen Diagenese-Produkte Pristan und Phytan zeigen, dass während Sedimentation und Lagerung sowohl aerobe wie anaerobe Prozesse stattfinden. Nach der Freisetzung durch Hydrolyse sind unter oxischen Bedingungen Phytensäure **18**, Phytansäure **19** und Pristan **14** fassbar, während bei reduzierenden Bedingungen Dihydrophytol **20**, Phyten **15** und Phytan **16** gebildet werden (siehe Abbildung 3.12).

Die Betrachtung des Mengenverhältnisses Pristan/Phytan lässt somit eine Abschätzung der Sauerstoffverhältnisse im jeweiligen Sediment zu. Die in der Ode meist gefundene leichte Präferenz von Pristan (Abbildung 3.13) ist bei Oberflächensedimenten eines fließenden Gewässers zu erwarten, da diese naturgemäß vermehrt oxischen Bedingungen ausgesetzt sind.

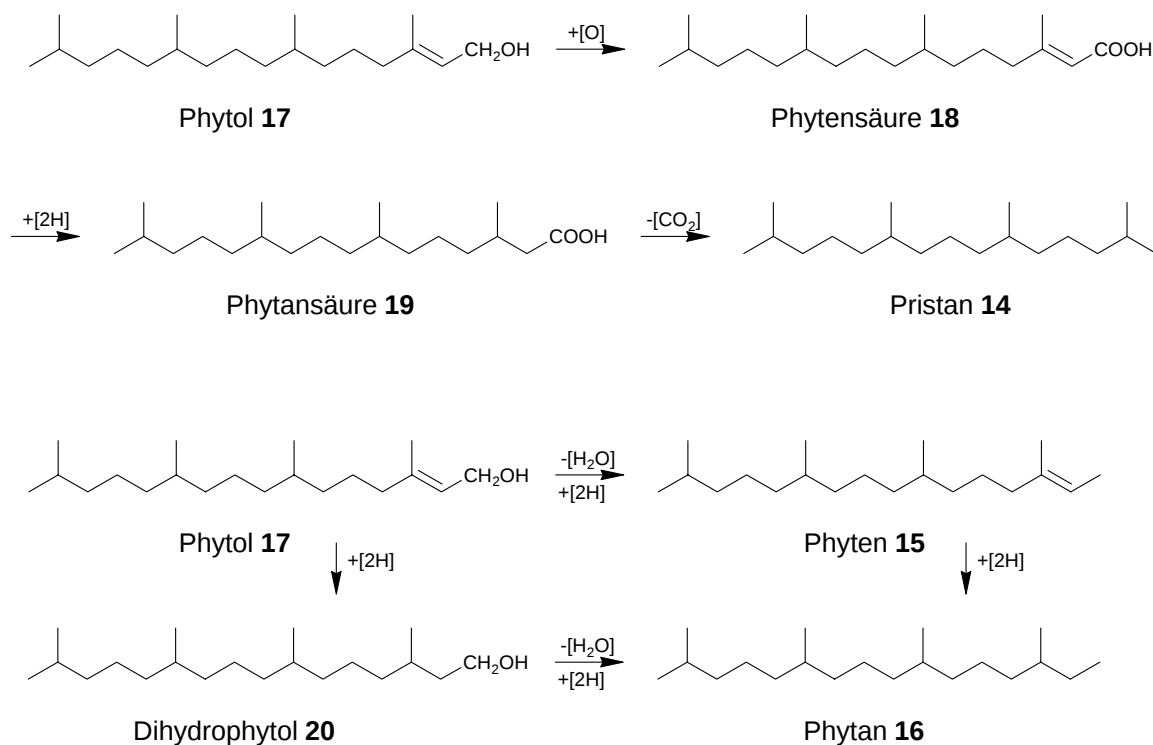


Abb. 3.12 Diagenese von Phytol **17** unter oxidierenden (oben) und reduzierenden (unten) Bedingungen

Sowohl im Hafen von Szczecin als auch im Stettiner Haff gibt das Verhältnis Pristan/Phytan aber einen Hinweis auf anaerobe Bedingungen in den Sedimenten. Allgemein weist das Stettiner Haff durchweg poly- bis hypertrophe Wasserverhältnisse auf, so dass in den Sommermonaten die Sauerstoff-Sättigung unterhalb 1 m Wassertiefe gegen Null Prozent absinkt [68, 69]. Im Jahr 1997, zum Zeitpunkt der ersten Probenkampagne, waren die Sauerstoffverhältnisse, bedingt durch den heißen Sommer, mit Werten deutlich unterhalb 4 mg/l Sauerstoffgehalt als kritisch einzustufen [3]. Überwiegend anaerobe Bedingungen sind daher für die beprobten Sedimente des Stettiner Haffs anzunehmen.

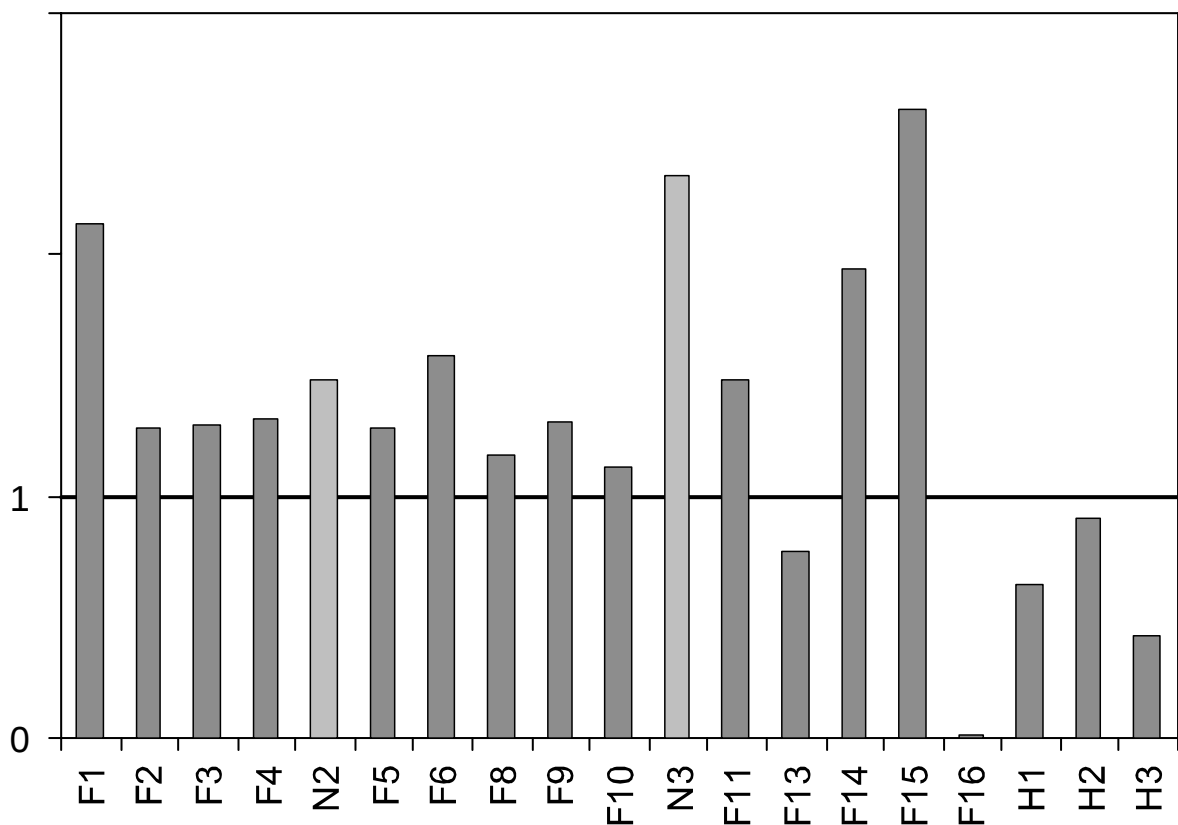


Abb. 3.13 Verhältnis Pristan:Phytan in Sedimenten der Oder 1997

3.6.2 Substanzen anthropogenen Ursprungs

Die Untersuchungen zu Substanzen biogenen Ursprungs haben bereits teilweise anthropogene Einflüsse aufgezeigt. Anthropogene Einträge können diffus erfolgen, wie bei Einträgen aus Landwirtschaft und Verkehr, oder Punktquellen zugeordnet werden, wie geklärten und ungeklärten kommunalen und industriellen Abwässern.

Siedlungszentren und ausgedehnte Industrieanlagen, z.B. Häfen, besitzen sowohl diffuse als auch lokalisierte Quellen anthropogener Belastungen.

Kommunale und industrielle Emissionen unterscheiden sich durch Art, Vielfältigkeit und Menge des Eintrages. Kommunale Abwässer enthalten ein meist kontinuierlich eingetragenes, der derzeitigen Verwendung von Inhaltsstoffen täglicher Verbrauchs- und Bedarfsgüter entsprechendes Spektrum an chemischen Substanzen. Variationen erfolgen je nach Grad und Art der Behandlung der Abwässer. Industrielle Einträge sind oft orts-spezifisch und stark abhängig von Art und Größe des Betriebes. Verkehr ist ein eigenständiger diffuser Faktor, der meist ein einheitliches Bild der Art der Belastung zeigt.

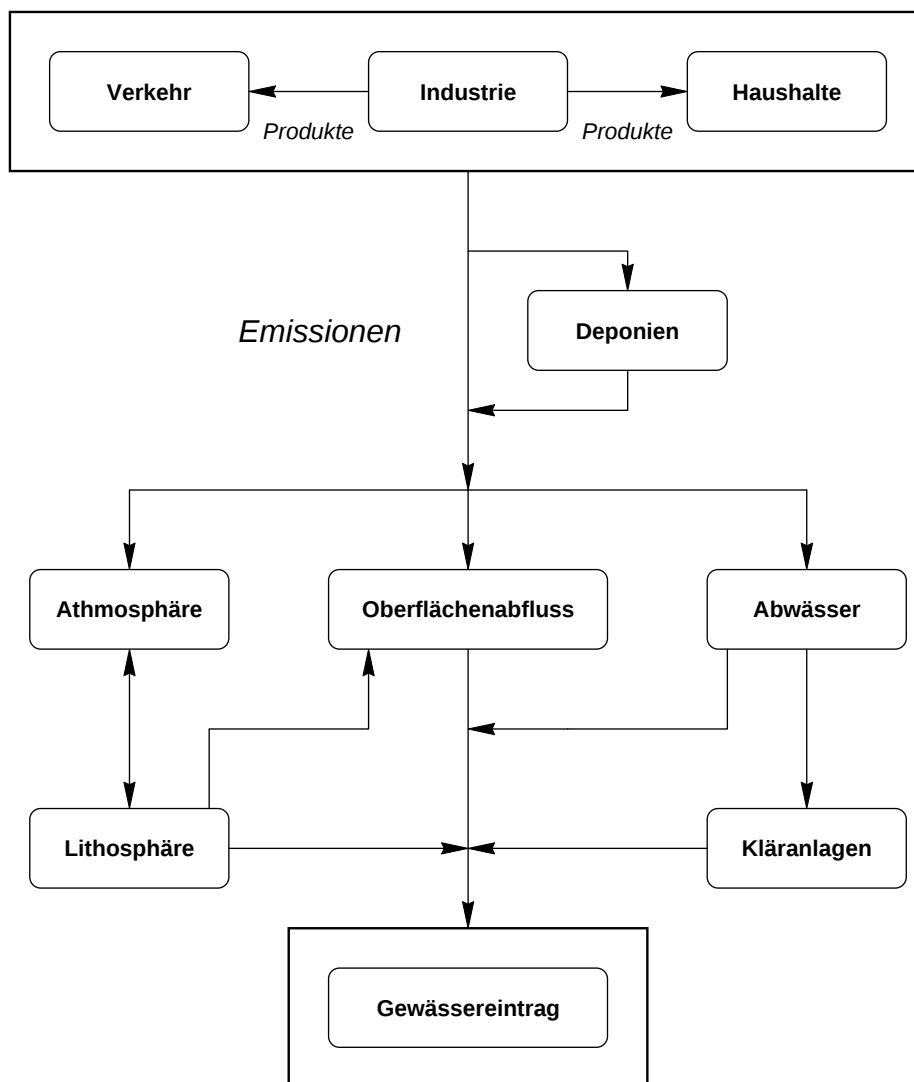


Abb. 3.14 Pfade anthropogener Einträge in Fließgewässer

3.6.2.1 Fäkalsteroide

Der Begriff Fäkalsteroid beschreibt C₂₇-, C₂₈- und C₂₉-Cholestan-basierte Steroide, die in Faeces von Säugetieren gefunden werden. Zu diesen zählen unter anderem Koprostanol, Sitosterol, Sitostanol und Campestanol. Koprostanol (5 β -Cholestan-3 β -ol) **22** wird im menschlichen Körper (Darm) durch bakterielle Hydrierung aus Cholesterin **21** gebildet, obwohl das Epimer 5 α -Cholestan-3 β -ol **23** das thermodynamisch bevorzugte Produkt ist. Mit Ausnahme von wenigen höheren Säugetieren können die anaeroben Bakterien in anderen Tieren keine Sterole biohydrogenieren oder es entstehen Stanole anderer Struktur als 5/3- β . Der Eintrag kommunaler Abwässer lässt sich daher anhand des Verhältnisses Koprostanol / 5 α -Cholestan-3 β -ol verfolgen, da 5 α -Cholestan-3 β -ol autochtonen und Koprostanol überwiegend allochtonen Quellen entstammt.

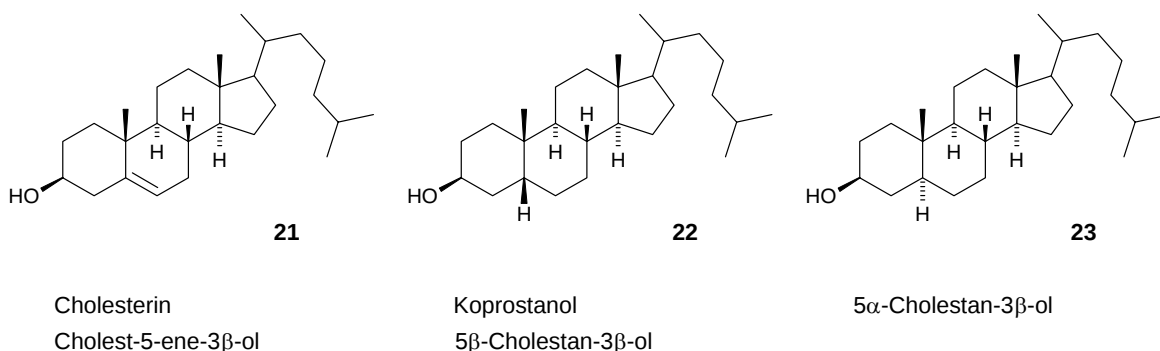


Abb. 3.15 Fäkalsteroide

Hierbei bestimmen 1997 lokale Einträge die Belastungssituation der Odersedimente, hervorzuheben sind die Nebenflüsse Nysa Klodzka und Warta, sowie die Stadt Wroclaw. Für Wroclaw (F4) zeigt das (maximal aufgefundene) Verhältnis Koprostanol zu 5α -Cholestan- 3β -ol von 8:1 eine starke Belastung durch kommunale Abwässer. Der niedrigste Wert mit 1:10 wurde am Probenahmeort F8 (Polecko) bestimmt. Allgemein korrespondieren die Werte mit der Populationsdichte im Wassereinzugsgebiet. Abbildung 3.16 zeigt die Siedlungszentren im beprobten Gebiet.

Kommunalen Abwässern entstammen auch weitere häufig auftretende anthropogene Substanzen. Typisch sind hier die Abbauprodukte der aktiven Komponenten von Wasch und Reinigungsmitteln und weitere Zusätze dieser Formulierungen.

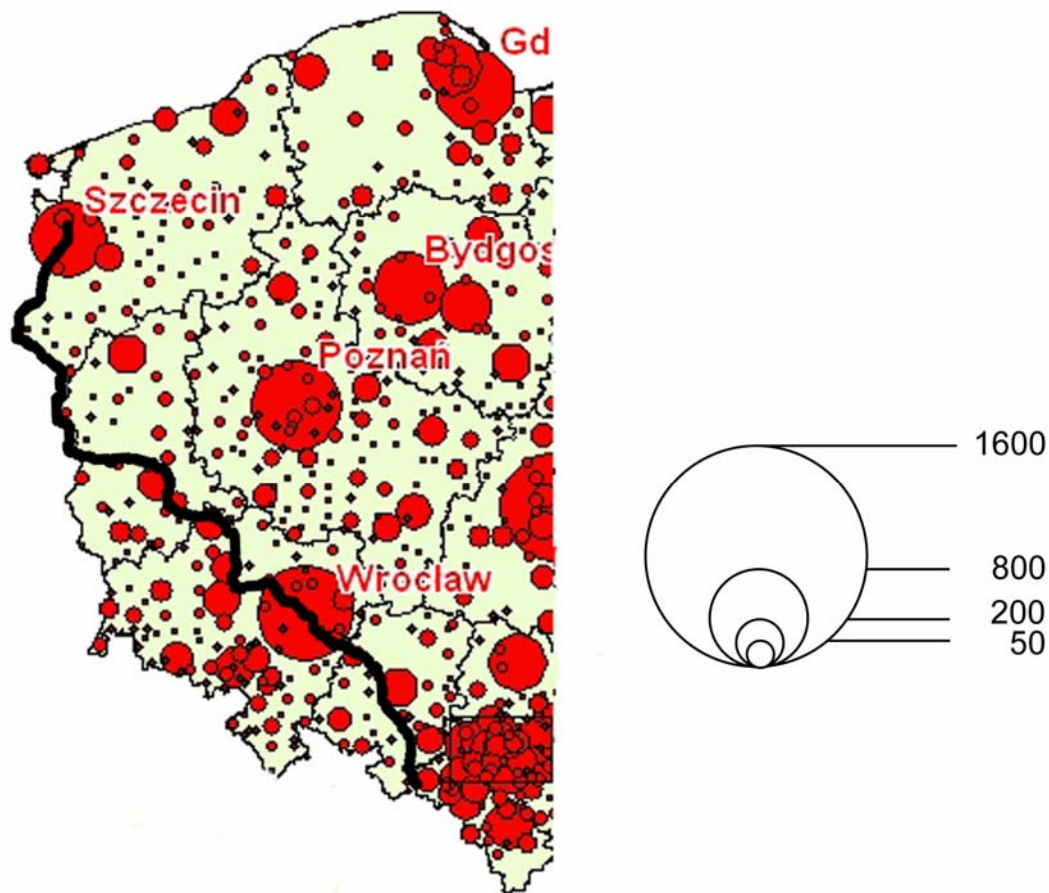


Abb. 3.16 Siedlungszentren im Wassereinzugsgebiet der Oder (in Tsd. Einwohnern)

3.6.2.2 Oberflächenaktive Substanzen

Tenside sind als grenzflächenaktive organische Verbindungen wichtige Hilfsmittel in der Textilveredlung und kommen in nahezu allen Wasch-, Reinigungs- und Spülmitteln des industriellen und häuslichen Gebrauchs vor. Oberflächenaktive Substanzen gehören zu den meist produzierten Chemikalien weltweit. Hauptkomponenten waschaktiver Substanzen sind meist anionische Tenside. Zu dieser Gruppe gehören die Seifen und die linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS). Nichtionische Tenside werden in Waschmitteln eingesetzt, da sie bei geringerer Schaumbildung und niedrigeren Temperaturen gute Reinigungserfolge erzielen und z.B. die Waschvergrauung bei Textilien verhindern. Zu dieser Gruppe gehören die Alkylphenoethoxylate (APEO) und Alkylpolyglucoside, die verstärkt in Universalwasch- und Reinigungsmitteln verwendet werden.

Alkylphenol(poly)ethoxylate und Alkylphenole

Erhöhte Aufmerksamkeit haben aufgrund ihrer physiologischen („östrogenen“) Wirkung und ihres Verbleibens in der Umwelt die Alkylphenolpolyethoxylate erhalten. Sie gehören mit ca. 500 000 t/a zu den meist produzierten Chemikalien der Welt. Neben der Verwendung als Detergentien finden sie Einsatz in Farben, Pestizid-Formulierungen, bei Textilschutz und -verarbeitung, zur Tertiärförderung von Erdöl („chemisches Fluten“, „extended oil recovery“), in der Metallverarbeitung sowie in Mitteln der Körperpflege und in Kunststoffen [70]. Lange galten die Alkylphenoethoxylate als „biologisch abbaubar“ und toxikologisch unbedenklich. Doch Untersuchungen in den 1980er Jahren zeigten, dass Abbauprodukte der APEO, vornehmlich Alkylphenole (AP), stärker toxisch für aquatische Organismen sind als die intakten Vorläufer [71, 72]. Untersuchungen in den folgenden Jahren haben vermehrt Fragen in Bezug auf Toxizität, Bioakkumulation und Persistenz aufgeworfen. Hinweise auf östrogenes Verhalten der Abbauprodukte verstärkten das Interesse an den Wirkungen dieser Stoffgruppe auf die Umwelt und menschliche Gesundheit [73].

Bereits 1986 verzichteten die Schweiz und Deutschland auf den Verbrauch in Waschmitteln, 1995 folgte ein freiwilliger Bann in Haushaltsreinigern, dem seit dem Jahr 2000 das Auslaufen der Verwendung in der Produktion von industriellen Reinigern in der Europäischen Union EU folgte. Alkylphenole finden sich auf weiteren „lists of undesirable substances“ staatlicher Umweltbehörden, wie der US-EPA, der dänischen EPA und der Norwegian Pollution Control Authority (SFT). Ihr vollständiger Ersatz wird innerhalb der EU angestrebt; derzeit gilt ein Anwendungsverbot von Zubereitungen mit mehr als 0.1 % Massengehalt für chemische Reinigungen, in Haushaltsreinigern, zur Herstellung von Zellstoff und Papier und als Bestandteil kosmetischer Mittel, mit Ausnahme als Spermizid. In geschlossenen System dürfen APEO und AP zur Textil- und Lederverarbeitung, zur Reinigung gewerblicher Anlagen, zum Entfetten von Tierhäuten, zur biologischen Abwasserbehandlung, zur Metallbearbeitung und Metallverarbeitung und als Formulierungshilfsstoff in Pflanzenschutzmitteln und Bioziden benutzt werden, solange Abwässer bzw. Abfälle recycelt oder verbrannt werden [74].

Alkylphenolpolyethoxylate **24** werden aus einem verzweigten Alkylphenol durch Reaktion mit Ethylenoxid hergestellt, hierbei erhält man eine Kette von Ethoxylat-Einheiten:

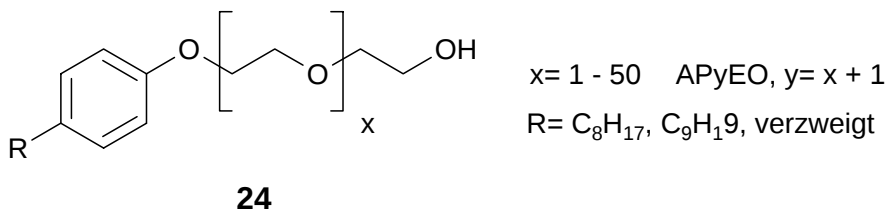


Abb. 3.17 Alkylphenolpolyethoxylate

Überwiegend werden als Alkylphenolkomponente Nonyl- (80%, NP) und Octylphenole (<20%, OP) eingesetzt. Die Länge der Ethoxylat-Kette variiert je nach Verwendung zwischen 1 bis 50 Ethoxylat-Einheiten, wobei bei Reinigern eine Verteilung mit Maxima bei 9-10 Einheiten Verwendung findet. Die Nonylgruppe selbst wird aus Propyleneinheiten aufgebaut, wobei ein verzweigtes Produkt entsteht, das seinerseits in einer Friedel-Crafts-Reaktion mit Phenol zu Nonylphenolen umgesetzt wird. Nonylphenole werden darüber hinaus als Antioxidationsmittel bzw. Stabilisatoren in Kunststoffen verwendet, hier als Phosphite oder Barium- bzw. Cadmium-Salze [75]. Ein kommerzielles Nonylphenolgemisch besteht typischerweise aus 3-6% *o*-Nonylphenol, 90-93% *p*-Nonylphenol und 2-5% Decylphenol [76, 77].

Der Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten **24** erfolgt bakteriell nach dem in Abbildung 3.18 beschriebenen Mechanismus [78, 79]. Der weitere Abbau der Alkylphenole **25** durch Ringspaltung und Oxidation der Alkylkette wird unter aeroben Bedingungen beobachtet. Nonylphenole werden im Gegensatz zu ihren Ethoxylaten auch photochemisch abgebaut [80].

Haupteintragspfad der APEO und AP sind häusliche und industrielle Abwässer. In Studien an Kläranlagen konnte gezeigt werden, dass weniger als 40% der eingetragenen Menge an APEO einem vollständigen Abbau unterliegen, 40-45% fanden sich nach Klärung im Abfluss der Anlagen während 20% mit dem Klärschlamm zurückblieben [81-84]. Die ihnen zugeschriebene „biologische Abbaubarkeit“ von über 90% betrachtet jedoch nur den Verlust an Oberflächenaktivität und berücksichtigt keine Metabolisierung.

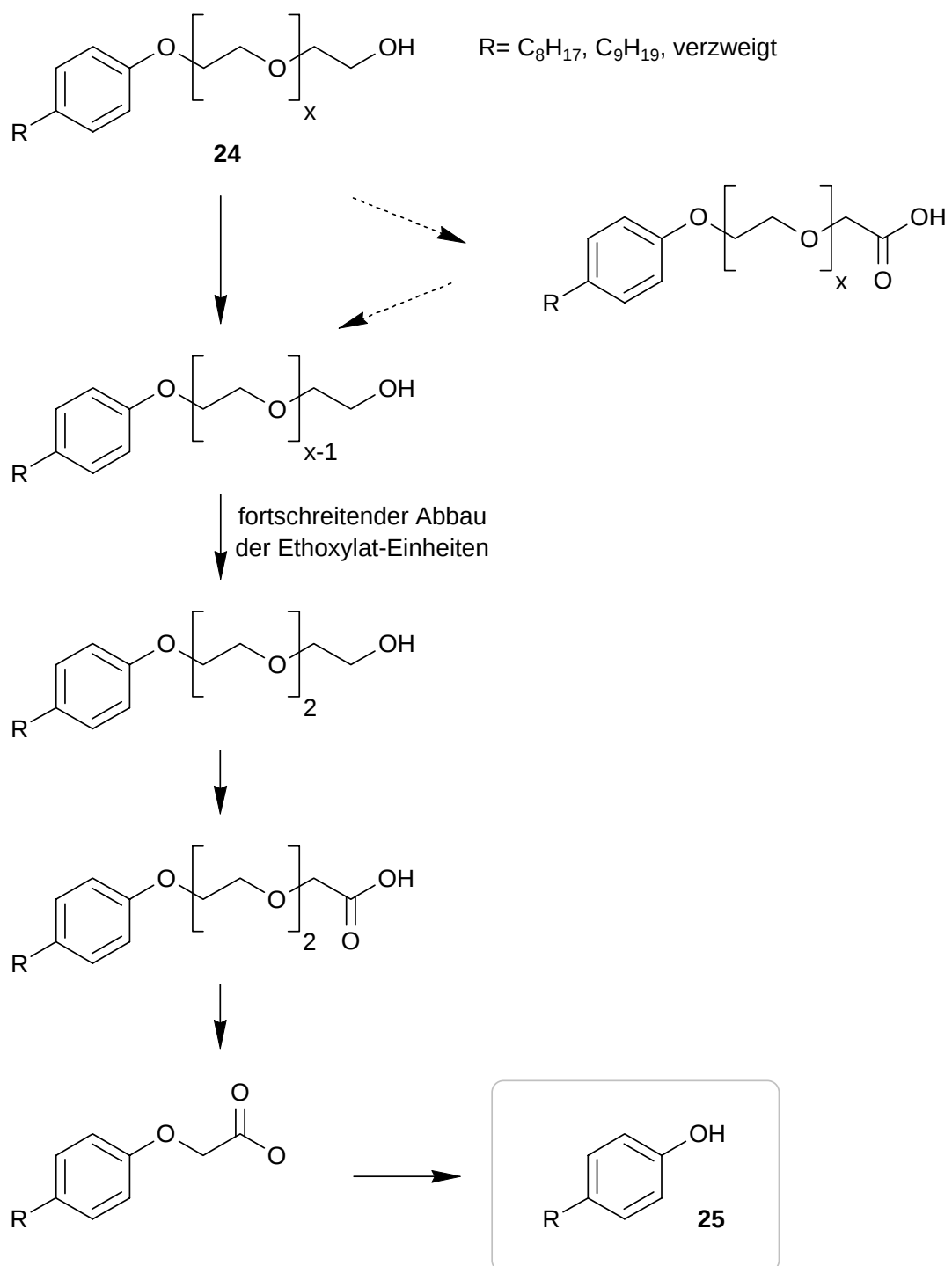


Abb. 3.18 bakterieller Abbau von Alkylphenolpolyethoxylaten

Als Metabolite von Nonylphenoethoxylaten (NPEO) finden sich im Klärschlamm 95% Nonylphenole und 5% Nonylphenolmonoethoxylat (NP1EO) plus

Nonylphenoldiethoxylat (NP2EO). Im Abfluss finden sich 48% Nonylphenolmono- und -diethoxylatcarbonsäuren (NP1EC und NP2EC), 26% Nonylphenolmono- und -diethoxylate (NP1EO und NP2EO), 20% Ethoxylate mit mehr als 2 Ethoxylat-Einheiten und 8% Nonylphenole (NP). Ein Eintrag von APEO und ihrer Metabolite in die abfließenden Gewässer ist somit zu erwarten.

Alkylphenole als Metabolite der APEO sind toxischer als ihre Vorläufersubstanzen, ihre Toxizität verstärkt sich mit der Größe der Alkylkette. Für die Nonylphenolethoxylate ist der LC50-Wert bei Lachsen 2.7 mg/l, für das kommerzielle Gemisch der Nonylphenole ist er bedeutend geringer bei 0.13-0.19 mg/l. Bei Daphnien beträgt der Wert 1.5 mg/l für die Ethoxylate und 0.18 mg/l für die Nonylphenole [75]. Zentrale Bedeutung für die Einschätzung als umweltkritisches Material besitzt die aufgefundene endokrine Wirksamkeit dieser Substanzklassen. Obwohl schon bei Vergleichen mit steroiden Östrogenen in den 1930er Jahren entdeckt [85], blieb diese Wirkung lange in Bezug auf Umwelt- und Gesundheitsgefahren unbeachtet. Dies änderte sich erst 1991, als bei Versuchen mit Östrogen-empfindlichen Brustkrebszellkulturen eine aus Kunststoffgefäßen austretende Substanz beobachtet wurde, die Zellwucherungen verursachte [73]. Es handelte sich um p-Nonylphenole, welche Kunststoffen als Weichmacher zugesetzt werden. Viele Studien befassen sich seither mit der endokrinen Wirksamkeit der Alkylphenole, da allgemein Xenoöstrogene für negative Veränderungen des Fortpflanzungsverlaufes und das vermehrte Auftreten bestimmter Krankheiten in diesem Zusammenhang bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht werden [86]. Bei Ratten konnte solch ein endokriner Einfluss von Nonylphenolen auf Säugetiere ab einer Dosis von 650 ppm im Futter bereits nachgewiesen werden. Auswirkungen hierbei sind bei weiblichen Tieren eine Verlängerung des Geschlechtszyklus, eine Verfrühung der Fortpflanzungsbereitschaft und eine Abnahme der Größe der Eierstöcke. Bei männlichen Tieren verringerte sich die Spermindichte und Anzahl um jeweils 13%, zusätzlich erhöhte sich die Zahl missgebildeter Spermien deutlich [87]. Für aquatische Organismen scheint der Einfluss dramatischer: schon geringste Konzentrationen im Wasser (0.05 µg/l) führen bei Fischen zu verstärkter Eiablage der Weibchen und Vitellogenin-Produktion auch bei Männchen [88]. Zwar ist das östrogene Potential im Vergleich zu 17β-Östradiol für p-Nonylphenole um den Faktor $9 \cdot 10^{-6}$, für p-tert-Octylphenol $2 \cdot 10^{-4}$ und für NP2EO bzw. NP1EC $6 \cdot 10^{-6}$ kleiner, jedoch zeigen Berechnungen von Effektivdosen für verschiedene aquatische Organismen, dass Belastungen von wenigen µg/l Nonylphenolen (0.06 µg/l bei Muscheln, <25 µg/l bei Enten) für eine östrogene Beeinflussung ausreichen [75].

Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung ergaben stärkste endokrine Eigenschaften bei Vorliegen einer para-Substitution der Alkylgruppe und einer möglichst starken Verzweigung der Alkylkette bei einer Länge von 8-9 Kohlenstoffatomen [85]. Allgemein besitzen die meisten Xenoöstrogene einen phenolischen Grundkörper mit einer Substitution ausreichender Größe und entsprechender räumlicher Anordnung. Abb. 3.19 verdeutlicht die strukturellen Ähnlichkeiten eines Nonylphenol-Isomers mit Östradiol **26**.

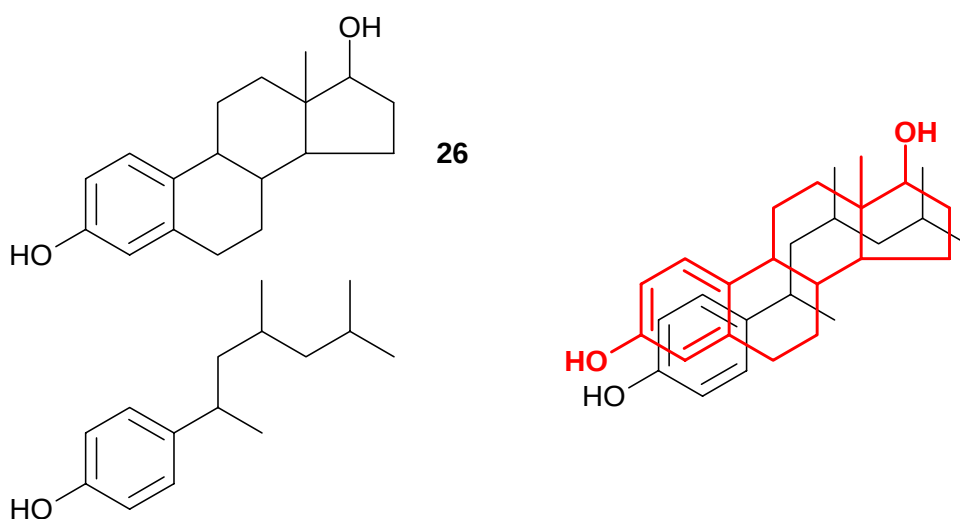


Abb. 3.19 endokrine Eigenschaften und strukturelle Ähnlichkeiten: NP und Östradiol **26**

Die Alkylphenoethoxylate, überwiegend Nonylphenoethoxylate, stellen ein komplexes Gemisch verschiedener Isomere dar. Durch die Synthese der Alkylkette aus drei Propyl-Einheiten und die anschließende Umsetzung mit Phenol entsteht eine Vielzahl von Verzweigungs- und Substitutionsmöglichkeiten, die eine einfache Analytik dieser Stoffgruppe erschweren. Die Sedimente der hier beschriebenen Probenkampagnen der Oder enthalten ein komplexes Gemisch der Metabolite der isomeren APEO.

Die Alkylphenole wurden durch Fraktionierung und Derivatisierung der polaren Fraktion mittels Acetylierung und anschließender gaschromatographisch-massenspektrometrischer Untersuchung erfasst. Die Fragmentierung von Nonylphenolen im Massenspektrometer hängt von Grad und Art der Verzweigung der Alkylkette ab und bildet kein einheitliches Schema für die gesamte Gruppe.

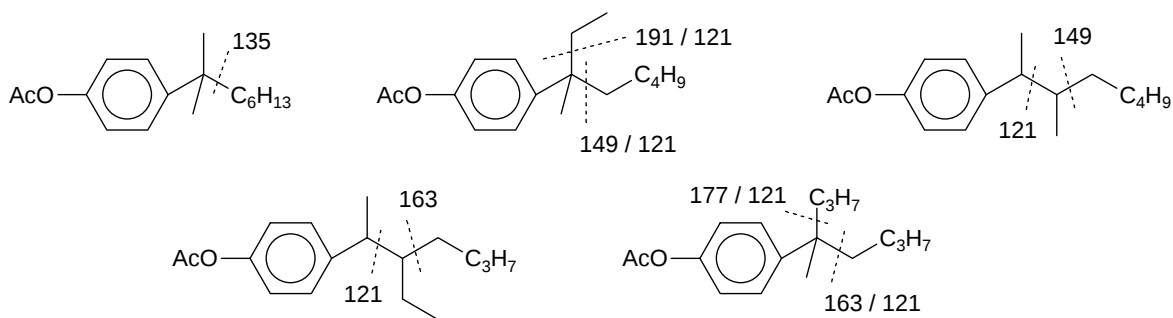


Abb. 3.20 Initiale Fragmentierungsmöglichkeiten isomerer acetylierter Nonylphenole

Von allen in Abbildung 3.20 beschriebenen Untergruppen konnten Isomere in den Sedimenten nachgewiesen werden. Eine Auswahl repräsentativer Massenspektren dieser Gruppen zeigt Abbildung 3.21.

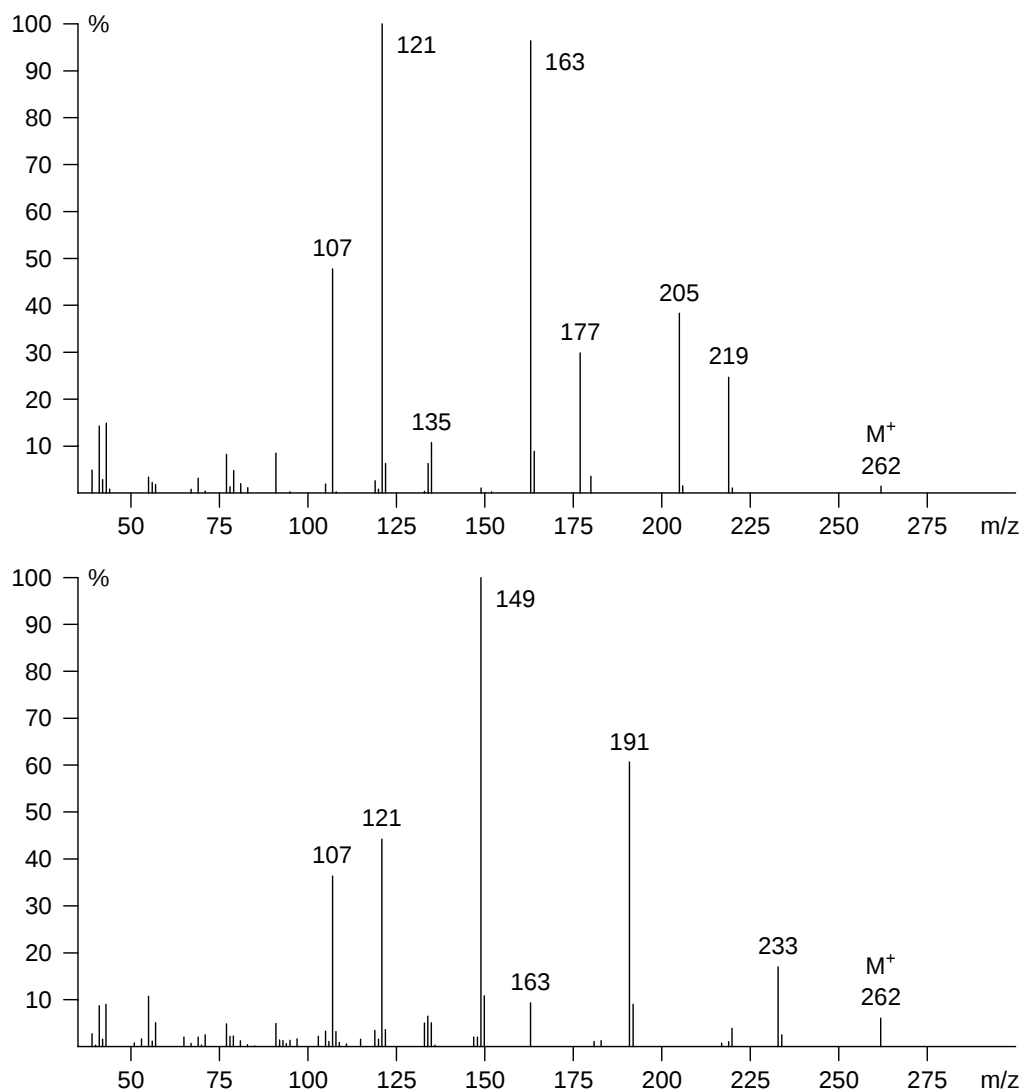


Abb. 3.21 Massenspektren (acetylierter) Nonylphenol-Isomerer aus Sediment H3

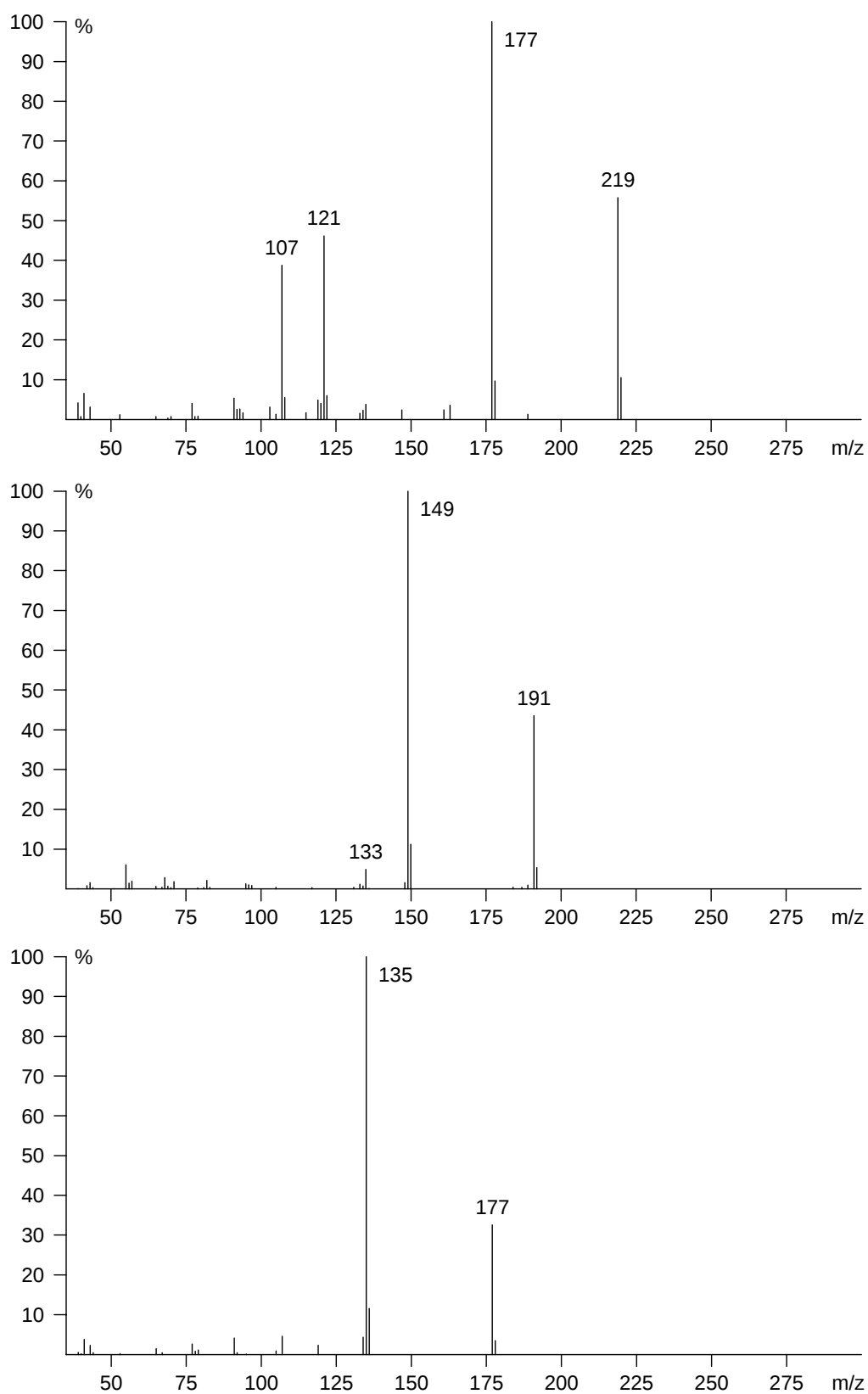


Abb. 3.21 Massenspektren (acetylierter) Nonylphenol-Isomerer aus Sediment H3

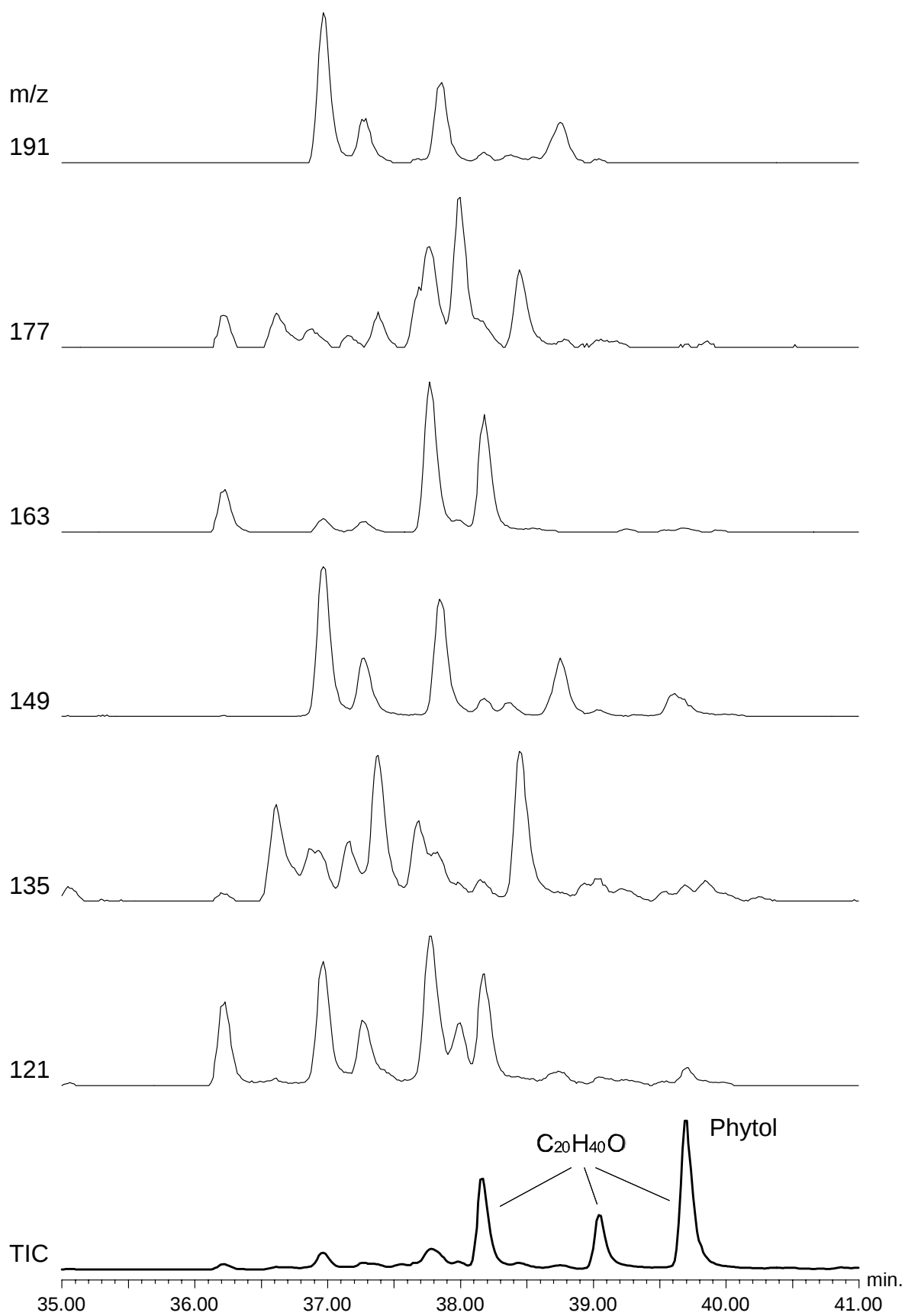


Abb. 3.22 GC/MS-Analyse, Spuren prominenter Fragment-Ionen von Nonylphenolen am Probenahmepunkt H3

Analoges gilt für die Nonylphenolmonoethoxylate (NP1EO), auch hier findet eine komplexe massenspektrometrische Fragmentierung statt.

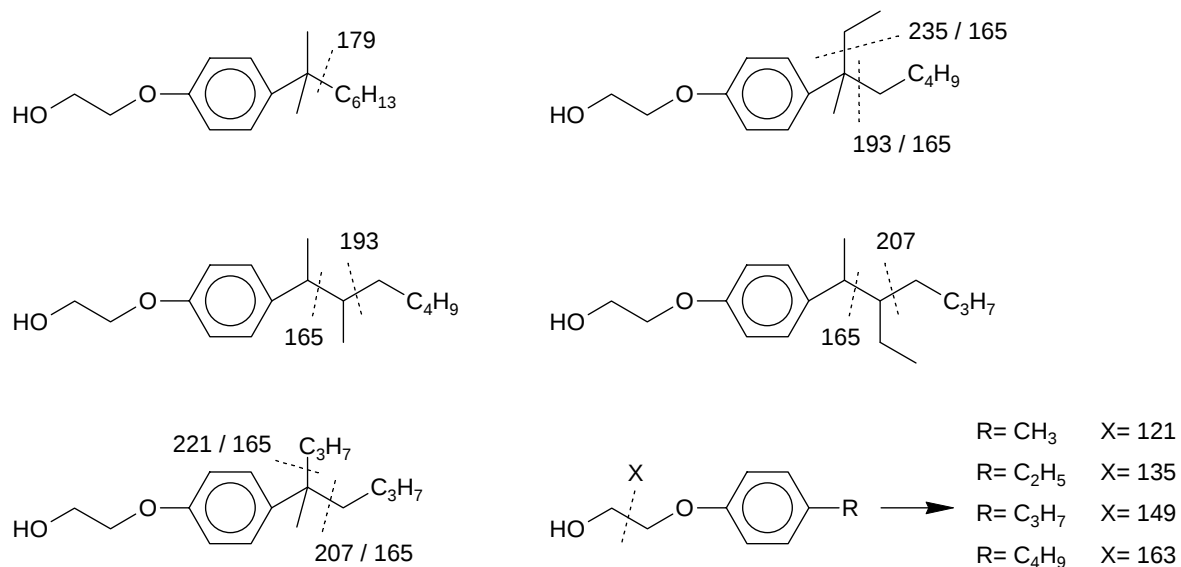


Abb. 3.23 Fragmentierungsmöglichkeiten isomerer Nonylphenolmonoethoxylate

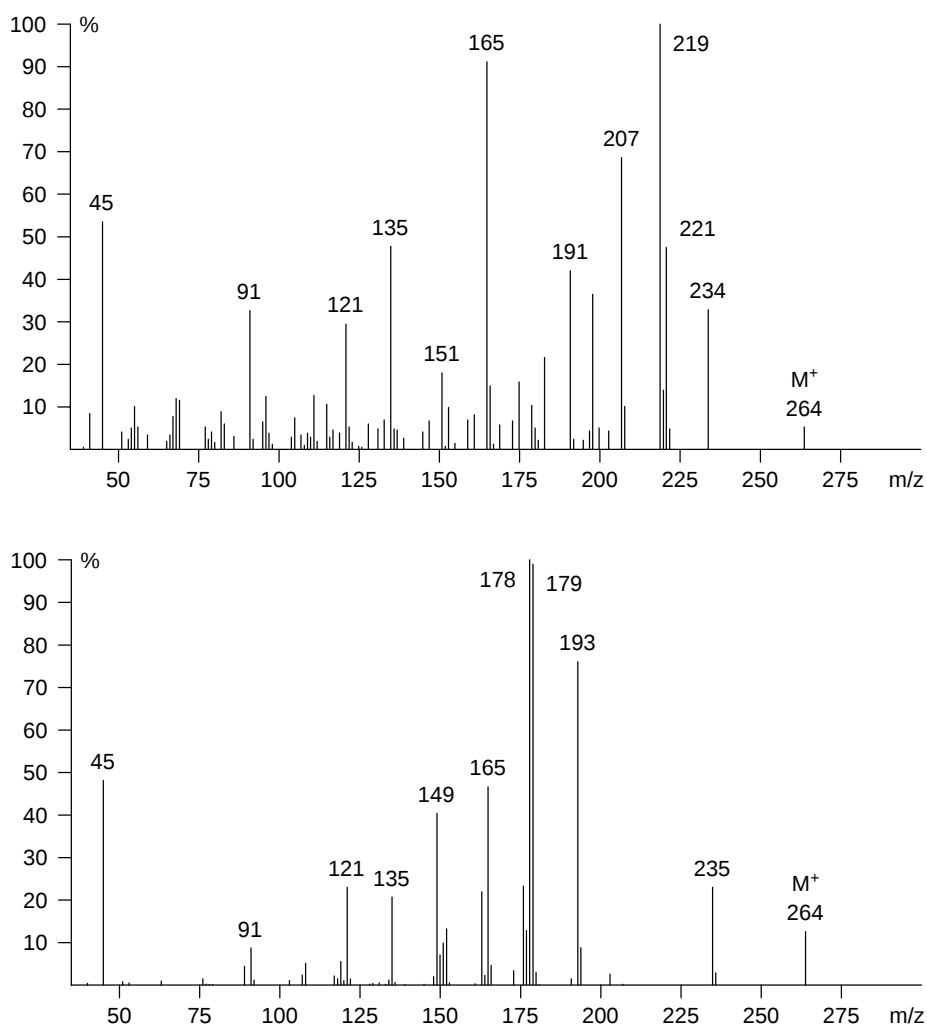


Abb. 3.24 Massenspektren von Nonylphenolmonoethoxylaten am Probenahmepunkt F2

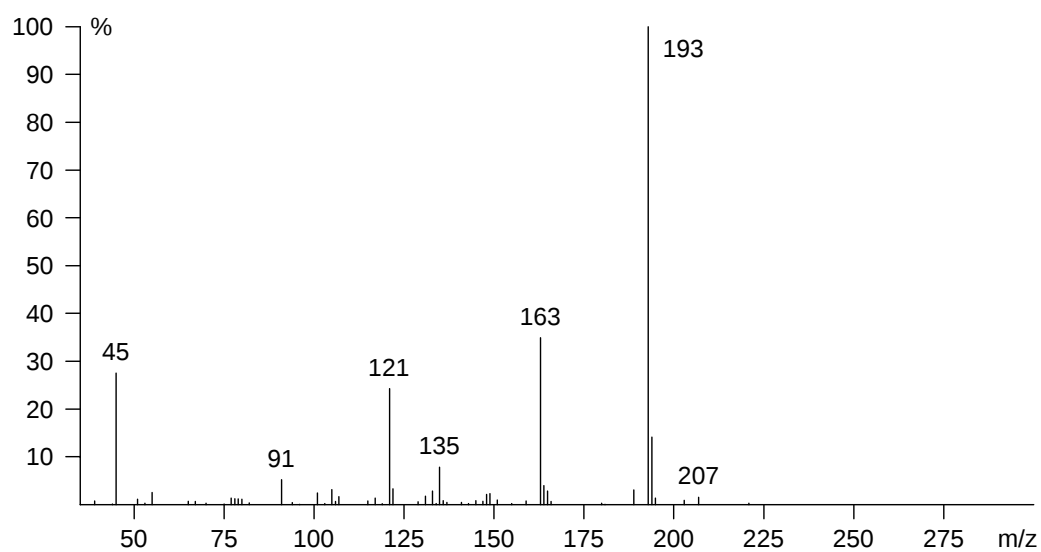
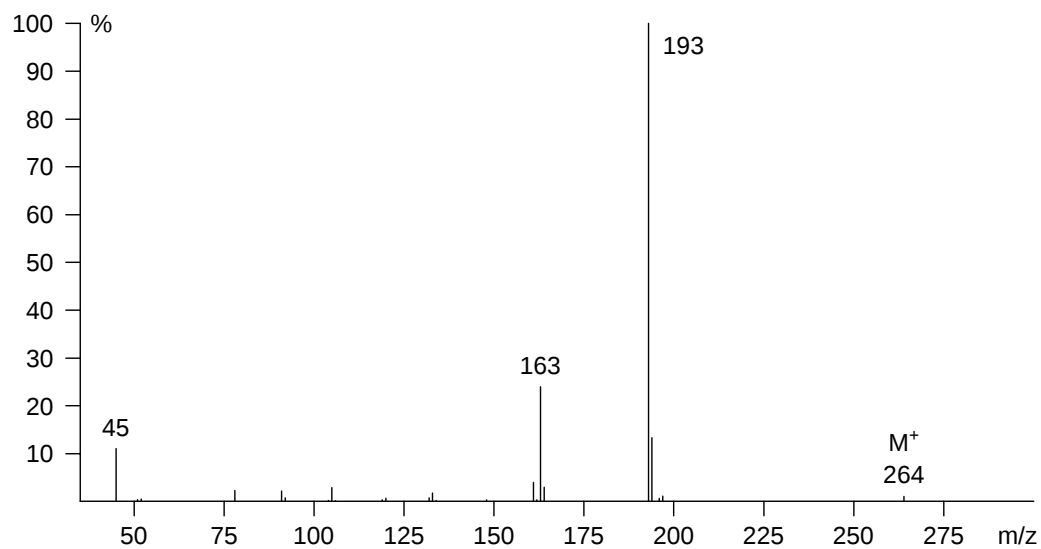
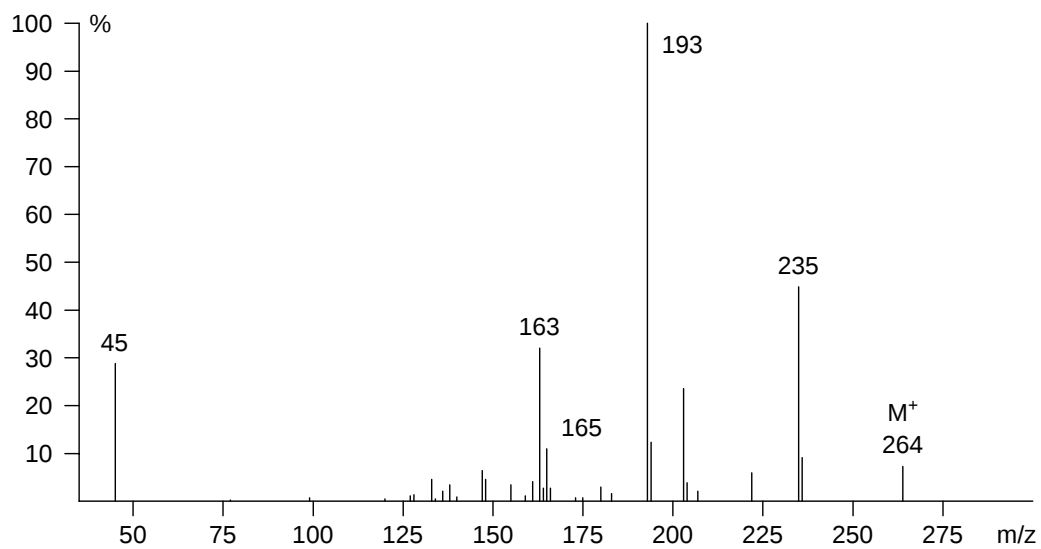


Abb. 3.24 Massenspektren von Nonylphenolmonoethoxylaten am Probenahmepunkt F2

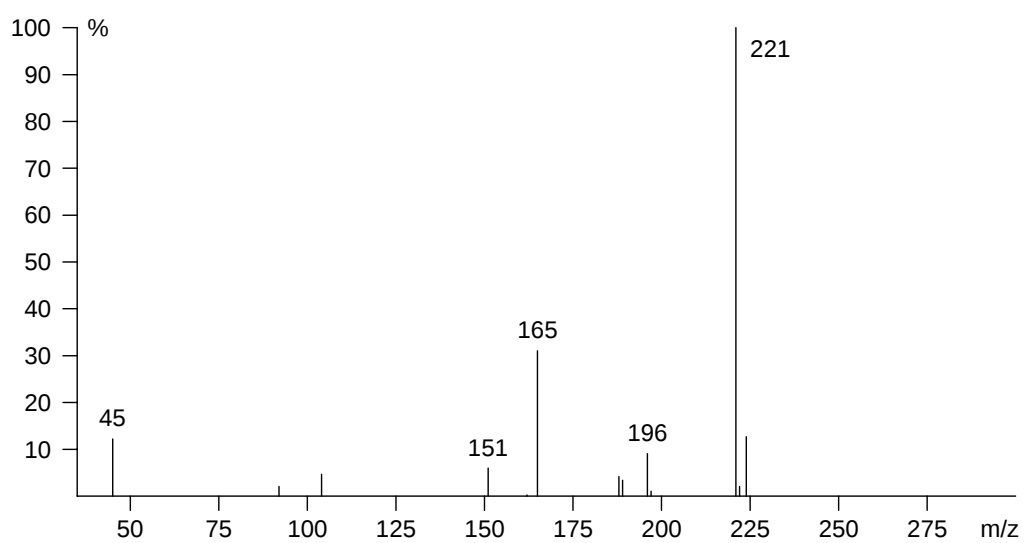
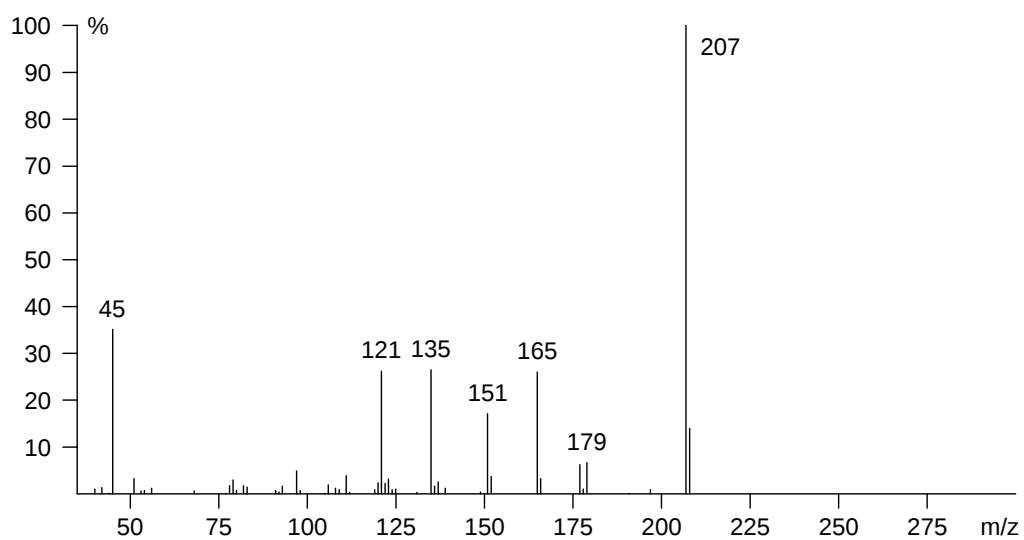
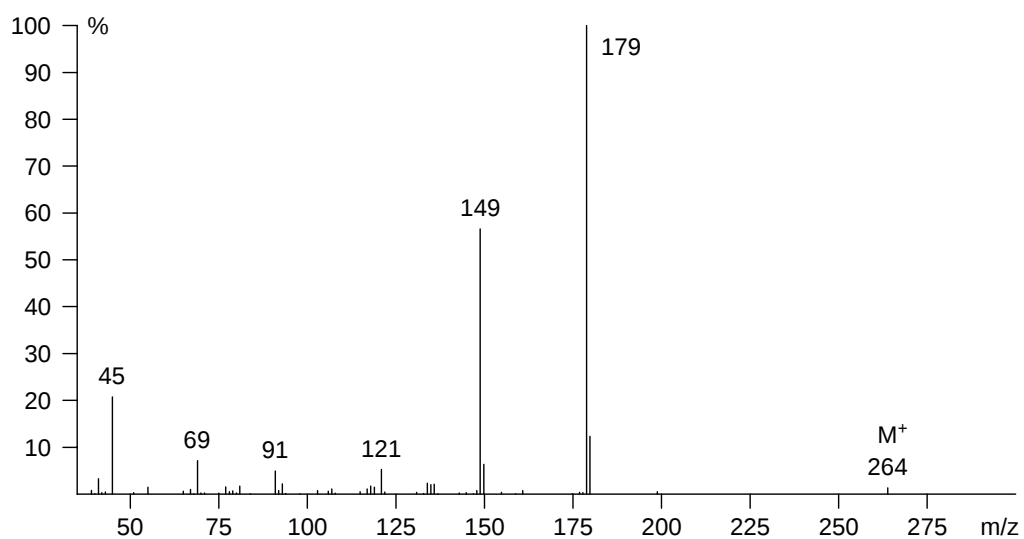


Abb. 3.24 Massenspektren von Nonylphenolmonoethoxylaten am Probenahmepunkt F2

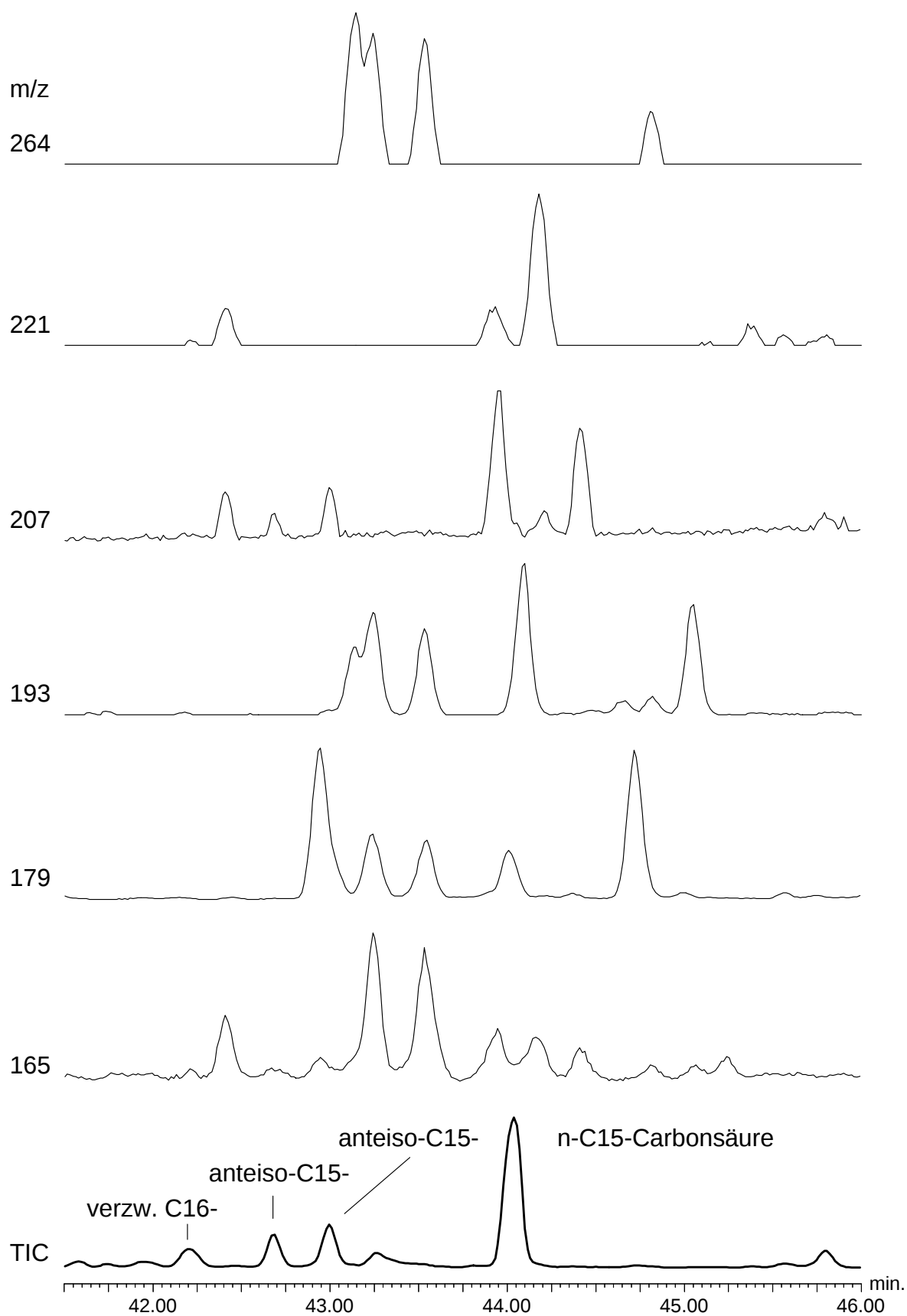


Abb. 3.25 GC/MS-Analyse, Spuren prominenter Fragment-Ionen von Nonylphenol-monoethoxylaten am Probenahmepunkt F2

In den 1997 beprobten Sedimenten der Oder konnten Octylphenole nur sporadisch aufgefunden werden. Decylphenole waren nicht nachweisbar. Nonylphenole wurden fast im gesamten Verlauf der Oder und den beprobten Nebenflüssen nachgewiesen. Hier zeigte sich wieder eine Korrelation mit der Dichte bzw. Größe von Siedlungszentren in der beprobten Region, wie Belastungen nach den Orten Raciborz (F2), Opole (F3), Wroclaw (F4), Frankfurt/Slubice (F10) und Szczecin (H1) zeigen. Nicht immer sind große Mengen aufgefunder Nonylphenole auf kommunale Abwässer zurückzuführen. Zusätzlich sind Einträge aus der Papier- oder Kunststoff-Industrie an den Probenahmeorten Opole (F3), Brzeg Dolny (F5), Polecko (F8) und in der Westoder (F13, F15) wahrscheinlich. Ein Vergleich mit einem technischen Nonylphenol-Standard zeigte als einzig aufgefundenes Substitutionsmuster die para-Substitution.

Zwischenstufen des Abbaus von Alkylphenolpolyethoxylaten zu Alkylphenolen konnten in den Sedimenten im Flussbett sporadisch nachgewiesen werden. p-Nonylphenolethoxylate mit 1 oder 2 Ethoxylat-Einheiten finden sich in den Sedimenten der Oberen Oder F2 (Raciborz), F3 (Opole) und F5 (Brzeg Dolny). Die entsprechenden p-Nonylphenolethoxylatcarbonsäuren lassen sich nur bei Czerna im mittleren Oderabschnitt (F7) nachweisen. In den durch Überflutung ausgetragenen Sedimenten (in den direkten Uferbereich und weiter ausgetragen) liegen die Zwischenstufen des APEO-Abbaus in erhöhten Mengen vor. p-Nonylphenolethoxylatcarbonsäuren traten dort teilweise auch als Hauptmetabolite auf, da bei ihnen die Metabolisierungskette unterbrochen ist

Alkylbenzolsulfonate und Alkylbenzole

Die mengenmäßig bedeutsamste, synthetisch dargestellte grenzflächenaktive Stoffgruppe sind lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS), typischerweise mit Kettenlängen von C₁₀ bis C₁₃. Ihre Jahresproduktion beträgt mehr als 1.5 Millionen Tonnen [89]. Einsatz finden sie in Spül- und Reinigungsmitteln für Industrie und Haushalt, sowie als Hilfs- und Zusatzstoff in der industriellen Produktion von Textilien, Metallen, Papier, Harz und Düngemitteln. LAS sind nur mäßig toxisch (Ratte: LD₅₀ oral 437 mg/kg, Maus: 1.407 mg/kg) und gelten als Detergentien mit nur geringem Gefährdungspotential [90]. LAS sind nicht endokrin wirksam. Derzeit existiert in der EU kein Einsatzverbot, eine Richtlinie für Rückstände in Klärschlämmen mit einem Grenzwert von 2600 mg/kg TM ist in Vorbereitung.

Für die Herstellung von LAS werden zunächst lineare Alkylbenzole aus Benzol und entsprechenden Olefinen oder Chlorparaffinen dargestellt. Durch Sulfonierung erhält man die p-Alkylbenzolsulfonsäuren, die mit Lauge zu den linearen Alkylbenzolsulfonaten (LAS) **27** umgesetzt werden. Das kommerzielle Produkt LAS enthält aufgrund unvollständiger Sulfonierung noch ca. 1 % lineare Alkylbenzole.

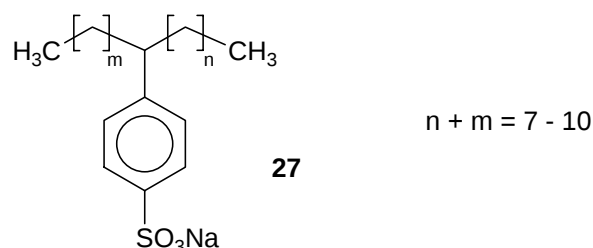


Abb. 3.26 lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS)

Das Abbauverhalten von LAS ist gut untersucht [91]. Sie werden aerob zunächst unter ω - und mehrfacher β -Oxidation zu Sulfophenylcarboxylaten (SPC) abgebaut. Der weitere Abbau erfolgt unter Verlust der restlichen Seitenkette, Dioxygenierung und *ortho*-Spaltung des Phenylringes und führt zu vollständiger Mineralisierung (siehe Abbildung 3.27).

Die biologische Halbwertszeit von LAS beträgt 12 Stunden in Wasser und 13-26 Tage in Sedimenten. In Klärschlamm liegt die Halbwertszeit bei 1-3 Stunden [92]. Ein anaerober Abbau, sowie Hydrolyse und Photolyse konnten nur unter Laborbedingungen nachgewiesen werden.

Vergleichbar ist das Abbauverhalten linearer Alkylbenzole LAB. Der Abbau von LAB erfolgt analog über ω - und β -Oxidationen mit nachfolgender Ringspaltung. Die biologische Halbwertszeit beträgt in Wasser 4.1 Tage und im Sediment 15-33 Tage. Eine Photolyse erfolgt bei LAB nicht, ein anaerober Abbau findet lediglich mit vernachlässigbarer Geschwindigkeit statt.

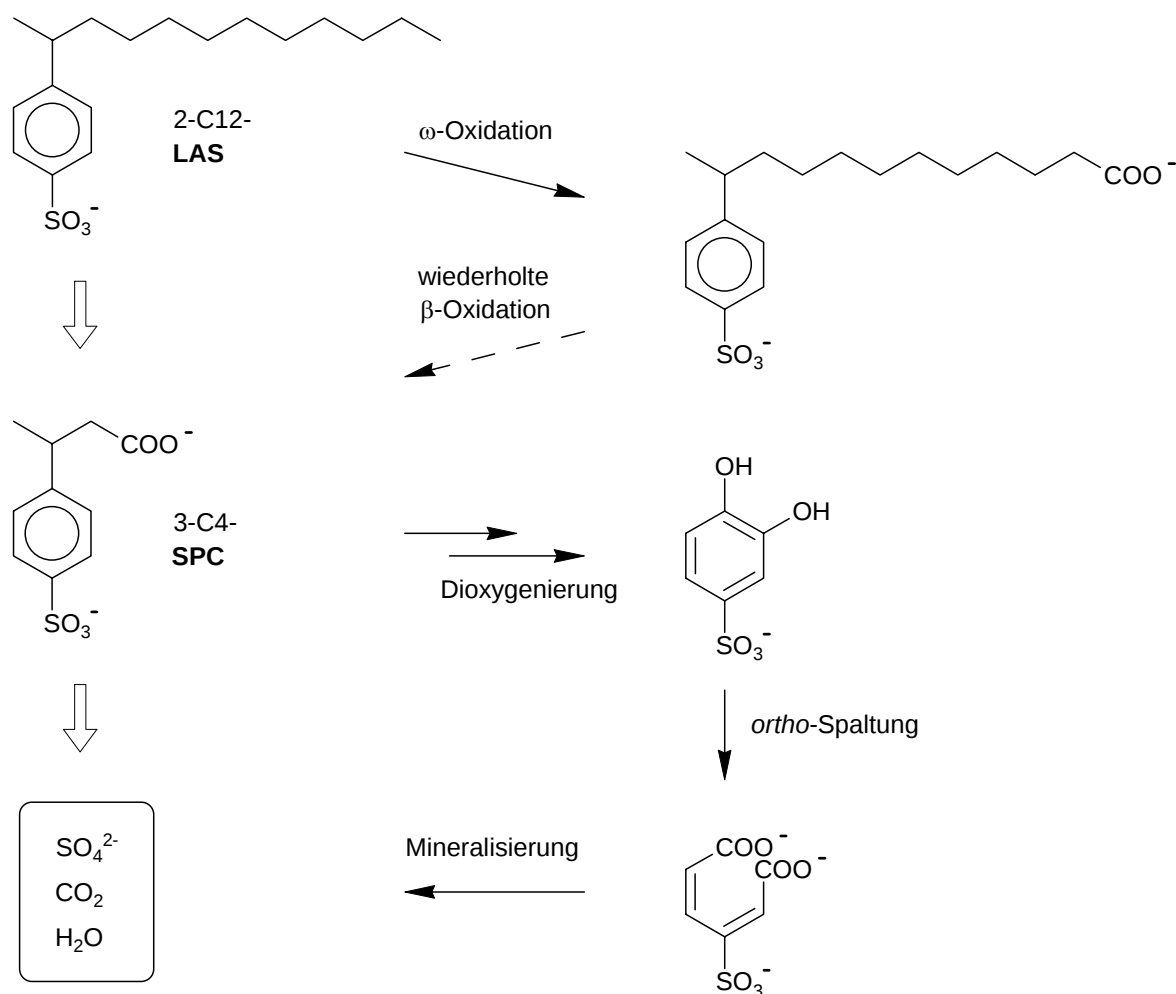


Abb. 3.27 Mikrobieller Abbau von 2-C12-LAS

In den 1997 beprobten Sedimenten der Oder konnten LAS nicht direkt nachgewiesen werden. Jedoch fanden sich die entsprechenden linearen Alkylbenzole in Mengen von einigen mg/kg TM. Aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit von LAS (250g/l 25°C verglichen mit 0.041 mg/l 25°C für LAB) und der starken Tendenz der LAB an das Sediment zu adsorbieren, werden LAS vorherrschend im Wasserkörper aerob abgebaut, während LAB, an die Sedimente gebunden, eine deutlich höhere Verweilzeit besitzen [93]. Das vollständige Fehlen von LAS in den Sedimenten ist zusätzlich auf die enorm erhöhte Abflussmenge der Oder während des Flutereignisses 1997 vor der Probenkampagne zurückzuführen, da dabei ein Teil des Sedimentes wieder mobilisiert wurde und eine Auswaschung erfolgte.

Das aufgefundene Isomerenmuster der LAB zeigt die unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten von LAB einer bestimmten Kettenlänge in Abhängigkeit von der Position des Phenylrings. Endständige LAB werden schneller abgebaut als die zentral substituierten Isomere. In der Produktmischung ist synthesebedingt das 2-Phenyl-Isomer dominant (18-29%). Der Anteil der anderen Isomere sinkt mit Wanderung der Phenyl-Substitution zur Mitte der Alkylkette [92]. Für LAB mit ungerader Alkylkette ist der Anteil des zentral substituierten LAB aus statistischen Gründen halbiert, da nur eine zentrale Substitutionsstelle gegenüber jeweils zwei nicht zentralen an der Alkylkette während der Synthese zur Verfügung steht.

Abbildung 3.28 zeigt beispielhaft den typisch aufgefundenen differenziellen Abbau der Stellungsisomere mit fast vollständig abgebauten 2-Phenyl-LAB und verlangsamtem Abbau der Isomere mit Substitution in Richtung Zentrum. Im Gegensatz zur molaren Verteilung der Homologen in der kommerziellen Produktmischung ($C_{10}/C_{11}/C_{12}/C_{13} = 13/30/33/24\%$) findet sich eine Verteilung von 2-3/24/40/33 %, die auf einen bevorzugten Abbau der kürzerkettigen LAB hindeutet.

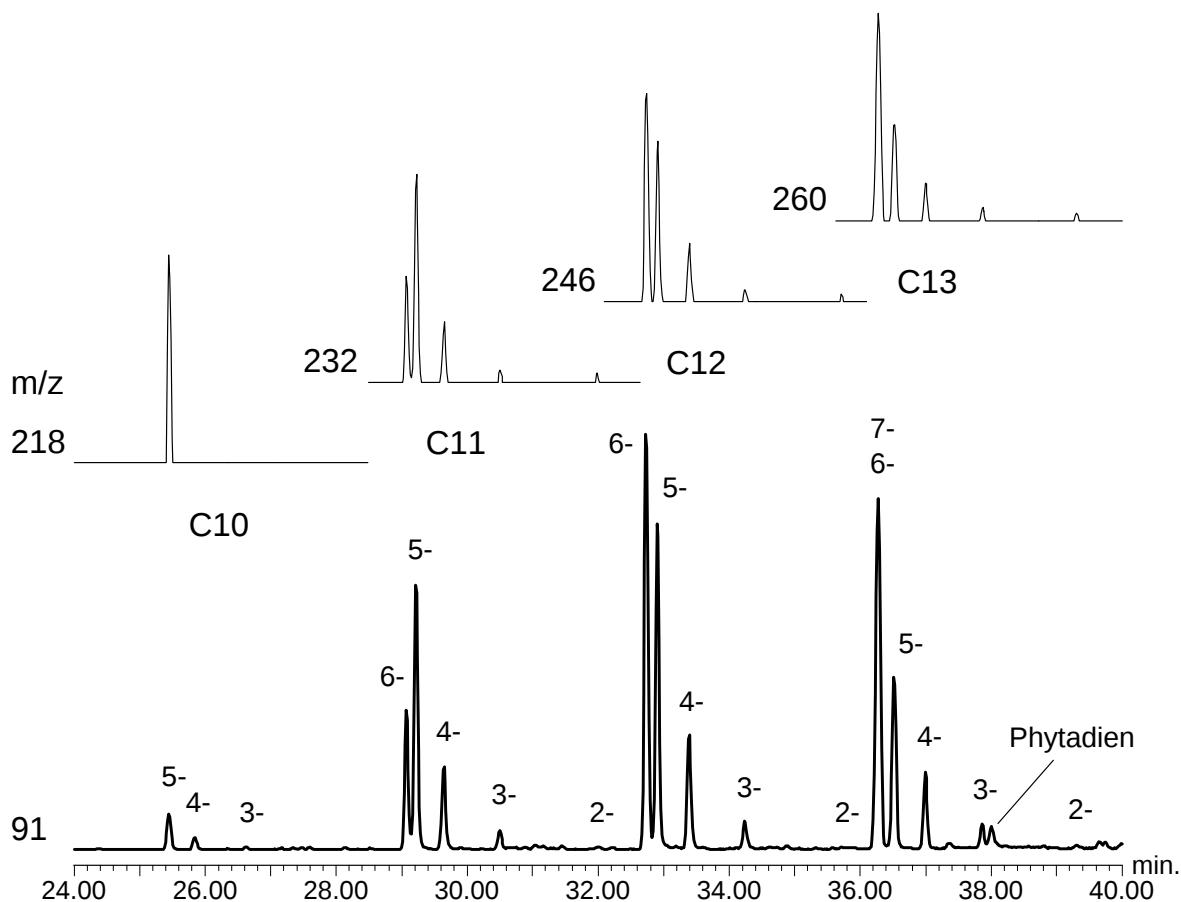


Abb. 3.28 Typische Isomerenverteilung der C_{10} - bis C_{13} - LAB (Probenahmepunkt F8)

Einzig das Sediment F2 (nach Raciborz) zeigt eine Veränderung des Isomerenpatterns (Abb. 3.29). Erhöht sind hier bei allen Kettenlängen die 4-Phenyl-Isomere. Die 3-Phenyl-Isomere und das 2-C₁₃-LAB sind noch in größeren Mengen vorhanden. Das Mengenverhältnis der Homologen zueinander (3.5/23.4/36.1/37.0 %) ist ähnlich dem in den übrigen Sedimenten gefundenen. Dies könnte auf einen jungen Eintrag und eine Variation der mikrobiologischen Population aufgrund des sandigeren Untergrundes oder anderer örtlicher Einflüsse hindeuten. Hier ist auch der erste Eintrag an LAB in die Oder nachzuweisen. Im Verlauf der Oder bleibt die gefundene Menge nahezu konstant, was zusammen mit dem stabilen Isotopenmuster einer kontinuierlichen Belastung mit LAS/LAB aus kommunalen und industriellen Abwässern entspricht.

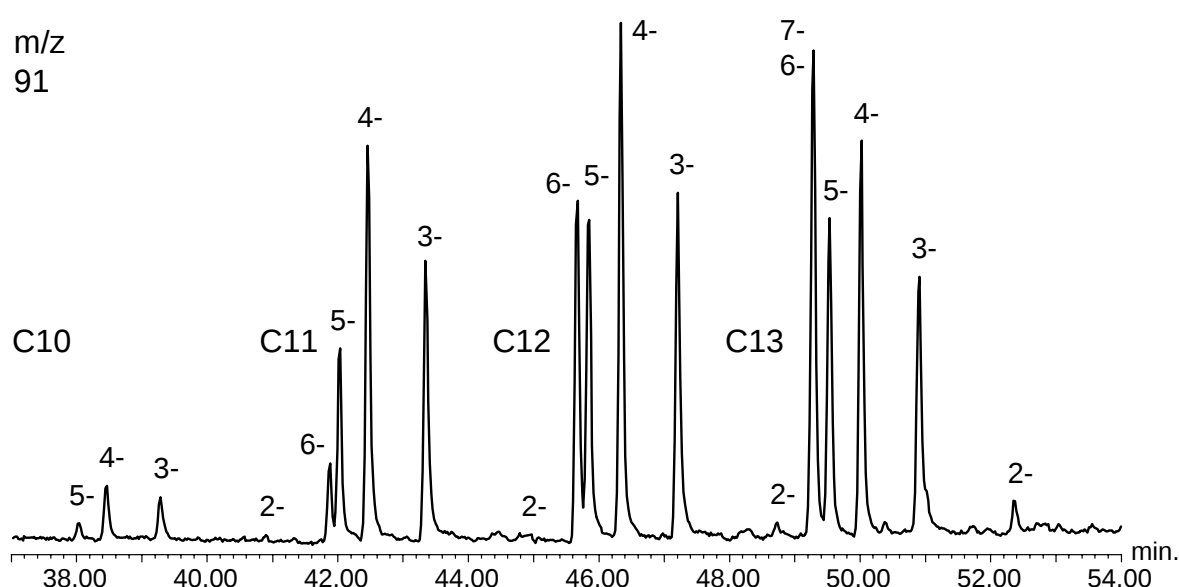


Abb. 3.29 Isomerenverteilung der C₁₀- bis C₁₃- LAB in Sedimenten nach Raciborz (Probenahmepunkt F2)

3.6.2.3 Synthetische Duftstoffe

Synthetische Duftstoffe sind eine weitere, durch kommunale Abwässer eingetragene, beachtenswerte Stoffgruppe. Zu den wichtigsten Duftstoffen gehören synthetische Moschusverbindungen. Sie finden sich in einer Vielzahl von Reinigungsmitteln, Kosmetika und anderen Pflegeprodukten. Gemeinsam ist ihre Ähnlichkeit im Geruch, jedoch besitzen sie kaum strukturelle Verwandtschaft mit dem (teuren) Naturprodukt.

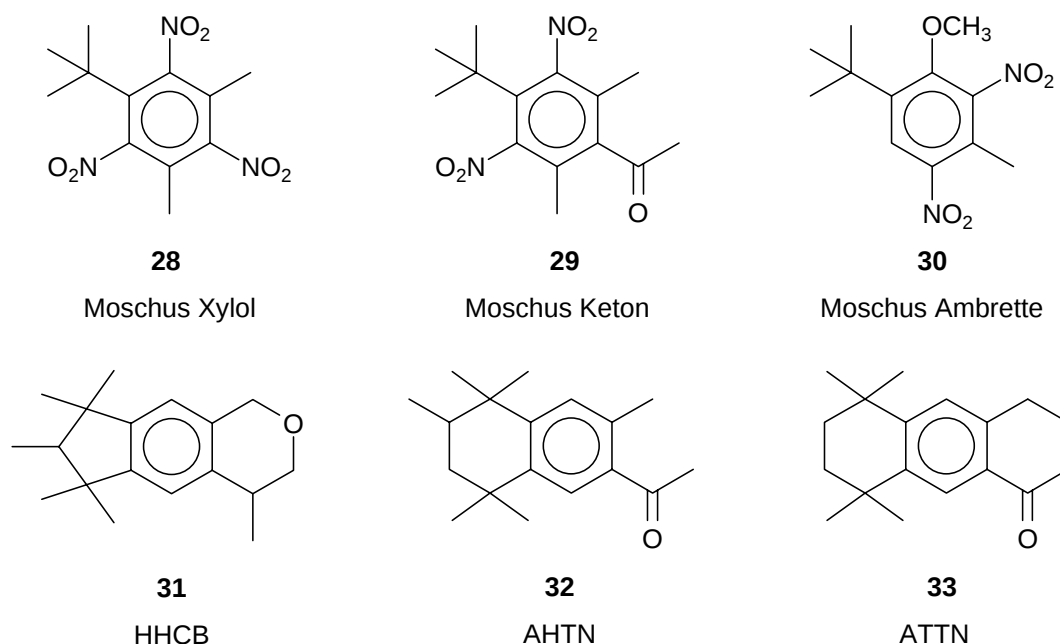


Abb. 3.30 Vertreter synthetischer Moschusduftstoffe

Nach toxikologischen Bedenken gegen Nitro-Moschusverbindungen werden diese seit den 1980er Jahren weitgehend durch polycyclische Moschus-Duftstoffe ersetzt. Für Moschus Ambrette **30** besteht EU-weit ein Verbot für Kosmetika und verwandte Produkte aufgrund phototoxischer Wirkung auf der Haut, Nerven- und Erbgutschädigung. In Deutschland verzichtet die Industrie seit 1994 auf die Produktion und Anwendung von Nitro-Moschusduftstoffen. Eine größere Stabilität der polycyclischen Moschusduftstoffe gegen Säuren und Laugen und eine deutlich bessere Lichtstabilität begünstigen diese Verdrängung.

Moschus-Verbindungen machen etwa 5 % der in Produktformulierungen verwendeten Duftstoffe aus. Ihre weltweite Produktion betrug 1997 ca. 8000 t [94]. Auf die polycyclischen Moschusduftstoffe entfielen hierbei 5600 t. In Europa machen die polycyclischen Vertreter mehr als 90% (1998) der Produktion von Moschusverbindungen aus. Ihre wichtigsten Vertreter mit zusammen mehr als 95 % der Gesamtproduktion sind das Isochromanderivat HHCB (1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyran, „Galaxolide“) **31** und das Tetralinderivat AHTN (7-Acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-tetrahydronaphthalin, „Tonalide“) **32**.

Polycyclische Moschusverbindungen besitzen ein hohes Bioakkumulationspotential, so dass ihr Vorkommen in der Umwelt kritisch beurteilt wird. Die biologische Abbaubarkeit in Wasser und Sediment ist gering, eine Mineralisierung findet über mehrere Wochen nur zu wenigen Prozent statt [95]. Photooxidation ist im Laborversuch nachgewiesen [96]. In aquatischen Systemen ist ihr Auftreten und ihre Anreicherung seit den 1990er Jahren vielfach beobachtet worden [97]. Auch in menschlichem Fettgewebe und Muttermilch konnten polycyclische Moschusverbindungen in Mengen von 8-133 µg/kg nachgewiesen werden [29, 98]. Eine phototoxische Reaktion auf der menschlichen Haut ist für HHCB und AHTN nachgewiesen. Derzeitige umfassende Untersuchungen zur Risikobewertung in Bezug auf den Mensch sind noch nicht abgeschlossen. Die Toxizität und das endokrine Potential werden bisher als gering eingestuft, jedoch wurde ein verwandter polycyclischer Tetralin-Moschus, Versalide (7-Acetyl-1,1,4,4-tetramethyl-6-ethyltetralin, ATTN) **33**, aufgrund gefundener neurotoxischer Wirkung 1980 aus dem Handel genommen [99]. HHCB **31** und AHTN **32** werden in Kläranlagen nur teilweise zurückgehalten und gelangen so über Abwässer in die Umwelt [100]. Aufgrund der Akkumulation und des ubiquitären Vorkommens werden die polycyclischen Moschusduftstoffe zunehmend mit Sorge betrachtet.

In den untersuchten Sedimenten von 1997 konnten HHCB und AHTN durchgehend in der oberen und mittleren Oder nachgewiesen werden. Besondere Schwerpunkte lagen bei Raciborz (F1 und F2) und nach Zufluss von Kaczawa und Zimnica bei Scinawa (F6). Im Unterlauf wurden geringere Mengen, teilweise an der Nachweisgrenze gefunden (Tabelle 3.6).

Im Wasserkörper der Oder tritt HHCB („Galaxolide“) stets vergesellschaftet mit seinem - vermutlichen primären - Abbauprodukt 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyran-1-on („Galaxolidon“) auf [29]. Im Sediment wurde Galaxolidon jedoch nur sporadisch nachgewiesen (F4, F7, F15, F16). Grund für die Abwesenheit im Sediment ist zum einen die bessere Wasserlöslichkeit des Galaxolidons, zum anderen ist eine Photooxidation am Flussboden unterdrückt bzw. im Sediment nicht möglich. In der Literatur finden sich auch Hinweise auf einen eventuell stärkeren Abbau von Galaxolidon gegenüber Galaxolide in Klärschlämmen [101]. Analoges könnte für den Abbau in Fluss-Sedimenten gelten.

	obere Oder					mittlere Oder						
	F1	F2	F3	N1	F4	N2	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Galaxolide	++	++	+	+	+	0	+	++	+	+	+	+
Tonalide	++	++	+	+	+	0	+	++	+	+	+	+
Galaxolidon	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0
4-Oxoisophoron	0	0	++	0	0	0	0	0	+	0	0	+

	untere Oder									
	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
Galaxolide	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0
Tonalide	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0
Galaxolidon	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
4-Oxoisophoron	0	0	0	++	++	++	+	+++	0	0

Tab. 3.6 Duftstoffe in Sedimenten im Verlauf der Oder (1997)

Ein weiterer in den Oder-Sedimenten aufgefundener Duftstoff ist 4-Oxoisophoron. Es ist als synthetische Aromakomponente zur Komposition eines „orientalischen Duftes“ (muffig-holzig, süßer Tabak, süßer Tee; „Tee-Keton“) weit verbreitet. Natürlich kommt 4-Oxoisophoron z.B. in Safran (*Crocus sativus*) vor. Es findet Verwendung in Waschmitteln, Mitteln zur Körperpflege, Reinigungsmitteln, Parfümen und Kosmetika, Lebensmitteln, aber auch für moderne „convenience“-Produkte zur Raumbeduftung. Bei Untersuchungen des Wasserkörpers [29] wurde 4-Oxoisophoron im gesamten Fluss-System angetroffen. In den untersuchten Sedimenten findet es sich vereinzelt, dann aber in größeren Mengen (F3, F13, F14, F15, H1). An diesen Orten scheinen lange bestehende Eintragspfade wahrscheinlich; kommunale Abwässer sind hier wieder als Quelle anzunehmen.

Insgesamt lässt das starke und durchgängige Auftreten von Stoffen aus dem Kontext der Geruchsstoffe in den Sedimenten der Oder auf eine anhaltende Einwirkung kommunaler Abwässer schließen. Daher eignen auch sie sich als Marker zur Identifizierung von Quellen und zur Abschätzung des Beitrags solcher Quellen zur Gewässerverschmutzung.

Zusammenfassend zeigt die Auswertung der hier untersuchten Leitsubstanzen kommunaler Abwässer eine deutliche Belastung der Oder, hervorgerufen durch fehlende oder unzureichende Klärung. Hier scheinen dringend Maßnahmen zur Verbesserung der Abwasserbehandlung angeraten.

3.6.2.4 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe PAK sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie werden aufgrund ihrer toxikologischen Eigenschaften und ihrer teilweise hohen Persistenz als sogenannte „Priority Pollutants“ betrachtet. Die US Environmental Protection Agency (USEPA) listet 16 PAK als besonders kritisch. Die deutsche Trinkwasserverordnung (TVO) nennt 6 besonders zu beobachtende Vertreter, nämlich Fluoranthen 44, Benzo[b]fluoranthen 51, Benzo[k]fluoranthen 52, Benzo[a]pyren 54, Indeno[1,2,3-cd]pyren 56 und Benzo[ghi]perylen 57 (Strukturen s. Abb. 3.31).

PAK entstehen in geologischen Zeiträumen durch natürliche anaerobe diagenetische Prozesse während und nach der Sedimentverfestigung (Lithification). Quellen in der Biosphäre sind die Verbrennung fossiler Brennstoffe, industrielle Prozesse, technische Anwendungen aber auch Waldbrände und andere Brandereignisse (siehe Tabelle 3.7). Biogene PAK aus Mikroorganismen und Pflanzen spielen in Sedimenten von Flüssen dicht besiedelter Regionen eine untergeordnete Rolle.

Kommerziell und industriell direkt eingesetzt werden nur wenige PAK. Verbrauchszahlen in der EU sind z.B. für Kreosot (Teeröl, besteht zu ca. 85% aus PAK) ca. 100000 t, Anthracen 6-7 t, Fluoranthen >500 t und Naphthalin >125000 t jährlich [102].

Table 3. Main source sectors for PAHs in 1994(tonnes/year)in six European countries as reported in Table 2 (Sweden excluded).

Sector	PAH	%
Combustion in energy and transformation industrie	6.1	0.3
Nonindustrial combustion plants	1,120	60
Combustion in manufacturing industry	63	3.4
Production processes	248	13
Road transport	383	20
Other mobile sources	10	0.5
Waste incineration	30	1.6
Agriculture and forestry	1	<0.1
Natural sources	8	0.4
Total (approximately)	1,900	

^aData from EECORINAIR (1997).^bIncludes domestic wood burning.

Table 2. Emissions estimates from European countries—anthropogenic emissions of PAHs^a (tonnes/year) in the EU region.

Country	PAH ^b (1994)	PAH ^c (1990)	B[a]P ^d (1995)
Austria	458	243	6.11
Belgium		818	3.35
Denmark	37	76.7	1.44
Finland		104	6.88
France		3,479	26.4
Germany	420	420	26.4
Greece		153	2.89
Ireland		73.7	1.24
Italy		694	13.9
Luxembourg	1.1	6.24	0.24
Netherlands		184	2.29
Norway	181		
Portugal		138	1.64
Spain		521	9.61
Sweden	153	282	6.78
United Kingdom	764	1,437	12.0

^aPAHs refers to the "Borneff six" (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, benzo[k]fluoranthene, fluoranthene, and indeno[1,2,3-cd]perylene).
^bData from EEA CORINAIR (1997).^cData from Berdowski et al. (1997).^dData from Pacyna (1999).

Tab. 3.7 PAK Emissionen in EU-Staaten (aus Boström 2002 [103])

Das Gefährdungspotential verschiedenener PAK ist weitreichend untersucht. Erste Hinweise auf Gefährdungen durch PAK ergaben sich schon 1761 mit Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen und Kautabak [104]. Zu den mannigfaltigen Untersuchungen über Toxikologie bzw. Cancerogenität und ihrem Vorkommen in aquatischen System sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [105-109]. Als Leitsubstanz für Toxizität und Cancerogenität von PAK gilt Benzo[a]pyren **54** [110, 111]. Neben PAK besitzen auch entsprechende N-, O- und S-Heterocyclen ein teilweise äquivalentes Potential Krebs zu erzeugen, wie Dinaphthothiophen **66** und Dibenzocarbazol **71** (s. Abbildung 3.32).

PAK sind allgemein lipophile, stabile Verbindungen, die sich jedoch aufgrund der Diversität der Gruppe in individuellen physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden. Mit der Größe der PAK verringern sich Wasserlöslichkeit und Dampfdruck und damit steigen hydrophobes Verhalten und Persistenz. Aufgrund dieser Eigenschaften binden PAK stark an die organische Substanz der Sedimente und bioakkumulieren. Der weltweit weiter steigende Energiebedarf wird noch zu mehr als 90% mit fossilen Energieträgern gedeckt und bringt entsprechende PAK-Emissionen mit sich.

Die Abbildungen 3.31 und 3.32 zeigen eine Auswahl der in Sedimenten in teilweise signifikanten Mengen nachgewiesenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Die Belastung der Oder mit PAK ist durchgehend hoch und entspricht Mengen, die typischerweise in Hafengebieten aufgefunden werden [112]. Benzo[a]pyren **54** als Leitsubstanz kann ab dem Oberlauf (F2) durchweg in den Sedimenten der Probenkampagne 1997 in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Hierbei ist, neben stark erhöhten Mengen in der Region Szczecin und im Stettiner Haff, besonders der Eintrag durch die Strzegomka bei Bogdaszowice (N2) beachtenswert. Auch in parallelen Wasseruntersuchungen zeigt die Strzegomka allgemein eine starke Belastung mit organischen Schadstoffen [113], hervorgerufen durch chemische und metallverarbeitende Industrie in ihrem Einzugsgebiet. Eine etwas schwächere Belastung mit PAK findet sich im Bereich des Warthezuflusses (N3, F11, F12)

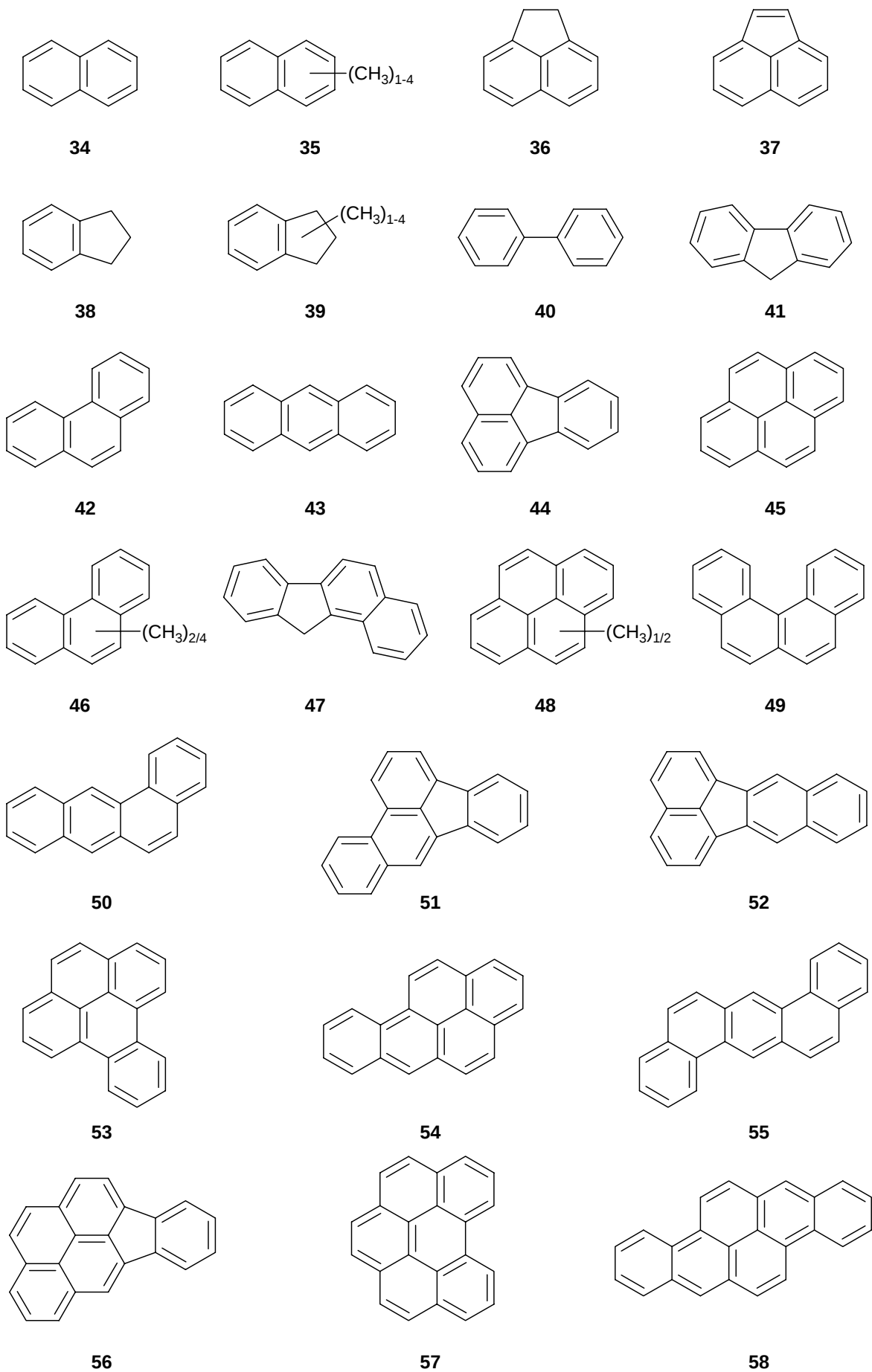


Abb. 3.31 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten

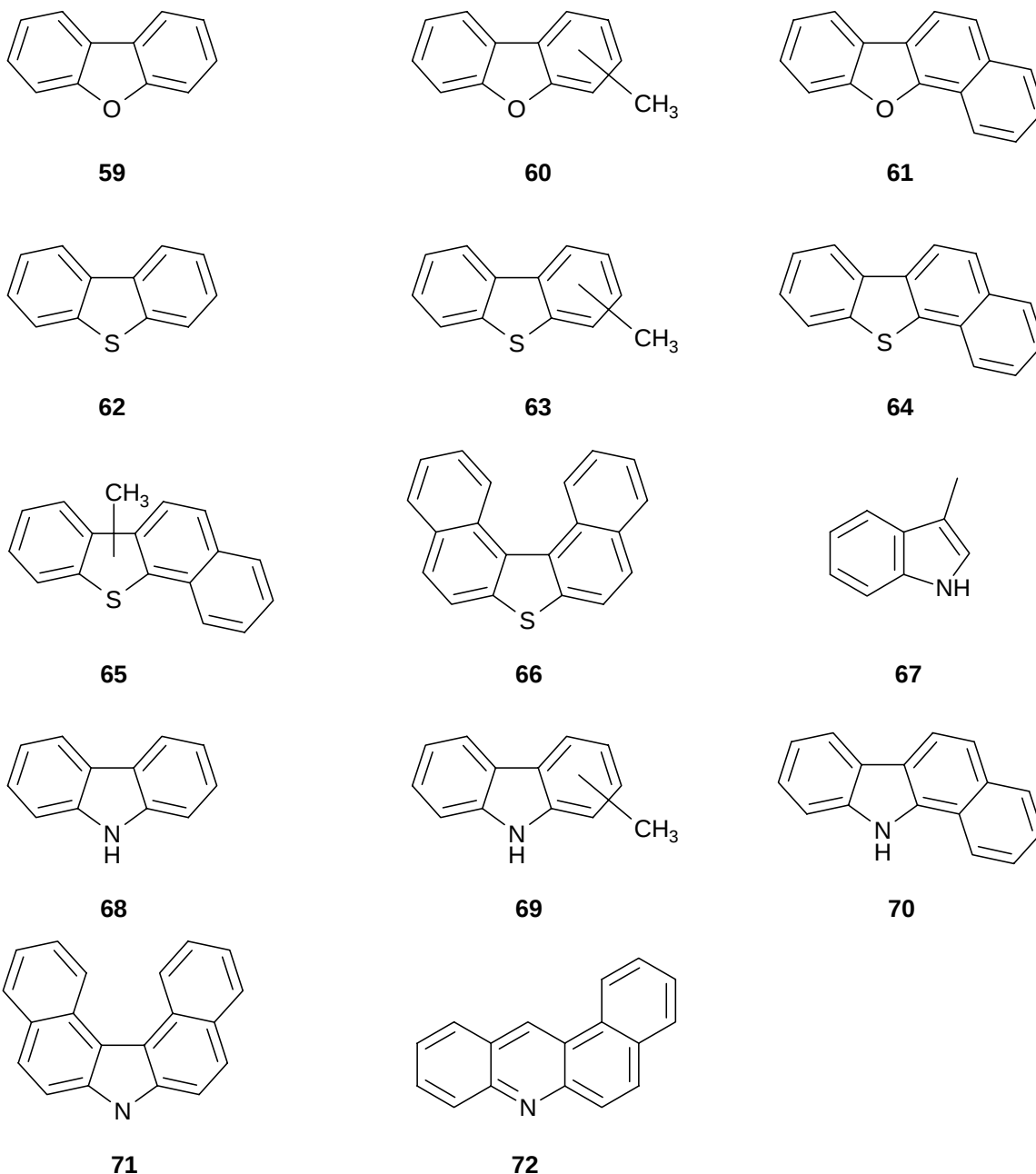


Abb. 3.32 N-, O- und S-haltige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten

Die Aufteilung bzw. der „Fingerprint“ der PAK gibt Aufschluss über Art und Herkunft der Immission. Ein hohes Verhältnis von Fluoranthren **44** und Pyren **45** zu C2- und C4-Phenanthrenen **46** kann als Marker für den Einfluss von PAK aus Verbrennungsvorgängen dienen. Erhöhte Werte hierfür finden sich im gesamten Verlauf der Oder flussabwärts ab Raciborz (Abbildung 3.33). In Bereichen hoher PAK-Belastungen ist eine Überlagerung mit PAK aus anderen Eintragspfaden zu beobachten. Ebenso sind Acenaphthen **36** und Acenaphthylen **37**, die vermehrt bei

der Verbrennung von Dieselmotorkraftstoff entstehen, weitere Indikatoren für PAK-Einträge aus Verbrennungsvorgängen. Ihr Auftreten korreliert auch mit der Verbreitung von Industrie, Verkehr und Kommunen in der Umgebung des Probenahmeortes.

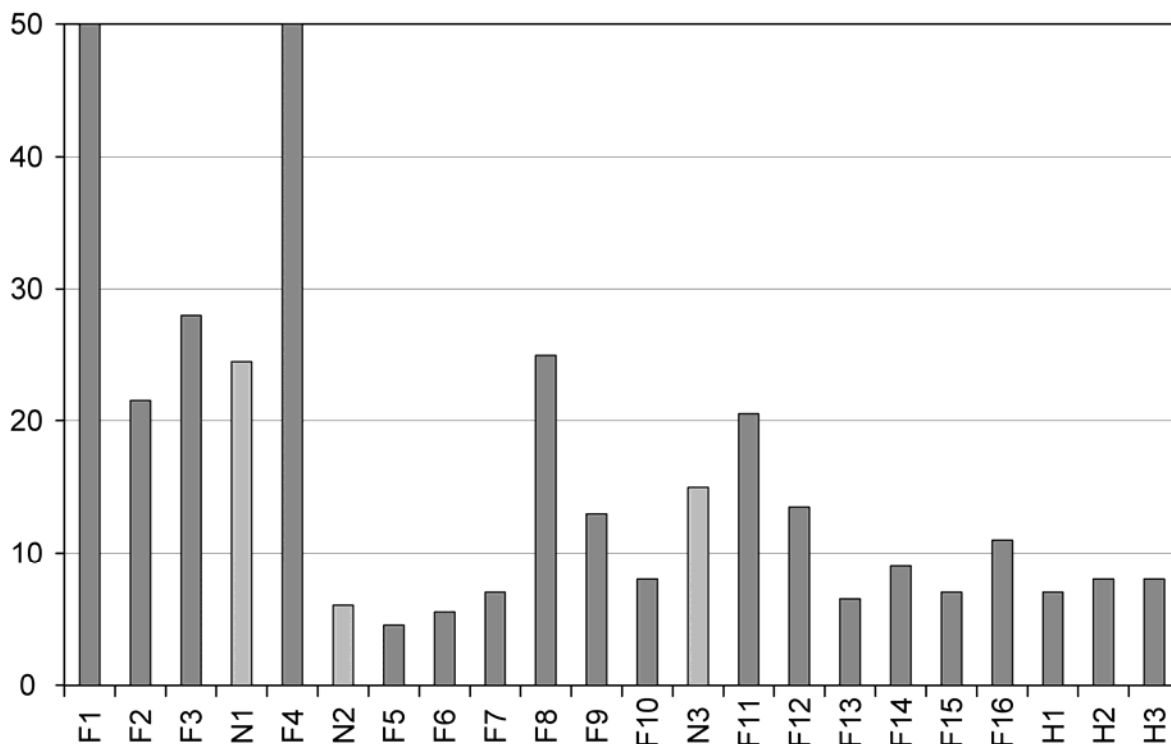


Abb. 3.33 Verhältnis Σ Fluoranthene+Pyren / Σ C2-+C4-Phenanthrene (1997)

Das erhöhte Auftreten alkylierter PAK an den meisten Probenahmeorten weist zusätzlich zur pyrogenen, eine petrogene Belastung aus. Zur Abschätzung des petrogenen Anteils einer PAK-Belastung kann das Verhältnis der Konzentrationen von Methylnaphthalinen **35** zu Naphthalin **34** benutzt werden. Durchgehend höhere positiven Werte zeigten in allen untersuchten Sedimenten den Einfluss petrogener Quellen (Abbildung 3.34). PAK-Pattern können hilfreiche Hinweise für die Zuordnung zu Eintragsquellen bieten. Der stärkste petrogene Eintrag erfolgte 1997 mit der Strzegomka (N2) und Bystrzyca in die Oder (F4) und ist dort weit im Verlauf verfolgbar (F5 und folgende). Den Einfluss weiterer petrogener Quellen zeigen die PAK-Mengen und Muster der Sedimente der Westoder vor Szczecin (F13-F16) und im Stettiner Haff (H2). Das jeweils korrespondierende Auftreten von Hetero-PAK, insbesondere Carbazolen **68-69**, Dibenzofuranen **59-60**, Dibenzothiophenen **62-63** und Benzonaphthothiophenen **64-65** bestätigt den Einfluss von Mineralölprodukten auf die Sedimentbelastung an diesen Orten.

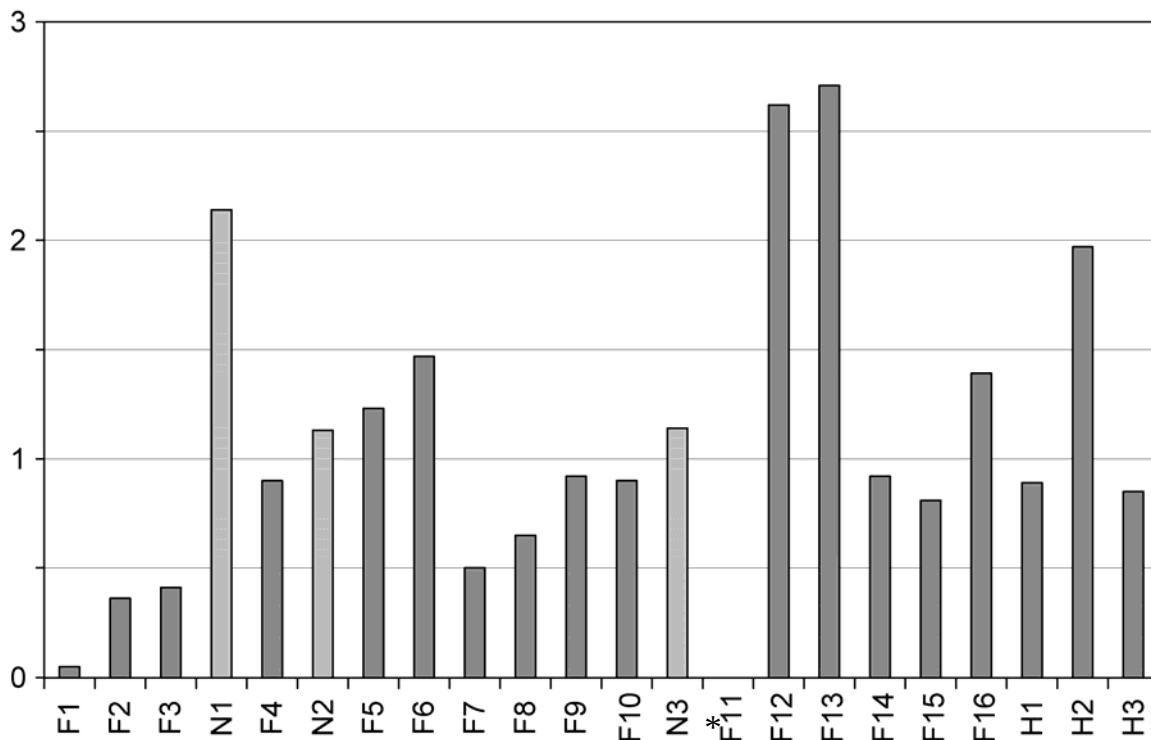


Abb. 3.34 Verhältnis Σ Methyl-Naphthalene / Naphthalin (1997)
 (* Berechnung für Probenahmeort F11 nicht möglich)

Zusammenfassend ist eine hohe bis sehr hohe Belastung der Oder mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen festzustellen, die sowohl pyrogenen, wie petrogenen Ursprungs sind. Einzelne Schwerpunkte lassen sich anhand geeigneter Marker und beobachteter Menge auffinden und korrespondieren im allgemeinen mit Quellen wie Verkehr, Bevölkerungsdichte und Industrie. Die ungewöhnlich hohe Menge an Mineralöl-Einträgen lässt sich auf das Flutereignis zurückführen, bei der zahlreiche Tanklager für Benzin, Diesel und Heizöl überschwemmt wurden.

Oxydierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (Oxy-PAK)

Begleitend mit dem hohen Level polycyclischer aromatischer Verbindungen lassen sich in der Oder auch oxydierte Polycyclen beobachten (Abbildung 3.35). Fluorenon **75**, Anthron **76**, Anthrachinon **77**, 4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on **78** und Benzanthron **83** sind Bestandteile der Verbrennungsprodukte von Kohle und Mineralölprodukten [114]. Auch Photooxidation und in geringerem Umfang mikrobieller Abbau von emittierten PAK führen zu einer Anreicherung oxydierter PAK in der Umwelt und zu einer Ablagerung im Sediment [115].

In einigen industriellen Produkten, oder zu ihrer Herstellung, werden Chinone bzw. polycyclische aromatische Ketone verwandt. Anthrachinon **77** z.B. findet Verwendung als Bleichmittel, in der Zellstoffindustrie, als Ausgangsstoff für Anthrachinonfarbstoffe und als Vergällungsmittel für Getreide gegen Krähenfraß. Im Vergleich zur Verbrennung fossiler Brennstoffe ist ein geringerer Eintrag zu erwarten.

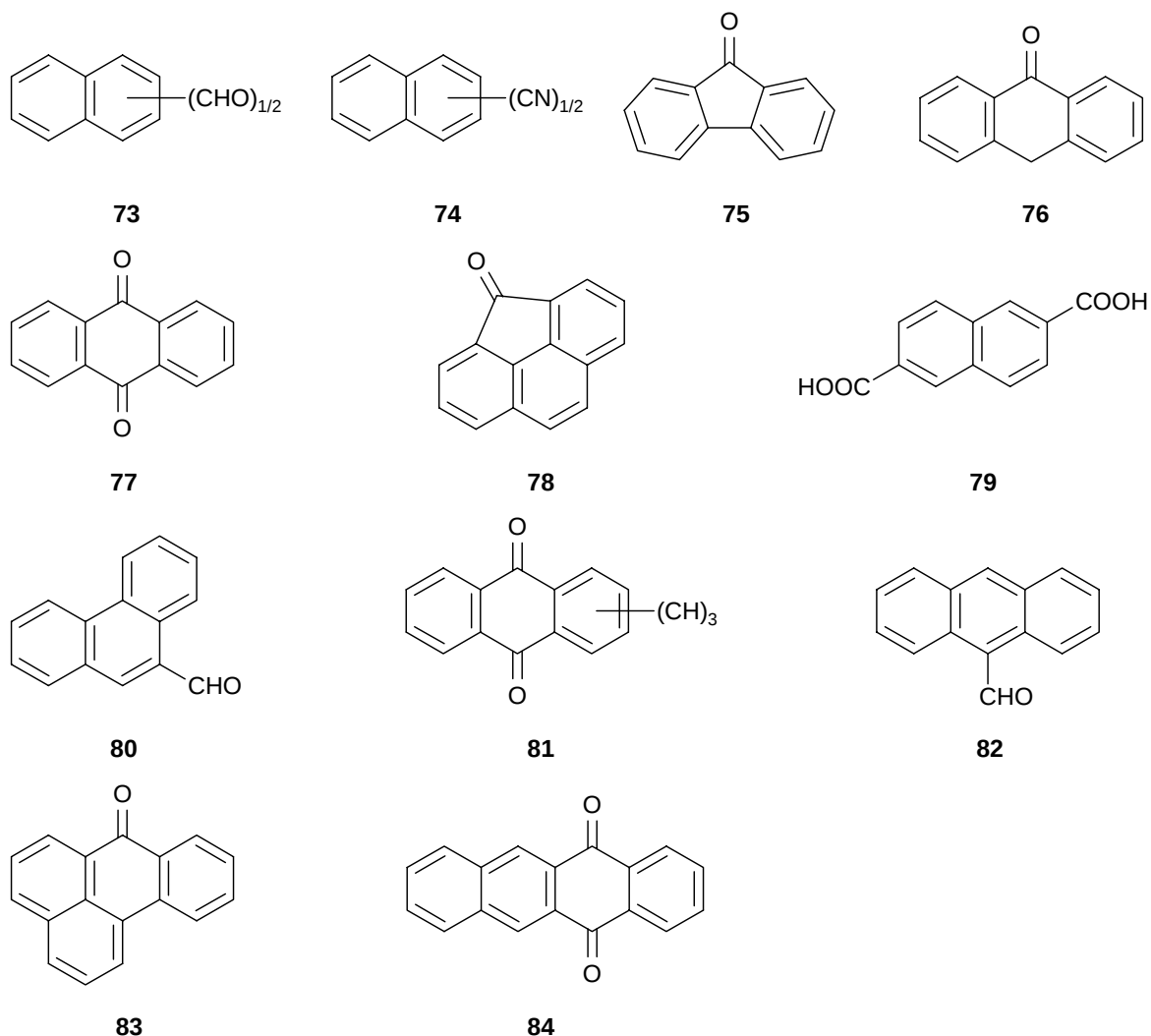


Abb. 3.35 oxidierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Odersedimenten

Oxy-PAK finden sich in den Sedimenten des Oberlaufes (F3, N1, F4, F5) in ähnlichen Größenordnungen wie die häufigsten nicht oxidierten PAK. Im Mittelteil und Unterlauf ist ihr Anteil an der Belastung mit PAK geringer. Die Probenahmeorte des Oberlaufes liegen dicht an den Siedlungszentren Opole und Wrocław. Hier ist der direkte Zusammenhang zwischen erhöhter Mengen oxy-PAK in den Sedimenten und dem aufgrund höherer Besiedlung vermehrten Eintrag durch Abgase aus Verkehr und Kommunen sichtbar.

Weitere Abbau- oder Metabolisierungsprodukte der PAK, wie hydroxylierte Verbindungen, konnten in den Sedimenten nicht nachgewiesen werden. Eine weiterführende schnelle Umsetzung bzw. Mineralisierung, sowie die deutlich bessere Wasserlöslichkeit, vor allem der initialen Metabolite, verhindern eine Akkumulierung im Sediment.

Die in einigen Proben nachgewiesene 2,6-Naphthalindicarbonsäure **79** scheint ein jeweils lokaler anthropogener Eintrag aus Herstellung, Verarbeitung oder Verbrauch von Kunststoffen zu sein. 2,6-Naphthalindicarbonsäure ist ein Synthesebaustein zur Herstellung von Blockcopolymeren (Poly(ethylen-2,6-naphthalate PEN, zusammen mit PET), welche teilweise unumgesetzt bei der Herstellung im Produkt verbleibt.

3.6.2.5 Chlorierte Kohlenwasserstoffe

Chlorierte Verbindungen werden auf Grund spezieller Stoffeigenschaften seit Jahrzehnten in beachtlichen Mengen hergestellt. Erwünschte Stoffeigenschaften sind z.B. Unbrennbarkeit, eine hohe Stabilität gegenüber Chemikalien und Witterungseinflüssen und eine hohe Lipophilie. Diese Anforderungen können mit chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW) gut erreicht werden. Diese Stoffeigenschaften führen jedoch auch zu hoher Persistenz und einer verstärkten Bio- und Geoakkumulation. Viele CKW sind akut toxisch, krebserregend oder schädigen Organismen anderweitig, teils schon bei Aufnahmen kleinster Dosen.

Abbildung 3.36 zeigt eine Auswahl chlorierter Kohlenwasserstoffe, nachgewiesen in Sedimenten der Oder. Ein besonderer lokaler Schwerpunkt ist hierbei Brzeg Dolny (F5). Hier konnten Tetrachlorethan **91**, Tetrachlorethylen **92**, Mono-, Di-, Trichlorbenzole **93-99** und -naphthaline **100-102** sowie Dichlorbenzoesäure **103** in teilweise nicht unerheblichen Mengen nachgewiesen werden. Chlorierte Benzole sind wichtige Zwischenprodukte bei der Herstellung von Pharmazeutika, Farbstoffen und Pestiziden. Sie dienen, wie Tetrachlorethan und Tetrachlorethylen, auch in vielfältiger Weise als Lösungsmittel.

Die in Abbildung 3.36 ebenfalls aufgeführten Chlorbispropylether **85-90** sind aus Untersuchungen der Elbe bekannt [116, 117]. Im Sediment bei Brzeg Dolny wurden die Isomere der entsprechenden Di-, Tri- und Tetrachlor-bispropylether gefunden. Diese sauerstoffhaltigen chlorierten Verbindungen sind typische Nebenprodukte bei der Darstellung und Umsetzung von Epichlorhydrin. Auch am Probenahmeort F8

sind für die Probenkampagne 1997 vermehrt CKW und die chlorierten Ether nachzuweisen. Die wahrscheinliche Eintragsquelle für beide Orte ist jeweils lokal angesiedelte chemische Industrie.

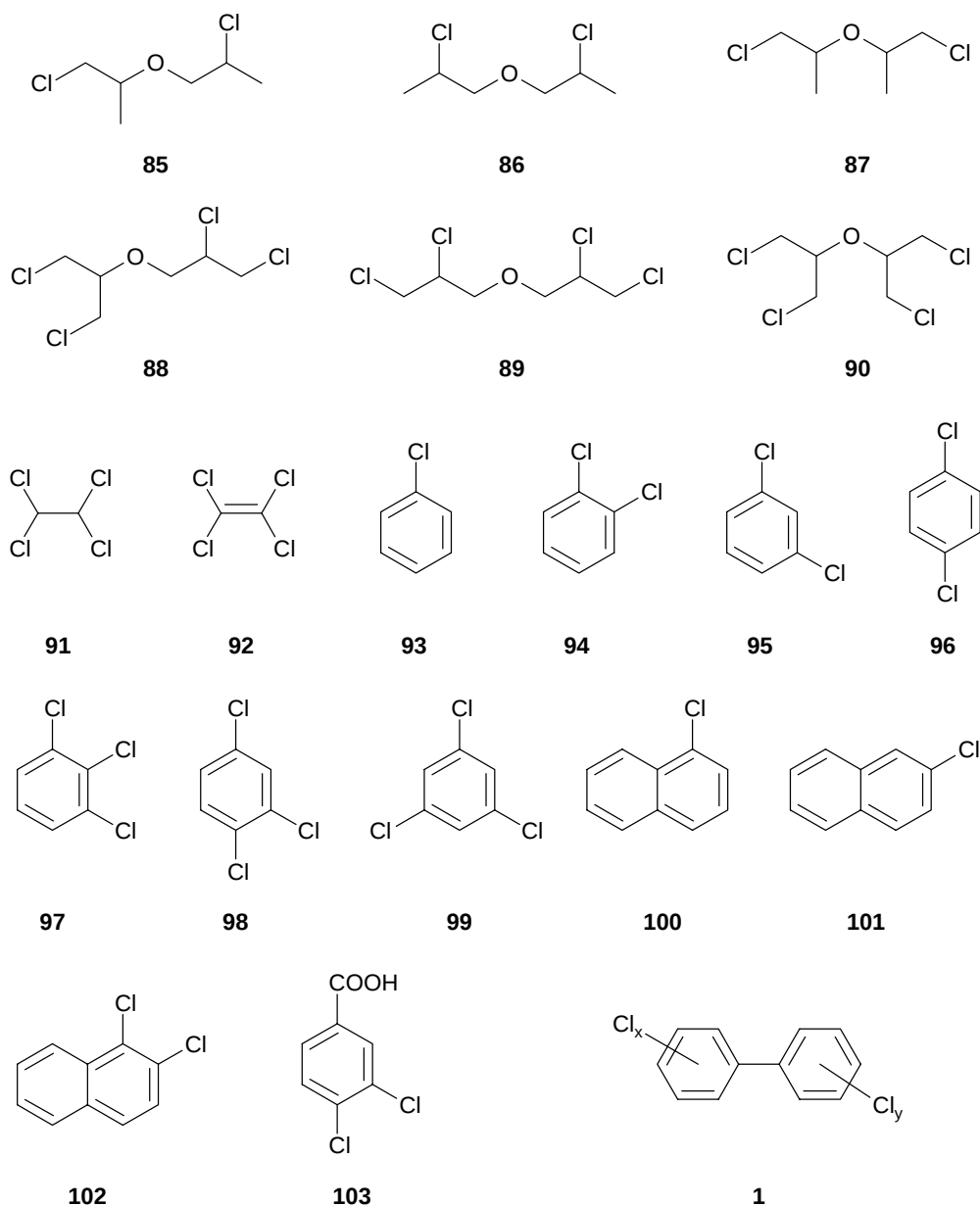


Abb. 3.36 Chlorierte Verbindungen in Odersedimenten

Polychlorierte Biphenyle PCB **1** sind vielbeachtete chlorierte Umwelt-Kontaminanten. Sie wurden aufgrund ihrer Unbrennbarkeit, thermischer Stabilität, hoher Siedepunkte und hoher Viskosität vielfältig eingesetzt. Verwendung fanden PCB seit den 1930er Jahren u. A. als Kühlmittel, Imprägniermittel, Hydraulikflüssigkeiten, Transformatorenöle, Schmiermittel, in Kondensatoren, sowie als Zusatz zu

Farben, Lacken und Klebstoffen. Weltweit wurden mehr als eine Million Tonnen PCB produziert und in die Umwelt gebracht [118]. PCB-Kongenere sind endokrin wirksam, immunotoxisch, erbgutschädigend, krebspromovierend und Blutbildverändernd [118].

In den Odersedimenten sind PCB, hauptsächlich Hexa- und Heptachlorbiphenyle sporadisch vor allem im Ober- und Unterlauf nachzuweisen. Im mittleren Bereich der Oder sind PCB nur selten und an der Nachweisgrenze in den Sedimenten aufzufinden. Insgesamt ist die Belastung mit PCB als schwach einzustufen, nur im Stettiner Haff (H3) sind leicht erhöhte Werte zu finden.

Allgemein sind Belastungen der Sedimente mit chlorierten Kohlenwasserstoffen, bis auf die Gebiete lokaler Punktquellen, als gering einzustufen. Im Stettiner Haff findet eine leichte Akkumulation der chlorierten Aromaten (Chlorbenzole, Chlornaphthaline, PCB) statt.

3.6.2.6 Pestizide

Auch das Auftreten von Pestiziden in den Odersedimenten von 1997 ist bestimmt durch lokale Einträge. Die in Abbildung 3.37 gezeigten Pestizide lassen sich aufgrund von Struktur und Vorkommen in den Odersedimenten in Gruppen einteilen: Verbindungen der DDT-Gruppe (DDT **104**, DDE **105**, DDD **106**), HCH (α -HCH **110**, β -HCH **111**, γ -HCH **112**), sowie die Organophosphate Bromophos **114** und Ethylbromophos **115**. 4,4'-Dichlorbenzophenon **107**, 2'-Hydroxy-2,4,4'-trichlordiphenylether (Triclosan) **108**, Aldrin **113** und Heptachlorepoxyd **116** treten jeweils auch einzeln auf.

DDT bezeichnet ein Gemisch aus ca. 70% 4,4'-DDT, 15%, 2,4'-DDT und 5% 4,4'-DDD. Es wurde schon 1939 als Insektizid eingeführt, und bisher sind weltweit mehr als 2 Millionen Tonnen in die Umwelt gelangt. DDT ist endokrin wirksam, immunotoxisch, erbgutschädigend und kanzerogen im Tierversuch [119]. Aufgrund dieser Eigenschaften, seiner Persistenz und der inzwischen ubiquitären Verteilung, wird weltweit versucht, auf den Einsatz von DDT zu verzichten. In (West-) Deutschland gilt ein Verkehrs-Verbot seit 1972. Bis zum Zusammenbruch des Warschauer Paktes wurde es aber in der DDR und östlichen europäischen Staaten großflächig angewendet.

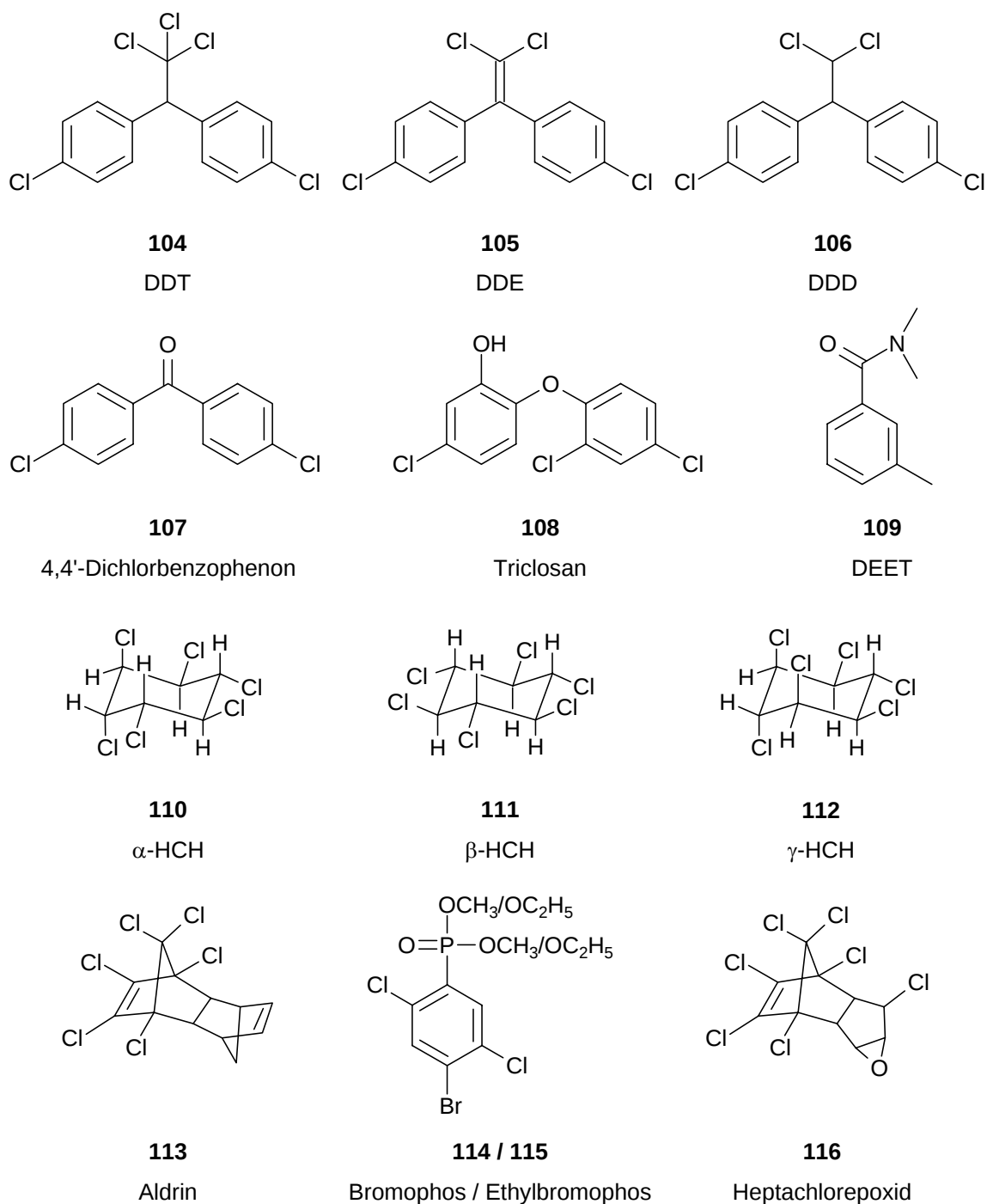


Abb. 3.37 Pestizide in Odersedimenten

4,4'-Dichlorbenzophenon **107** wird als anaerober DDT-Metabolit diskutiert und besitzt ähnliche toxikologische Eigenschaften [120]. Es ist weiter Hauptabbauprodukt der Akarizide Dicofol (2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)-ethanol) und Chlorbenzilat (4,4'-Dichlorbenzilsäureethylester), die beide zumindest innerhalb der EU verboten sind.

Die insektizide Wirkung von Hexachlorcyclohexanen (HCH) **110-112** ist seit 1933 bekannt. Von den Isomeren der technischen Mischung ist das γ -Isomer der eigentlich insektizide Wirkstoff. Alle HCH-Isomere wirken neurotoxisch. Die stärkste chronische Toxizität besitzt β -HCH **111** [121]. Aus diesem Grund wurde in Westdeutschland seit 1977 ausschließlich isomerenreines γ -HCH (Lindan) **112** verwandt. Analog zur Anwendung von DDT **104** wurde bis zum Zusammenbruch des Warschauer Paktes 1990 das technische Gemisch in der DDR weiterhin eingesetzt. Seit 2003 gilt EU-weit ein generelles Verbot für alle HCH-Isomere. Bromophos **114** und Ethylbromophos **115** sind aktuell verwandte Insektizide und Akarizide. Sie sind gleichfalls neurotoxisch und besitzen eine hohe akute Toxizität. Ihre Persistenz in der Umwelt ist jedoch deutlich geringer als die von DDT und HCH. Es gilt derzeit kein Verbot in der EU; allerdings werden Organohalogenphosphate im Rahmen einer allgemeinen Chemikalienrichtlinie einer Risiko-Überprüfung unterzogen. Aldrin **113** und Heptachlorepoxyd **116** sind strukturverwandte Insektizide aus dem Kontext der Cyclodien-Pestizide. Heptachlorepoxyd ist der Hauptmetabolit von Heptachlor. Es ist, wie Heptachlor, toxisch für Warmblüter und als Karzinogen eingestuft. Heptachlor darf in Deutschland nicht als Pflanzenschutzmittel angewendet werden. Aldrin ist hoch toxisch für Vögel und Fische. Bei Säugetieren verursacht es Leber- und Nierenschäden und wird im Fettgewebe angereichert. Aldrin ist seit 1981 in Deutschland verboten [3].

Triclosan **108** ist ein weit verbreitetes antibakterielles Desinfektionsmittel. Es findet sich auch in vielen Haushaltsprodukten wie Seifen, Deodorants, Zahnpasta, sowie in Kinderspielzeug, Plastikutensilien und Textilien. Es gilt als unbedenklich und ist toxikologisch nicht auffällig. Seine Fähigkeit zur Bioakkumulation und Berichte über Resistenzbildungen von Bakterienstämmen führen derzeit zu einer Überprüfung der Bewertung [122].

Für Verbindungen der DDT-Gruppe finden sich drei Schwerpunkte im Oderverlauf für 1997. Hervorzuheben sind die obere Oder bei Raciborz (F2) und Opole (F3), mit dem Zufluss Nysa Klodzka (N1), sowie der Bereich der Westoder (F14-F16), der Grenzfluss zu Deutschland ist. Hier lassen sich DDT, DDE und DDD nachweisen. Ein weiteres Maximum dieser Art findet sich mit dem Stettiner Haff (H3) als Schadstoffsенke. Im Zufluss Strzegomka/Bystrzyca (N2) zeigt sich eine etwas schwächere Belastung. Im sonstigen Verlauf der Oder kann jeweils nur der DDT-Hauptmetabolit DDE am Rand der Nachweisgrenze nachgewiesen werden. 4,4'-Dichlorbenzophenon tritt sowohl vergesellschaftet mit DDT, DDE und DDD (F3,

N1, N2, F5, F8, F9, F10, F12, F14-H3), als auch solitär (F4, F13) auf, so dass es sowohl Produkt des Abbaus älterer Belastungen mit DDT, als auch des Abbaus von Dicofol bzw. Chlorbenzilat sein könnte. Ein Eintrag von Dicofol und Chlorbenzilat ist jedoch aufgrund des begrenzten Anwendungsspektrums im Einzugsbereich der Oder nicht als wahrscheinlich anzusehen. HCH-Belastungen zeigen sich in zwei Regionen, in denen schon eine erhöhte DDT-Belastung gefunden wurde. In den Sedimenten der oberen Oder nach Opole (F3) und der Westoder vor Szczecin (F14-F16) sind α -, β - und γ -HCH mit einer Präferenz des γ -Isomers zu finden. Das gleiche Bild ergibt sich für Bromophos, Ethylbromophos, Aldrin und Heptachlorepoxyd: ein jeweils starkes Auftreten bei Opole und im Bereich der Westoder. Zusätzlich kommt hier eine Belastung des Stettiner Haffs (H3) mit diesen Verbindungen hinzu.

Triclosan zeigt eine andersartige Verteilung längs des Oderverlaufes. Als Komponente kommunaler Abwässer, nicht aus landwirtschaftlicher Nutzung, korreliert das Auftreten im Oberlauf (F2-F5, N2) und im Bereich der Westoder bis ins Stettiner Haff (F13, F15-H3) mit der dichteren Besiedlung dieser Regionen. N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET) **109** ist der am weitesten verbreitete Wirkstoff aus Mitteln zur Abwehr von Stechmücken, Zecken und Wanzen. In parallelen Wasseruntersuchungen ist es vielfach Hauptkomponente der Extrakte. In Sedimenten konnte es nur an den Probenahmeorten F9 und F11 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ergeben sich für die landwirtschaftlich genutzten Pestizide zwei Bereiche lokaler Einträge mit Opole und der Westoder. Das dort stark erhöhte Auftreten in den sonst nur gering mit Pestiziden belasteten Odersedimenten, lässt auf eine Ausspülung der landwirtschaftlich genutzten Flächen durch das Flutereignis dieses Jahres schließen. Die Verteilung von 4,4'-Dichlorbenzophenon längs des Oderverlaufes kann als Indikator für eine gleichmäßige, langjährige Belastung mit DDT angesehen werden. Auch der Zusammenbruch der örtlichen chemischen Industrie nach den politischen Umwälzungen in Mittel- bzw. Osteuropa 1990 und die Übernahme in Westeuropa etablierter neuerer Produkte, lässt frische Einträge aus direkter Anwendung von HCH und DDT, die im westlichen Europa bereits gebannt waren, unwahrscheinlicher werden. Triclosan, als inzwischen weit verbreitetes Desinfektionsmittel, kann für die Oder als weiterer Marker für kommunale Belastungen verwandt werden. Das Stettiner Haff erscheint als Senke für die persistenten Organohalogen-Pestizide. Die im Oderverlauf angetroffenen Verbindungen ließen sich hier in erhöhten Mengen nachweisen.

3.6.3 Austrag von Sedimenten durch das Flutereignis 1997

Im Rahmen der Probenkampagne August 1997 wurden neben den Sedimenten aus der Flussmitte an 6 geeigneten Orten zusätzlich Sedimente aus dem Uferbereich und/oder aus nahgelegenen, vor kurzem überfluteten Feldern entnommen (Tabelle 3.8). Ziel war die Risikoabschätzung der möglichen Austragung von organischen Schadstoffen aus Sedimenten der Oder in die umliegenden Landstriche, hervorgerufen durch die Oderflut 1997.

Die entsprechenden Ufersedimente wurden grundsätzlich feucht entnommen, die Sedimente aus umliegenden Feldern waren größtenteils trocken. Auch diese Proben wurden zum Vergleich einem Non-Target-Screening mittels GC-MS unterzogen. Verglichen wurden ca. 300 Verbindungen anhand ihrer Spektren und Retentionszeiten bzw. -indices, sowie durch Vergleich mit Referenzmaterial. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 3.12 (Anhang A).

Ort	Bezeichnung	Art
Wroclaw	F4	Fluss
	F4-U	Ufer
	F4-F	Feld
Brzeg Dolny	F5	Ufer
	F5-F	Feld
Czerna	F7	Fluss
	F7-U	Ufer
	F7-F	Feld
Polecko	F8	Fluss
	F8-U	Ufer
	F8-F	Feld
Urad	F9	Fluss
	F9-F	Feld
Slubice	F10	Fluss
	F10-U	Ufer
	F10-F	Feld

Tab. 3.8 Probenahmeorte für Vergleichsuntersuchungen an ausgetragenen Sedimenten (1997)

Insgesamt zeigen die Sedimente aus dem nahen Uferbereich und entfernten Umfeld eine hohe Übereinstimmung in Vorkommen und Verteilung der enthaltenen Substanzklassen. Innerhalb eines kompletten Sets eines Probenahmeortes (Fluss-, Ufer- und Feld-Sediment) lässt sich generell eine Abnahme der Konzentration der meisten Substanzklassen in Richtung der weiter ausgetragenen Sedimente beobachten. Diese Abnahme ist auf Verminderung durch erosive Prozesse (Verteilung), oxidativen bzw. photochemischen Abbau oder auf „Verdünnung“ mit örtlichem Material zurückzuführen. Der Einfluss des Verdünnungseffektes durch autochtones Material ließ sich durch Untersuchungen der Sesquiterpen-Verteilung in den Sediment-Sets zeigen. Sesquiterpene sind typische Inhaltsstoffe höherer Landpflanzen. Ihr erhöhtes Auftreten in den weiter ausgetragenen beprobten Materialien zeigt klar eine Vermischung mit örtlichem Material.

Entgegen dem allgemeinen Trend der Konzentrationsabnahme wurden für Pestizide, PCB und Verbindungen aus dem Kontext der Alkylphenolethoxylate teils erhöhte Mengen in den Ufer- und Fluss-Sedimenten ermittelt. Die Proben aus dem Gebiet vor Frankfurt/Slubice (F9F, F10U, F10F) wiesen hohe Konzentrationen an Pestiziden auf, während die Untersuchungen der entsprechenden Fluss-Sedimente keine nennenswerte Belastung zeigten. Analog konnten in den Fluss-Sedimenten Wroclaws und Poleckos (F4, F8) keine PCB nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Umlandes (F4F, F8F) bewies jedoch eine wenn auch geringe örtliche Belastung.

Für die Pestizide, insbesondere DDT, sowie PCB ist dieser Unterschied durch eine Belastung der umliegende Landstriche zu erklären. Die erwähnte Vermischung des durch Überflutung ausgetragenen Sediments mit örtlichem Material zeigt hier nicht eine Belastung der Umgebung mit diesen Schadstoffen, sondern legt einen gegenteiligen Effekt nahe. Die Problemstoffe aus den Feldern bzw. umliegenden Landstrichen können durch das Flutereignis ausgewaschen und durch Rückflutung in die Oder zusätzlich eingetragen worden sein.

Auffallend sind die großen Mengen an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auch in den ausgetragenen Sedimenten. Die Anteile der leichten PAK, wie Naphthalin, Acenaphthylen und Acenaphthen, im Verhältnis zu den höheren PAK variiert zwischen den Sets der Probenahmeorte.

In den Feldsedimenten F4F (Wroclaw) und F7F (Czerna) treten leichte PAK in nur geringem Umfang auf. Bei Polecko (F8F) und Slubice (F10F) sind sie in größeren Mengen zu beobachten. Die zu erwartende natürliche Abnahme der leichteren PAK an der Oberfläche durch Verdampfung und bessere Abbaubarkeit, wird anscheinend durch einen zusätzlichen Eintrag kompensiert. Der einhergehende Anstieg der alkylierten Naphthaline und Hetero-PAK legt einen petrogenen Ursprung dieses Eintrages nahe: Die mit der Über- bzw. Aufschwemmung zahlreicher Tanklager für Benzin, Diesel und Heizöl mobilisierten PAK sind hier durch die Breite des Überflutungsbereiches in die flussnahen Landschaften ausgetragen worden.

In den trockenen ausgetragenen Sedimenten F4F, F7F, F8F und F10F wurden die im Fluss-Sediment nicht nachgewiesenen Nonylphenolethoxylat-Metabolite Nonylphenolmono- (NP1EC) **117** und Nonylphenoldiethoxylatcarbonsäuren (NP2EC) **118** aufgefunden (Abb. 3.38, siehe auch Abb. 3.18, S. 47).

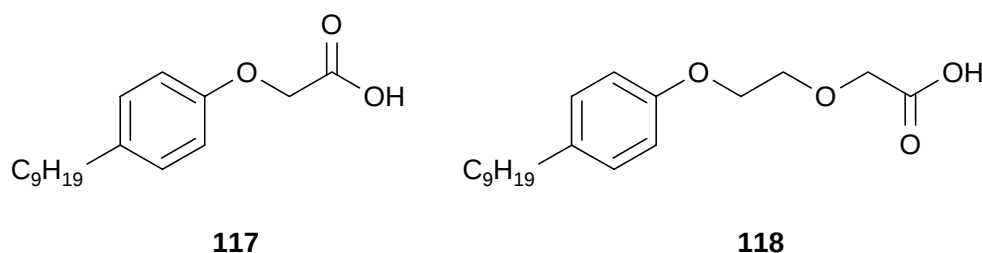


Abb. 3.38 Nonylphenolmono- **117** und Nonylphenoldiethoxylatcarbonsäure **118**

Die in diesen Proben beobachtete teilweise Abwesenheit von Nonylphenolen, lässt sich anhand des Abbauverhaltens der Alkylphenolpolyethoxylate APEO erklären (siehe Kapitel 3.6.2.2). In den ausgetragenen Sedimenten verbleiben somit vermehrt die Alkylphenolethoxylatcarbonsäuren.

In dem durch hohe Konzentrationen chlorierter Pestizide aufgefallenen Sediment F10F aus Frankfurt/Slubice konnte auch Endosulfansulfat **120** nachgewiesen werden. Endosulfansulfat ist der Hauptmetabolit beim Abbau des Insektizids Endosulfan **119** unter oxidischen Bedingungen.

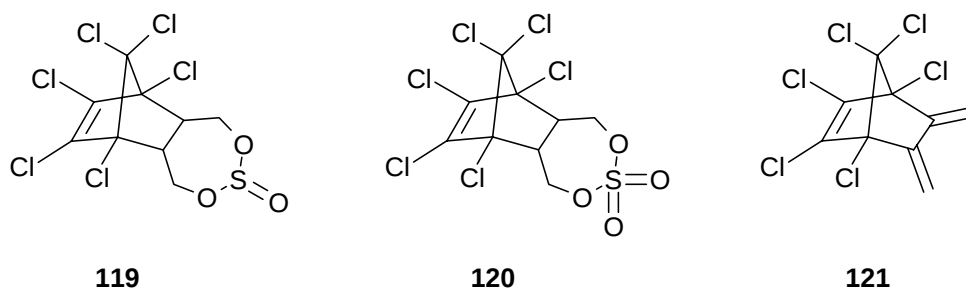


Abb. 3.39 Strukturen von Endosulfan **119**, Endosulfansulfat **120** und 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en **121**

In dieser Probe fand sich auch eine zunächst nicht zuzuordnende hochchlorierte Verbindung. Die Untersuchung ihres Massenspektrums zeigte das Vorhandensein von 6 Chloratomen, wie sie auch die bereits nachgewiesenen Cyclodien-Insektizide Aldrin und Endosulfan besitzen (Abbildung 3.40). Die kürzere Retentionszeit und ein Massenunterschied von 98 amu ([H₂SO₄]) zu Endosulfansulfat bzw. 82 amu ([H₂SO₃]) zu Endosulfan legten nahe, dass es sich um ein Abbauprodukt des Endosulfans bzw. Endosulfansulfats 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en **121** handelt. Die Synthese aus Endosulfansulfat bestätigte die Richtigkeit dieses Strukturvorschlags [32].

1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en ist im Kontext der Umweltchemie und als Abbauprodukt des Endosulfans bisher noch nicht beschrieben worden. Aufgrund des singulären Vorkommens kann die Bedeutung dieser neuen Umweltkontaminante noch nicht abgeschätzt werden. Hier müssen weitere Untersuchungen zur Bewertung ihrer Umweltrelevanz unternommen werden.

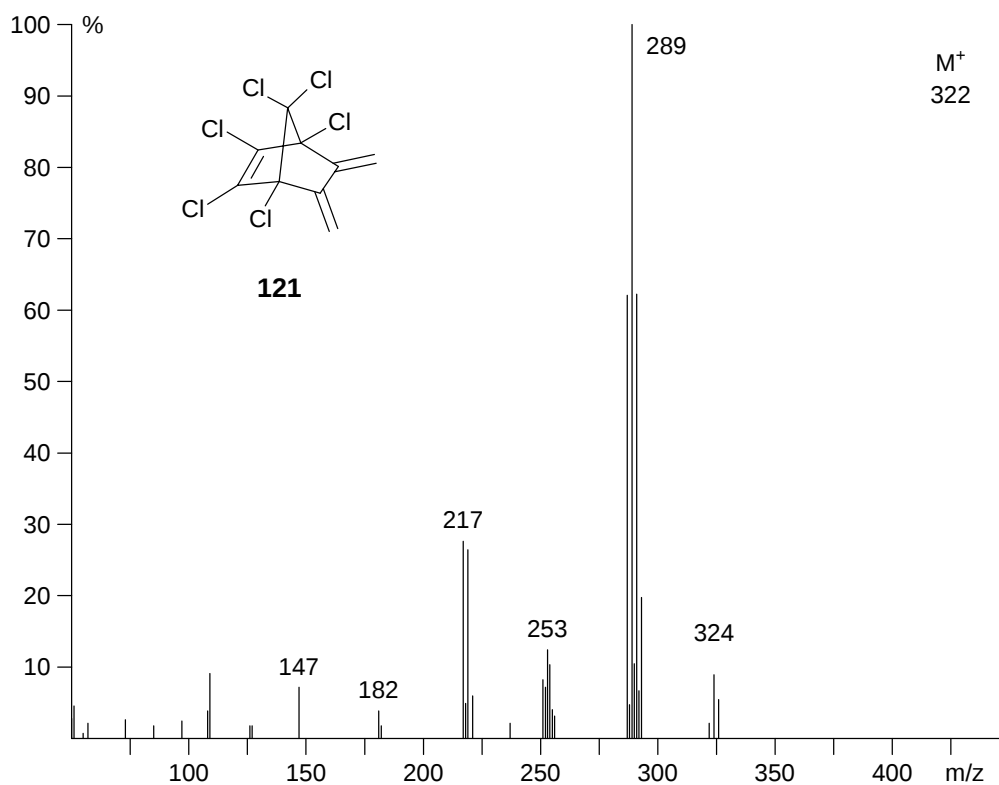
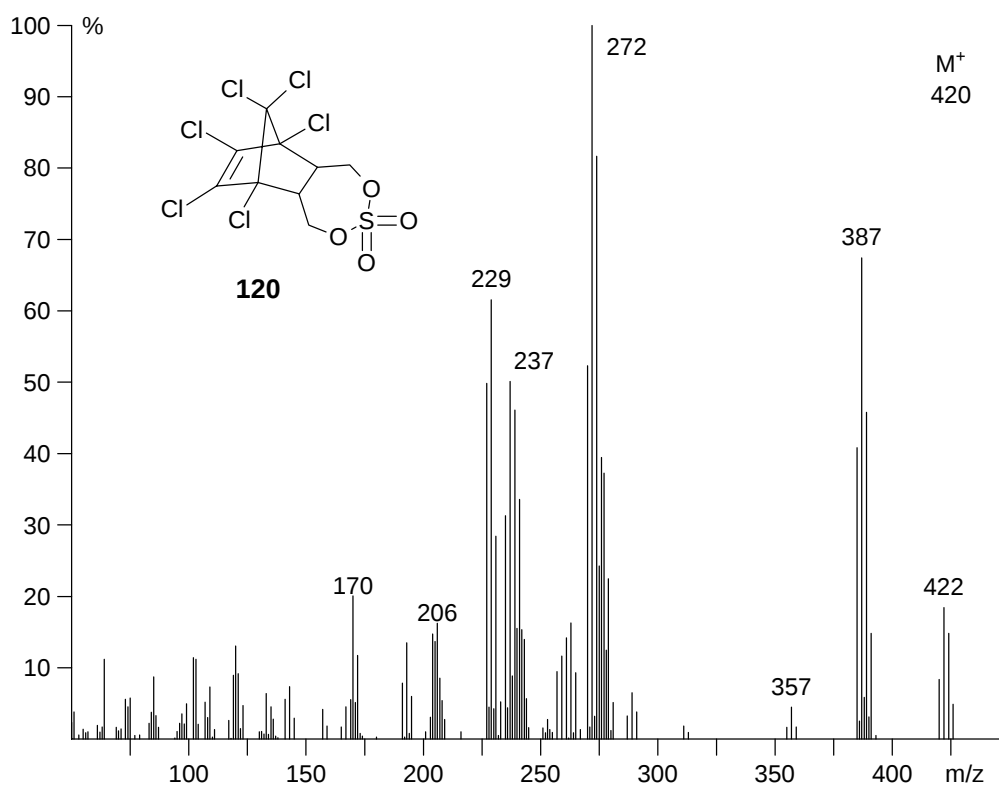


Abb. 3.40 Massenspektren von Endosulfansulfat **120** und 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylen)-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en **121**

3.6.4 Vergleichsuntersuchungen 1997 / 1998 / 1999

Zwei weitere Probenkampagnen des IOP-Projektes in den Jahren 1998 und 1999 ermöglichten eine Beobachtung zeitlicher Veränderungen der Belastungssituation der Odersedimente. Die Probenahmeorte, bei denen Vergleichsuntersuchungen durchgeführt werden konnten, sind der Tabelle 3.5 (Kapitel 3.5) zu entnehmen. Tabelle 3.11 (Anhang A) zeigt den Vergleich der Sedimentinhaltsstoffe der Jahre 1997-1999. Aufgrund der geringeren Anzahl von Vergleichssedimenten sind Aussagen über Trends im Oderverlauf beider folgenden Jahre nur bedingt zu machen. Zeitliche Aussagen beinhalten Unsicherheiten aufgrund unbekannter lokaler Ereignisse sowie der starken Effekte des Flutereignisses 1997 und der geringeren Wasser- und Geschiebefrachten für die Jahre 1998-1999.

Im Bereich der biogenen Verbindungen zeigen die Proben erwartungsgemäß eine hohe Übereinstimmung in Vorkommen, Pattern und Gehalt. Die beobachteten Abweichungen entsprechen der normalen Variabilität aufgrund von Unterschieden in der Beschaffenheit der Probenmatrix und der genauen Lokalität des Probenahmeortes. Der Vergleich der anthropogenen Sedimentinhaltsstoffe ergibt dagegen ein uneinheitliches Bild.

Fäkalsteroiden zeigen eine leicht veränderte Verteilung gegenüber 1997, die aber genauso durch lokale Einträge geprägt ist. Für 1998 und 1999 findet sich nun ein vorher nicht beobachtetes Maximum kommunaler Belastung im Bereich des Zuflusses der Strzegomka über Bystrzyca in die Oder (N2, F5). Die dem Abbau von Tensiden entstammenden längerkettigen n-Alkylbenzole LAB sind in den Jahren 1997 und 1998 weiter im gesamten Oderverlauf stark präsent. Der schon für 1997 gezeigte kontinuierliche Eintrag zeigt eine andauernde starke Belastung durch unzureichend geklärte kommunale Abwässer.

Das Auftreten der Abbauprodukte der Alkylphenolpolyethoxylate AP und APEO ist nicht so kohärent wie das der LAS. Beachtenswert ist 1998 der Nachweis von Octylphenolen (OP) in höheren Konzentrationen als die Nonylphenole (NP) am Probenahmepunkt N2 (Strzegomka). OP konnten dort auch 1999 noch aufgefunden werden. Einträge aus kommunalen Abwässern zeigen jedoch immer deutlich größere Anteile an Nonylphenolen. Aufgrund der allgemein beobachteten Auffälligkeit des Bereichs Strzegomka/Bystrzyca in Bezug auf industriell eingetragene Schadstoffe in Wasser und Sediment scheint daher auch hier dieser Pfad wahrscheinlich.

Die Geruchsstoffe Galaxolide und Tonalide zeigen auch in den folgenden Jahren das gleiche Verhalten wie 1997. Als kommunaler Marker korreliert ihr Auftreten mit der Bevölkerungsdichte des lokalen Einzugsgebietes.

Auch das Bild der PAK-Belastung zeigt kaum zeitliche Veränderungen. Sie ist auch für die Jahre 1998 und 1999 als hoch bis sehr hoch einzustufen. Weggefallen ist der teilweise hohe Anteil petrogener PAK, sichtbar durch eine Verringerung der Konzentrationen an alkylierten Vertretern. Dies stützt die Vermutung, dass diese petrogene Belastung 1997 durch Überflutung von Treibstoff-Lagerstätten während der Oderflut hervorgerufen wurde.

Der Vergleich des Auftretens der Pestizide macht die zeitliche und örtliche Abhängigkeit des Einflusses von Problemstoffen besonders deutlich. So lässt sich für 1998 an der Mündung der Oder in das Stettiner Haff (Roztoka Odranska, H1) eine Belastung mit DDT, DDD, DDE, Triclosan, α -HCH, Aldrin, Bromophos, Ethylbromophos und Heptachlorepoxyd feststellen, während 1997 DDE, Triclosan und p,p'-Dichlorbenzophenon einzig nachweisbar waren und 1999 nur Triclosan aufgetreten war. Auffällig ist auch das Fehlen der 1997 beobachteten hohen Mengen an Pestiziden im nördlichen Teil des Stettiner Haffs (H3) für die Jahre 1998 und 1999. Die vermutete Akkumulierung dieser Verbindungen im Sediment des Stettiner Haffs scheint ein durch das Flutereignis 1997 ausgelöstes aber zeitlich begrenztes Ereignis gewesen zu sein. Das Haff bildet eine Art Flaschenhals und hält zunächst die Sedimente der Oder zurück, so dass Austrag und Auswaschung in die Ostsee zeitlich verzögert erfolgen.

Allgemein scheint die Belastung durch eine Vielzahl anthropogener Schadstoffe, z.B. PCB, chlorierte Aromaten, petrogene PAK und Alkane eine rückläufige Tendenz für die Jahre 1998/1999 zu besitzen. Die gleich hohe, teilweise sogar erhöhte Belastung mit PAK aus Kohle und Mineralölverbrennung und durch kommunale Abwässer zeigt auch weiterhin zwei wesentliche Faktoren auf, die die Reinheit der Oder beeinflussen: Kommunale Abwässer werden nur unzureichend aufgearbeitet, oft sogar ohne jede Behandlung eingeleitet, und Emissionen aus Kohle und Mineralölnutzung durch Industrie, Verkehr und Kommunen werden nicht genug eingeschränkt.

Benzothiazole

Die in der Probenkampagne von 1997 in parallelen Wasseruntersuchungen [29] der Strzegomka in großen Mengen gefundenen Benzothiazolderivate konnte 1997 zunächst nicht in den Sedimenten nachgewiesen werden. In dem entsprechenden Sediment N2 des Jahres 1998 wurden 8 Benzothiazole in nicht unerheblichen Mengen identifiziert (Abbildung 3.42). Abbildung 3.41 zeigt die in der methylierten Methanol-Fraktion aufgefundenen Verbindungen 1,3-Benzothiazol **122**, 1,2,3-Benzothiadiazol **123**, 2-Methyl-1,3-benzothiazol **124**, 2-Methoxy-1,3-benzothiazol **125**, 2-(Methylthio)-1,3-benzothiazol **126**, 2-Phenyl-1,3-benzothiazol **127**, 2-(Phenylthio)-1,3-benzothiazol **128** und N-Phenyl-1,3-benzothiazol-2-amin **129**. Weitere 6 Verbindungen scheinen aufgrund ihrer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Eigenschaften eine Benzothiazol-Struktur zu enthalten (Abbildung 3.42). Eine genaue Zuordnung konnte aufgrund der geringen Mengen und wenig aussagekräftiger Massenspektren, sowie fehlendem Referenzmaterial nicht vorgenommen werden. Diese Benzothiazole wurden auch in Wasseruntersuchungen der Oder des Jahres 1997 als prominente Vertreter dieser Schadstoffklasse beschrieben [29].

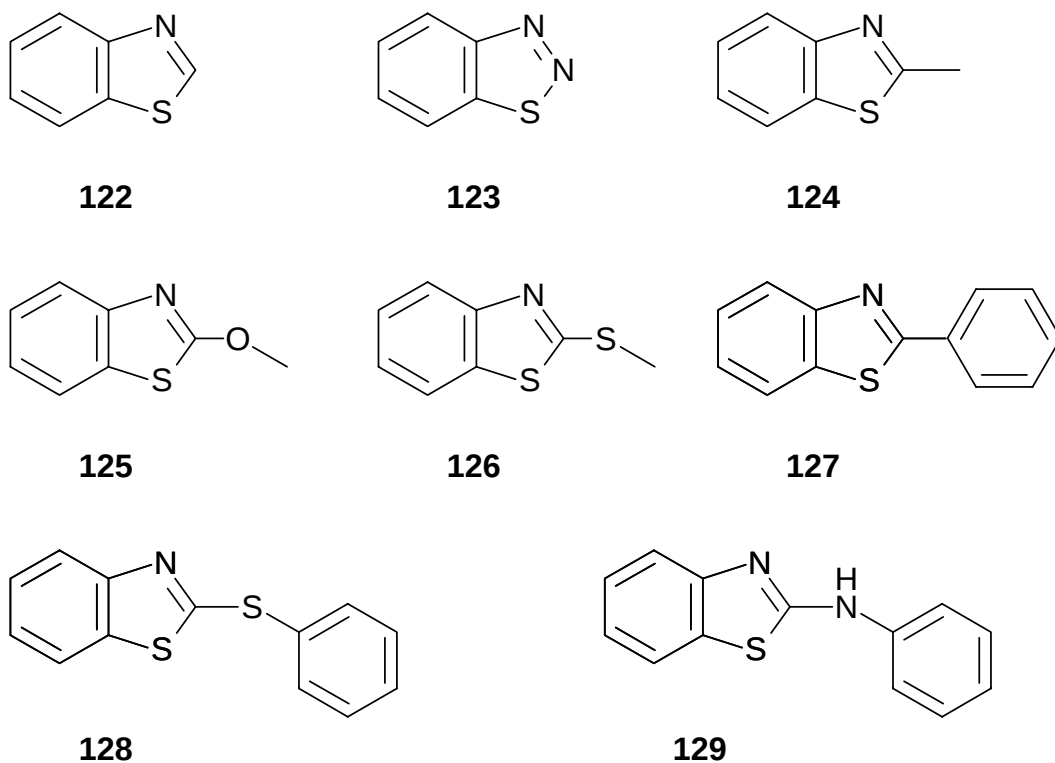


Abb. 3.41 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): in der methylierten 6. Fraktion identifizierte Benzothiazole

1,3-Benzothiazol **122**, 1,2,3-Benzothiadiazol **123**, 2-Methyl-1,3-benzothiazol **124**, 2-Methoxy-(bzw. Hydroxy)-1,3-benzothiazol **125** und 2-(Methylthio)-1,3-benzothiazol **126** konnten auch noch nach der Einmündung der Strzegomka/Bystrzyca in die Oder bei Brzeg Dolny (F5) in erhöhten Mengen nachgewiesen werden. In dieser Probe war 2-Methoxy-1,3-benzothiazol **125** der prominenteste Vertreter, während bei Brzeg Dolny (F5) für 2-(Methylthio)-1,3-benzothiazol **126** die höchste Menge detektiert wurde. Ein weiterer Eintrag dieser zuletzt genannten Vertreter der Stoffklasse wurde 1998 bei Frankfurt/Slubice (F10) in ähnlicher Konzentration gefunden. 1999 konnte kein Eintrag von Benzothiazolen im Verlauf der Oder bis Szczecin nachgewiesen werden. In den Sedimentproben des Stettiner Haffs (H1, H4) fanden sich jedoch 1,3-Benzothiazol **122** und 2-Methyl-1,3-Benzothiazol **124**, die 1997 und 1998 dort nicht detektiert werden konnten. Hier könnte ein Schadstofftransport der früheren Einleitungsereignisse in Fluss-Richtung unter weiterführender Metabolisierung stattgefunden haben. Auch hier bildet das Haff scheinbar zunächst eine Senke der eingetragenen Schadstoffe.

2-Methyl-1,3-Benzothiazol **124** ist ein bekannter Umweltschadstoff in Gewässern [116]. Benzothiazole stehen im direkten Zusammenhang mit der Produktion von Gummi und Gummiprodukten. Sie sind die wichtigsten kommerziell eingesetzten Vertreter der sogenannten Vulkanisationsbeschleuniger. Zwar muss auch von Belastungen eines Gewässers mit Benzothiazolen durch Straßenstaub und kommunale Abwässer ausgegangen werden, jedoch legen die hohen Mengen gefundener Benzothiazole die Vermutung starker lokaler Quellen nahe, also Produktionsstandorte für Vulkanisationsbeschleuniger. Es muss von mindestens einer solchen Fabrik im Einzugsgebiet der Strzegomka ausgegangen werden.

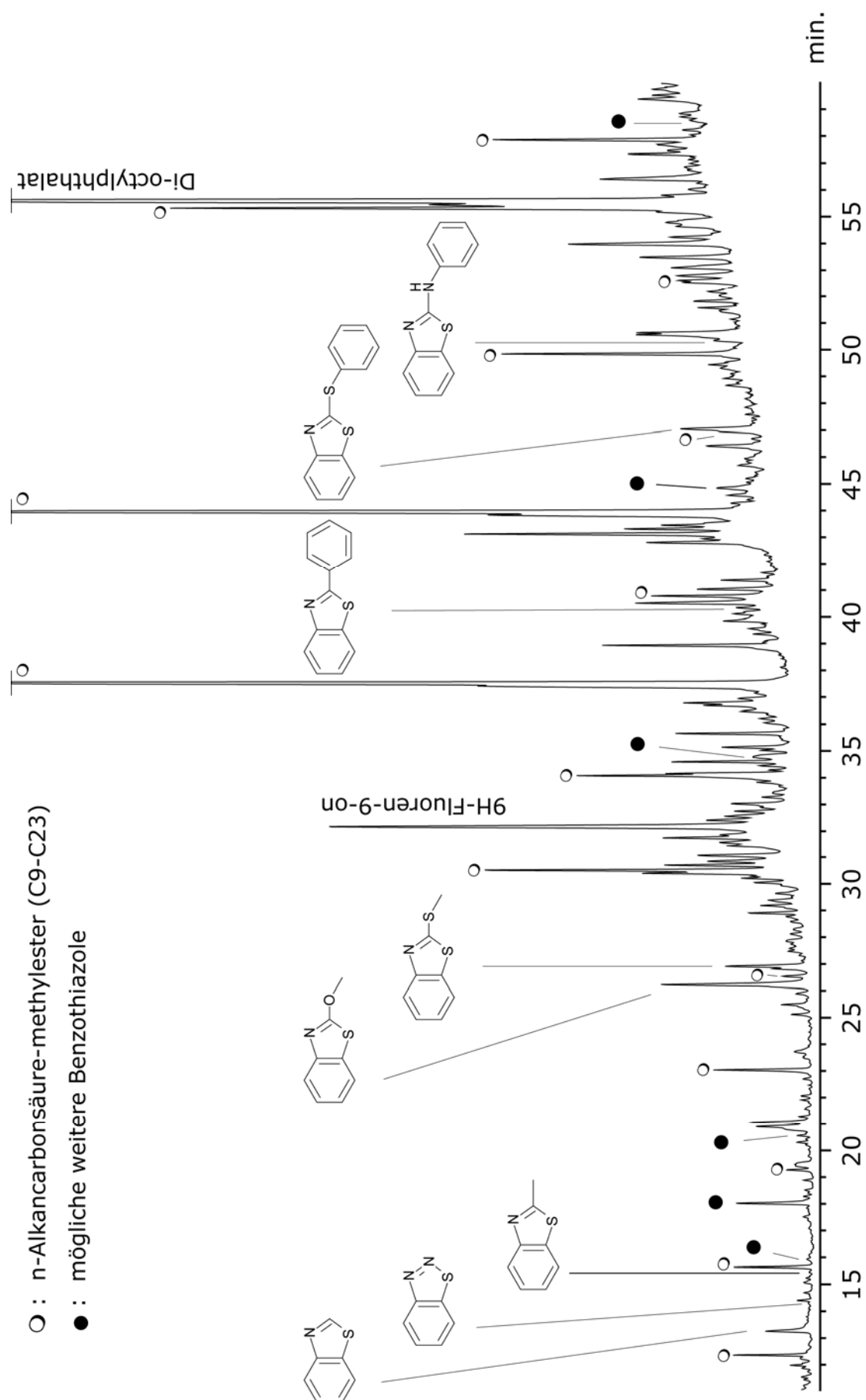


Abb. 3.42 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): Totalionenstromchromatogramm der methylierten 6. Fraktion

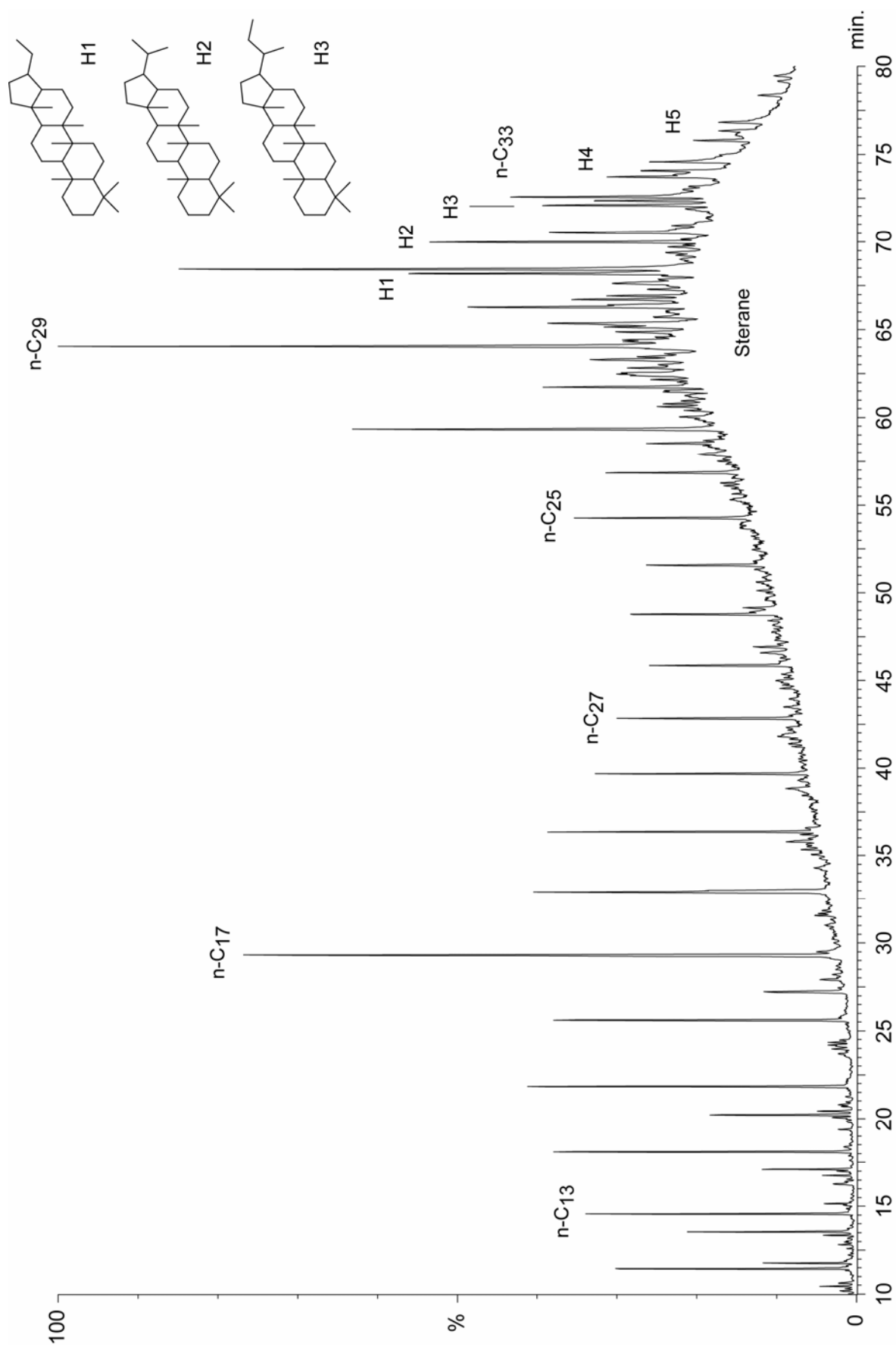


Abb. 3.43 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 1. Fraktion

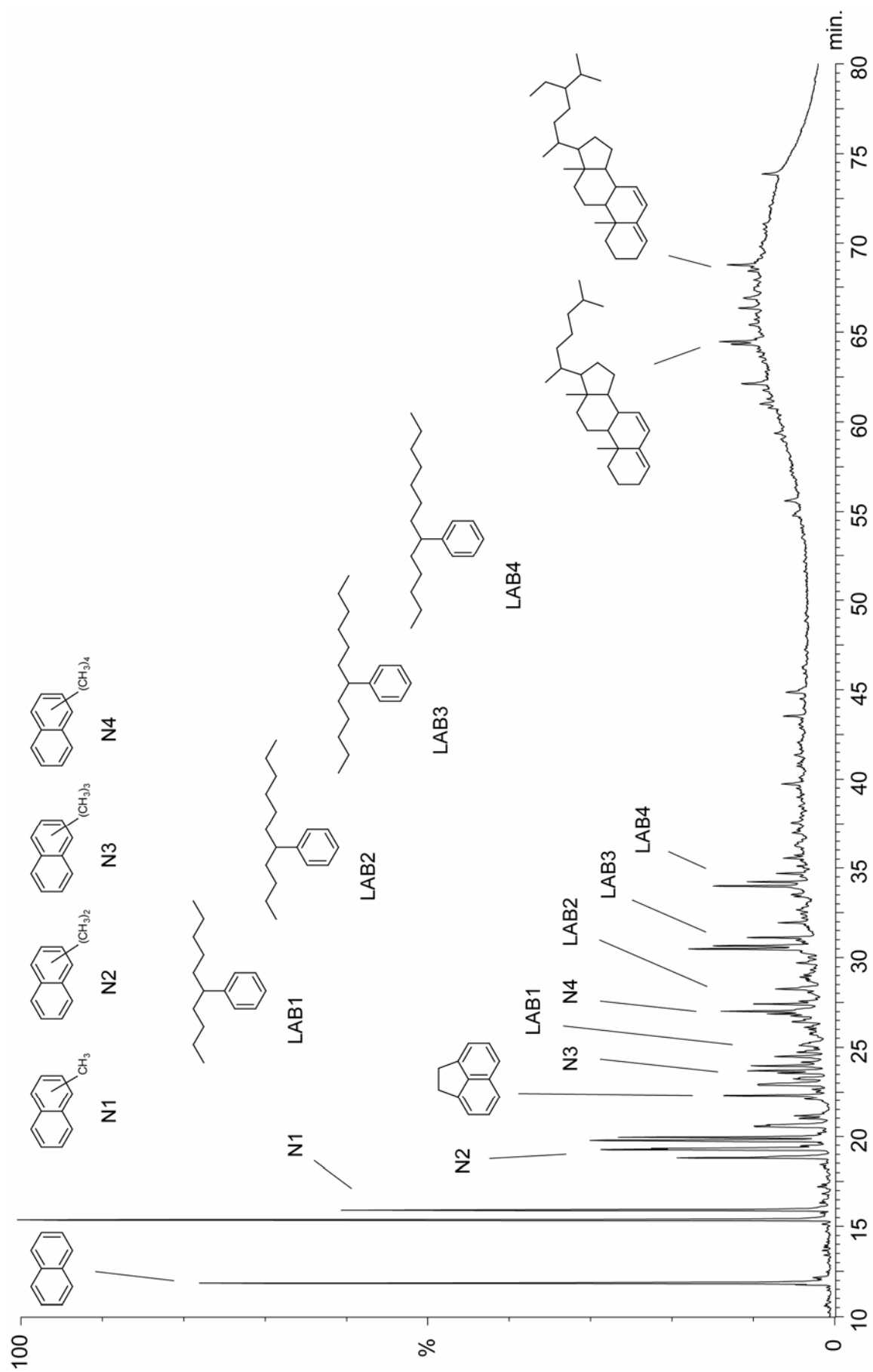


Abb. 3.44 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 2. Fraktion

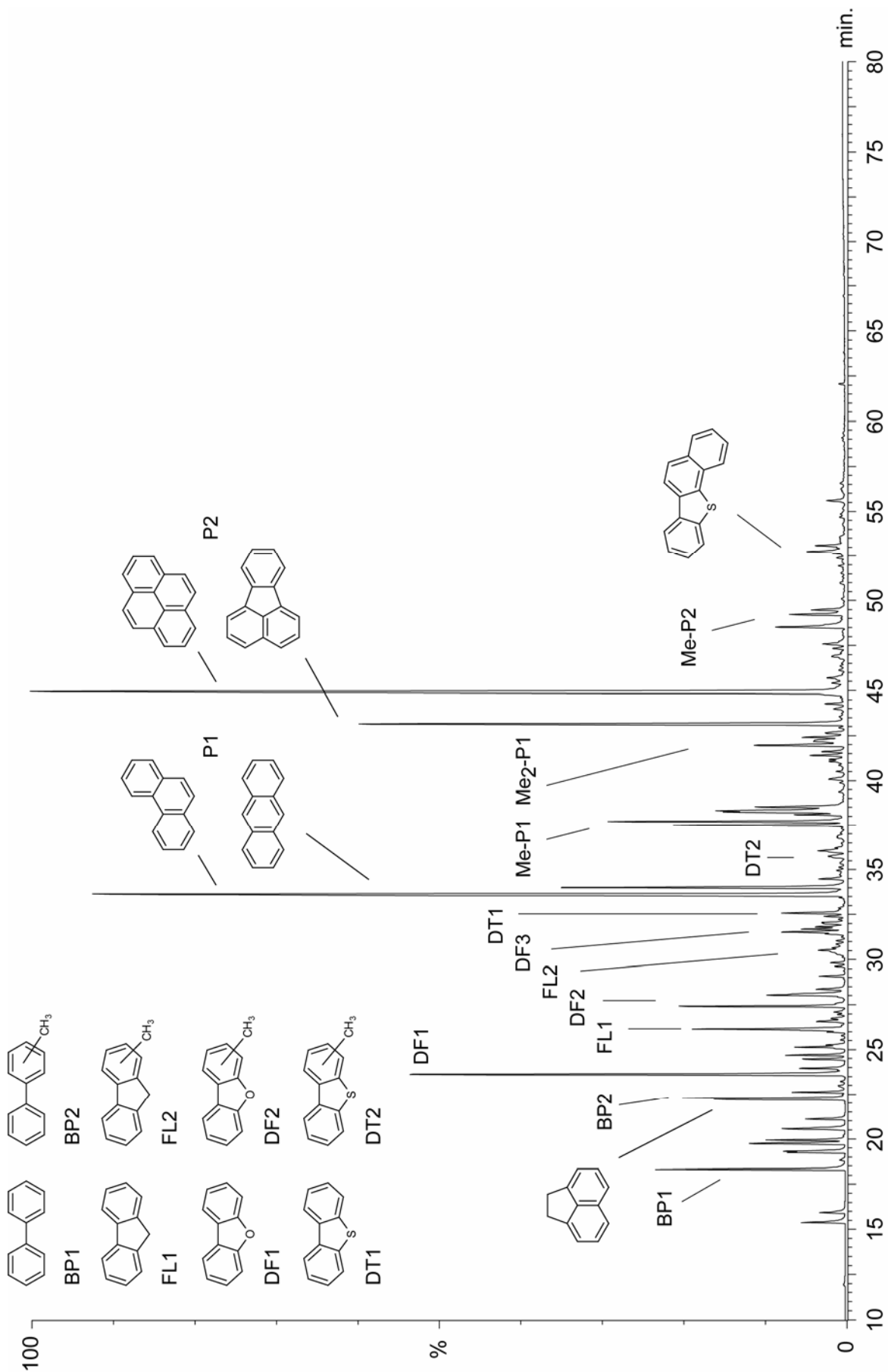


Abb. 3.45 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 3. Fraktion

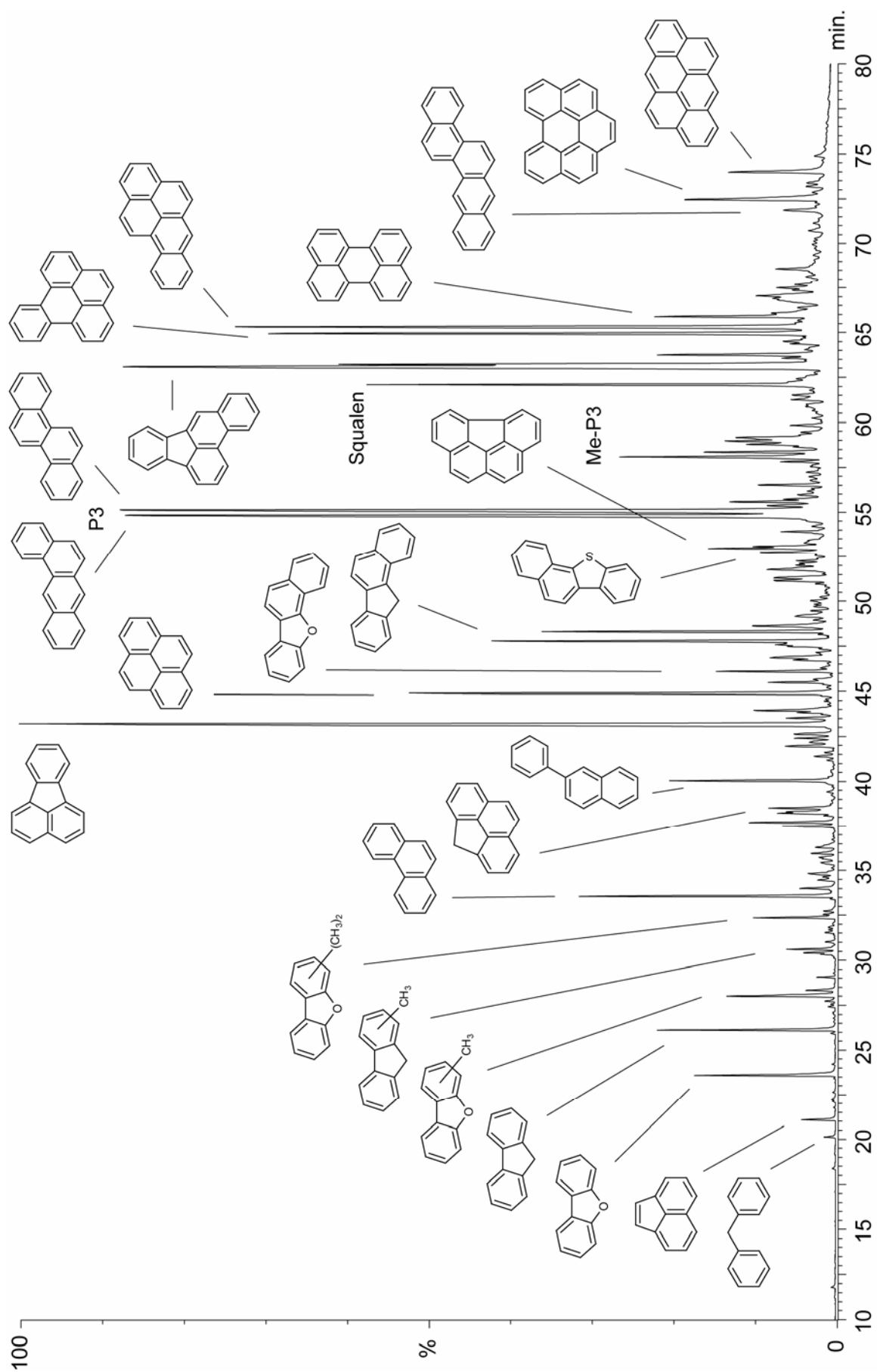


Abb. 3.46 Sediment N2 (Strzegomka, 1998): GC/MS-Chromatogramm der 4. Fraktion



92

4 Identifizierung einer unbekannten Grundwasserkontaminante

Dieser Abschnitt behandelt die Identifizierung und Synthese einer in Wasserproben aus stillgelegten Grundwasserförderbrunnen in der Elbmarsch bei Marschacht aufgefundenen und später in der gesamten Elbe flussabwärts von Pardubice (Tschechische Republik) sowie in der Oder nachgewiesenen Substanz [113].

Anlass war eine Anfrage der ehemaligen Bezirksregierung Lüneburg, deren Staatliches Amt für Wasser und Abfall bei Überwachungsuntersuchungen 1991 eine unbekannte Substanz im Grundwasser aufgefallen war. Die Behörden hatten sich zuvor bereits an verschiedene Firmen und staatliche Einrichtungen gewandt (Labor für Geoanalytik, Hildesheim; Institut für Wasser-, Boden-, Lufthygiene des Umweltbundesamtes, Berlin; Hewlett-Packard, Frankfurt, Bayer AG, Leverkusen; Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg) von denen die Struktur der Substanz jedoch nicht aufgeklärt worden war.

4.1 GC/MS-Analytik

Durch Festphasenextraktion (SPE) gewonnene Extrakte kontaminierter Wasserproben wurden von der Bezirksregierung Lüneburg zur Verfügung gestellt. Durch Kooperation mit der Wassergütestelle Elbe der Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe (ARGE Elbe) konnten darüber hinaus Abwasserproben der chemischen Fabrik VCHZ Semtin erhalten werden.

GC/MS-Analysen der SPE-Proben sowie von Dichlormethanextrakten der Abwasserproben lieferten das Massenspektrum der unbekannten Substanz (Abbildung 4.1) in Übereinstimmung mit den Daten oben genannter Institutionen. Exakte GC/MS-Massenbestimmungen bei hoher Spektrometer-Auflösung (R 10 000) ergaben $C_{13}H_{17}N_3O_3$ als Elementarzusammensetzung des Moleküls $m/z = 263$. Das Basis-Ion m/z 72 erwies sich als Dimethylaminoacyl-Fragment mit der Zusammensetzung C_3H_6NO .

Eine Beilstein-Recherche nach Summenformel und Dimethylaminoacyl-Fragment ergab eine überschaubare Anzahl von Substanzen, unter denen die in Abbildung 4.1 gezeigte am besten zur Erklärung der massenspektrometrischen Fragmentierung geeignet erschien [123].

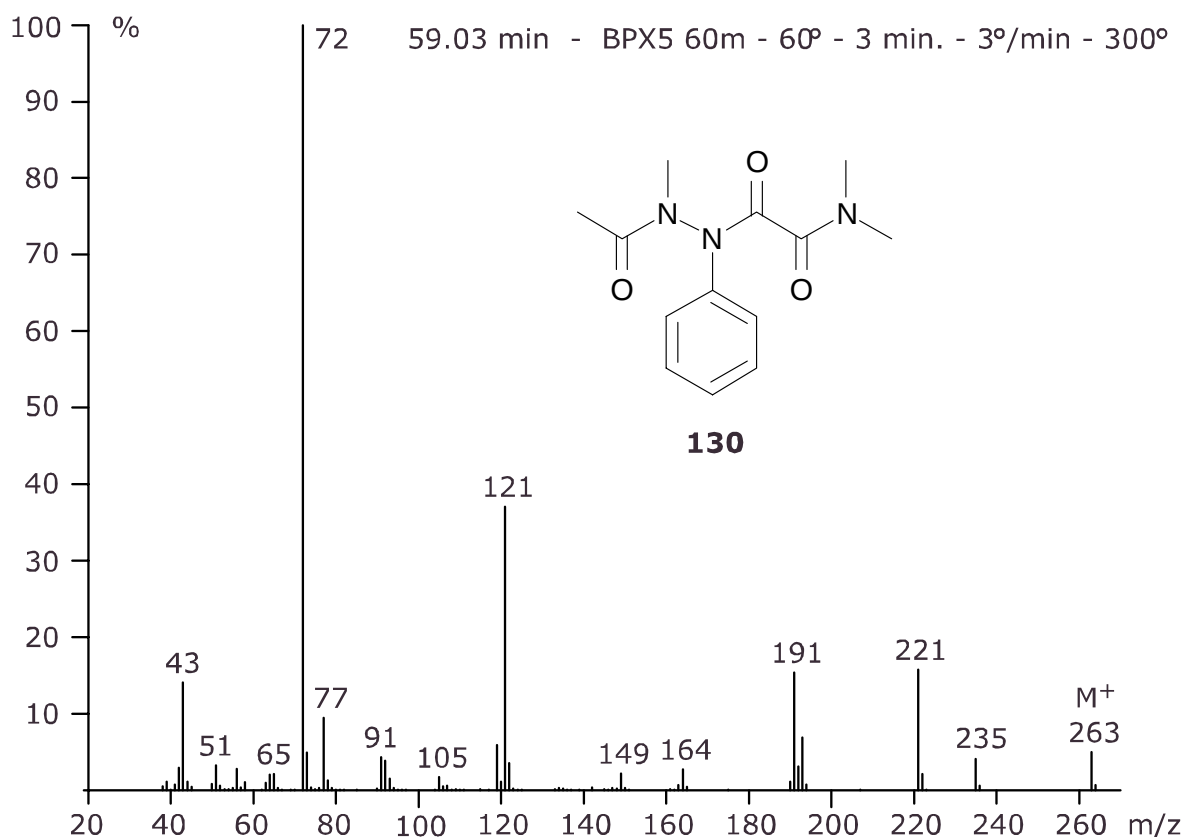


Abb. 4.1 Massenspektrum (70 eV) der unbekannten Verbindung aus Elbmarschproben.

Das Molekölion $m/z = 263$ verliert demnach 28 amu zum ersten Fragmention $m/z = 235$ ($C_{12}H_{17}N_3O_2$) aufgrund einer Extrusion von CO. $M/z = 43$ entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Acetylgruppe CH_3CO^+ . Die Abspaltung von Keten aus dem Molekölion führt zum zweiten Fragmention $m/z = 221$ ($C_{11}H_{15}N_3O_2$). $M/z = 193$ ist die Kombination dieser beiden Differenzen. Weitere 42 amu Differenzen finden sich mit 191 zu 149 und 164 zu 122. Mit $m/z = 72$ als $(CH_3)_2NCO^+$ - und $m/z = 121$ als phenylhaltiges Fragment $C_7H_9N_2$ wurde für die Struktur das Phenylhydrazin-Derivat **130** mit enthaltener N,N-Dimethylamid-Struktur angenommen.

Entsprechende Fragmentierungen konnten in der Literatur für 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid **130** nachvollzogen werden [124]. Da diese Verbindung nicht kommerziell erhältlich ist, musste sie als Referenz synthetisiert werden. Es ist bekannt, dass Phenazon-Derivate photochemisch unter Ringöffnung abgebaut werden [125]. Der Strukturvorschlag ist als Abbauprodukt von 4-(Dimethylamino)-1,5-dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (4-Dimethylaminoantipyrin) **132** aus diesen Veröffentlichungen bekannt.

Zur Vermeidung eines langwierigen mehrstufigen Strukturaufbaues wurde der Weg über die gezielte photochemische Oxidation unter Ringöffnung gewählt. Hierzu wurde in Anlehnung an Literatur-bekannte Reaktionen 4-Dimethylaminoantipyrin **132** mit Singulett-Sauerstoff unter Zuhilfenahme des Photosensibilisators Rose Bengal behandelt (Abbildung 4.4). Die Synthese ist in Kapitel 4.3 beschrieben.

Der Vergleich der Massenspektren und gaschromatographischen Retentionszeiten, sowie die Analyse einer Mischprobe, erbrachten vollständige Übereinstimmung von Massenspektrum und Retentionszeit. Somit konnte die Verbindung als 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid (**130**) identifiziert werden. Abbildung 4.2 zeigt die als wahrscheinlich angenommene elektronenstoß-induzierte MS-Fragmentierung, die die Bildung der wesentlichen Fragmente erklärt.

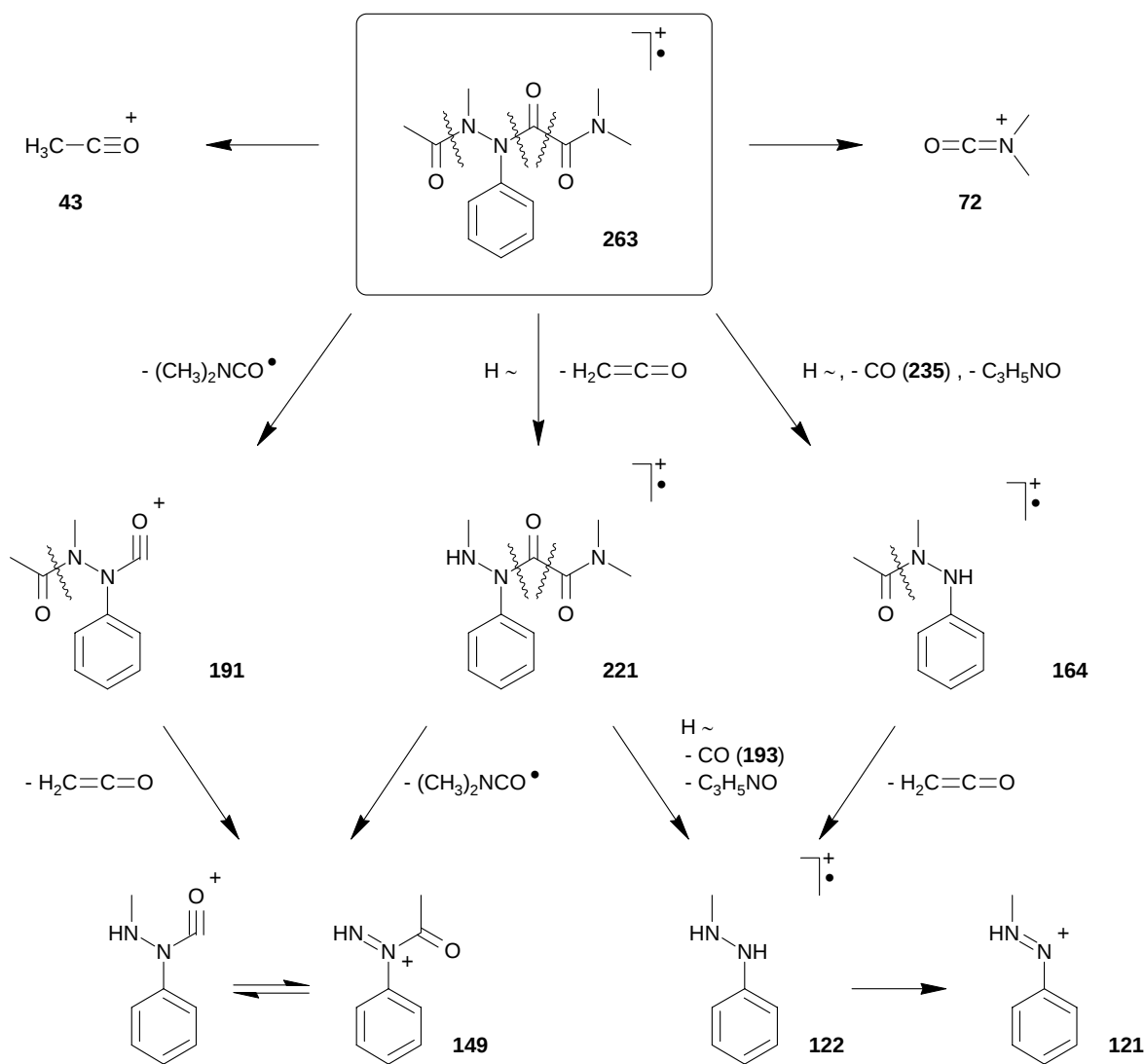
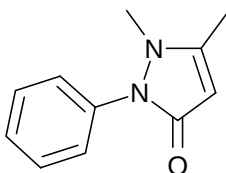


Abb. 4.2 Mögliches MS-Fragmentierungsverhalten von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid **130**

4.2 Herkunft und Bedeutung der identifizierten Kontaminante

Schon die Untersuchungen zur Bestimmung der Struktur bzw. einer geeigneten Synthese ergaben den Hinweis auf die Herkunft dieser Kontaminante. Phenazon-Derivate (Phenazon: 1,5-Dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-on **131**, Abbildung 4.3) wirken als Arzneimittel analgetisch, antipyretisch und spasmolytisch und werden u.A. schmerzlindernd gegen Kopf-, Muskel und Menstruationsbeschwerden eingesetzt. Das Ausgangsprodukt zur Synthese des Referenzmaterials, 4-Dimethylaminoantipyrin **132**, besitzt den Markennamen Pyramidon. Es ist eines der ältesten synthetischen Schmerzmittel. Es wurde 1978 aufgrund der Bildung karzinogener Nitrosamine vom Markt genommen [126].



131

Abb. 4.3 Phenazon **131**

Neben der hier beschriebenen Identifizierung 1996 und dem Auftreten in Elbe und Oder [29], wurde 2002 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid **130** ebenfalls als Metabolit des Pyramidons im Berliner Grundwasser beschrieben [127]. Als Quelle wurden Altlasten einer ehemaligen Pharmaproduktion im nördlichen Berlin an der Havel genannt. Studien dieser Arbeitsgruppe zur Toxikologie zeigten keine akute menschliche Gefährdung in den beobachteten Konzentrationen.

4.3 Synthese von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid (**130**)

Zur Darstellung von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid wurde 4-(Dimethylamino)-1,5-dimethyl-2-phenyl-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-on (4-Dimethylaminoantipyrin) **132** photochemisch unter Ringöffnung oxidiert.

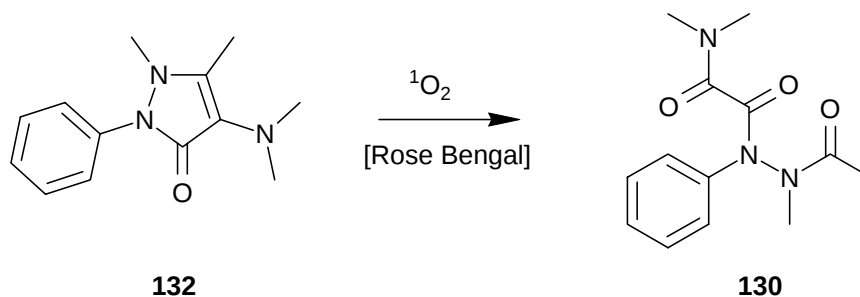


Abb. 4.4 Synthese 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid **130** aus 4-Dimethylaminoantipyrin **132**

Dazu wurden 1.00 g (4.32 mmol) 4- Dimethylaminoantipyrin in 250 ml wässriger Pufferlösung pH= 7.4 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Rose Bengal wurde die Lösung 15 min mit Sauerstoff gesättigt und unter leichter Durchgasung von Sauerstoff 8 Stunden mit einer UV-Lampe (254nm) bestrahlt. Nach Extraktion mit Dichlormethan und Trocknung über Magnesiumsulfat wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie mit Chloroform als mobiler und Kieselgel als stationäre Phase wurden 1.13 g (4.30 mmol) eines leicht gelblichen Öles erhalten. Reinheitsüberprüfung mittels Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie (GC-MS) zeigten keine Nebenprodukte.

MS-Daten:

Spektrum siehe Abbildung 4.1

NMR-Daten:

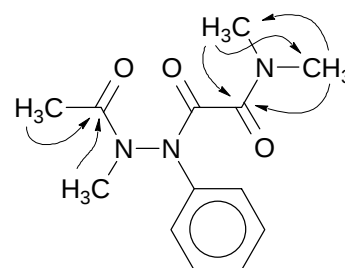
Zu beachten bei der Auswertung der NMR-Spektren ist das bei dieser Art von Substanzen bekannte Auftreten von Rotameren [128].

^1H -NMR (500 MHz, DMSO, 27°C): d [ppm] = 2.02 / 2.04 / 2x 2.14 (s, $\text{CH}_3\text{-CO-N-}$), 2.57 / 2.71 / 2.87 / 2x 2.90 / 2.95 / 2x 3.05 (s, $(\text{CH}_3)_2\text{N-CO-}$), 3.10 / 3.16 / 3.22 / 3.25 (s, $\text{CH}_3\text{-N-N-}$), 7.25-7.55 (m)

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , 27°C): d [ppm] = 21.48 (q), 33.55 (q), 34.31 (q), 36.76 (q), 37.32 (q), 37.94 (q), 38.46 (q), 124.38 (d), 126.90 (d), 127.62 (d), 129.18 (d), 129.26 (d), 129.36 (d), 138.00 (s), 163.00 (s), 165.00 (s), 170.10 (s), 170.66 (s)

Die weitere Zuordnung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome erfolgte aufgrund zweidimensionaler ^1H - ^{13}C -NMR-Experimente (HMBC, HMQC) in DMSO:

	in ppm, DMSO	
^1H -Signal	^{13}C -Kopplungen direkte Kopplung	^{13}C -Kopplungen Fernkopplungen
2.02	20.0	173.6
2.04	20.0	172.8
2.14	21.0	170.6
2.15	21.0	171.7
2.57	34.0	37.0 + 163.6
2.71	34.2	37.7 + 163.1
2.87	34.5	38.1 + 163.9
2.90	34.4	38.1 + 164.0
2.90	38.2	34.5 + 164.0
2.95	37.0	34.0 + 163.6
3.05	37.7	34.2 + 163.1
3.05	38.1	34.4 + 163.1
3.10	34.6	172.8
3.16	37.2	173.6
3.22	39.0	171.7
3.25	38.3	170.6



130

Abb. 4.5 Korrelationsdaten aus NMR-Untersuchungen (HMBC/HMQC) von 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid **130**

5 Mikrobieller Abbau aromatischer Verbindungen

Mikroorganismen sind in der Lage, aromatische Strukturen zu metabolisieren [7]. Pfad und Umfang der Umsetzung differieren stark zwischen Organismen und angebotenen Substrat. Entscheidender Schritt für einen aeroben Abbau ist die initiale Oxygenierung des Aromaten. Hierzu verfügen Organismen über Enzymsysteme, mit deren Hilfe Sauerstoff an die aromatische Struktur angelagert wird. Während bei Bakterien mittels Dioxygenasen zunächst cis-Dihydrodiole entstehen, führt bei Pilzen und Hefen der Einfluss von Monooxygenasen zu Epoxiden. Abbildung 5.1 zeigt einen Vergleich bekannter initialer Metabolisierungsschritte bei Abbau von Dibenzofuran durch verschiedene Organismen.

Säugetiere verfügen ebenfalls über Monooxygenasen zur Umsetzung aromatischer Strukturen. Daher eignen sich Pilze und Hefen auch als einfache Modell-Systeme für die Beurteilung und Abschätzung möglicher Umsetzungen von Aromaten im menschlichen Körper [129]. Bis-Aryl-Verbindungen wie Biphenyle, Dibenzofurane und Dioxine sind für Metabolismus-Untersuchungen besonders interessant, da eine Vielzahl weit verbreiteter Schadstoffe und sogenannte „priority pollutants“ in der Umwelt dieses Strukturmerkmal aufweisen [12].

Im Verlauf der hier zusammengefassten wissenschaftlichen Untersuchungen wurden Metabolismusstudien an Biphenyl und Dibenzofuran mit Bakterien, Pilzen und Hefen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in den Zeitschriften *Applied Microbiology and Biotechnology* (Kapitel 5.1) und *Applied and Environmental Microbiology* (Kapitel 5.2-5.5) veröffentlicht. Die Studien des Abbaus von substituierten Imidazolen mit einem Weißfäulepilz wurden in *Tetrahedron* veröffentlicht (Kapitel 5.6).

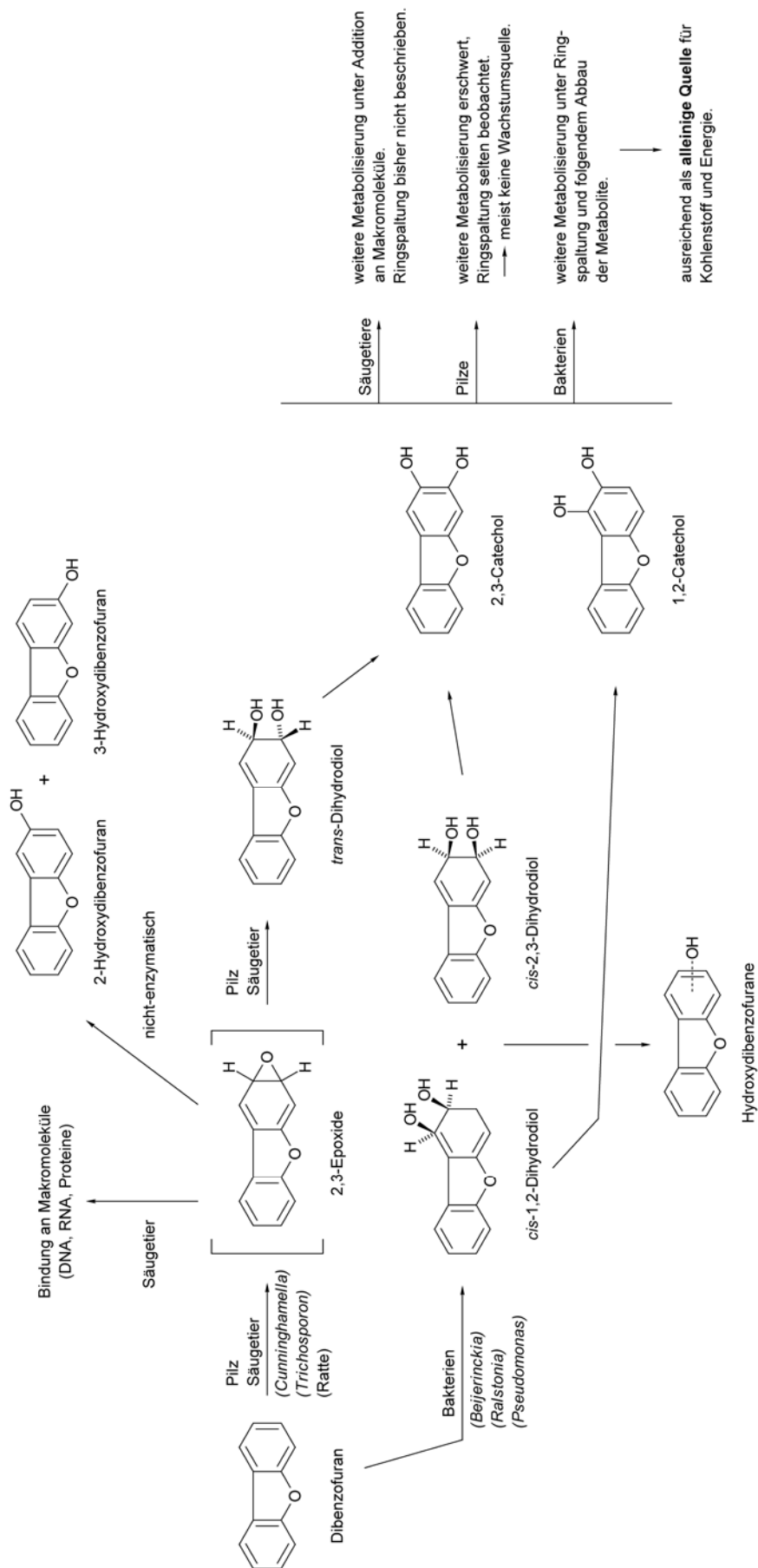


Abb. 5.1 Metabolisierung von Bis-Aryl-Verbindungen am Beispiel von Dibenzofuran

5.1 Biphenyl-Abbau durch *Debaryomyces vanrijaiae*

Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanrijaiae*

J. Lange, E. Hammer, M. Specht, W. Francke, F. Schauer

Appl Microbiol Biotechnol **1998**, 50, 364-368

Die Hefe *Debaryomyces vanrijaiae* (SBUG 770) ist in der Lage, Biphenyl cometabolisch zu transformieren. Zur Vorbereitung der Untersuchungen auf mögliche Metabolite wurde die Hefe zunächst mit Glucose als Substrat präkultiviert. Inkubation in Gegenwart von Biphenyl führte zu einer Anreicherung von 4-Hydroxybiphenyl als Hauptmetabolit und Spuren von 2-Hydroxybiphenyl. Weitere Umsetzung der Hydroxy-Biphenyle wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Erfolgt das Wachstum der Zellen mit Tetradecan als Substrat, ist nach der Inokulation von 4-Hydroxybiphenyl jedoch eine schnelle Umsetzung zu beobachten. Hierbei treten zwei Metabolite in Abhängigkeit von der Inkubationszeit auf. Für die Charakterisierung mittels GC-MS und NMR-Untersuchungen wurden die Produkte aus dem Kulturüberstand bei verschiedenen pH-Werten mit Diethylether extrahiert. Metabolit I konnte anhand des Massenspektrums als dihydroxyliertes Biphenyl identifiziert werden. Der Vergleich mit der Retentionszeit und dem Spektrum einer Referenzprobe ergab die vollständige Charakterisierung als 3,4-Dihydroxybiphenyl. Zur Untersuchung des Metaboliten II erfolgte zunächst eine Derivatisierung mit Diazomethan. Das Massenspektrum des Methyl-Derivats von Metabolit II zeigt das Molekölion bei $m/z = 230$, angenommen als $C_{10}H_8O_4$. Signifikante Fragmente sind der Verlust von CO ($m/z = 202$), der Verlust von $COOCH_3$ (171), 115, 89, 77 (Phenyl) und 63 (Abbildung 5.2). Die 1H -NMR-Untersuchung des unmethylierten Extraktes von Metabolit II ergab das Auftreten zweier isolierter nicht-aromatischer Protonen neben 5 aromatischen Protonen (Abbildung 5.3). Zusammen mit Überlegungen zu möglichen Abbauwegen ergab sich so mit 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133** ein Strukturvorschlag für Metabolit II. Synthese einer Referenzprobe [130], gezeigt in Abbildung 5.4, führte zur Bestätigung dieser Annahme.

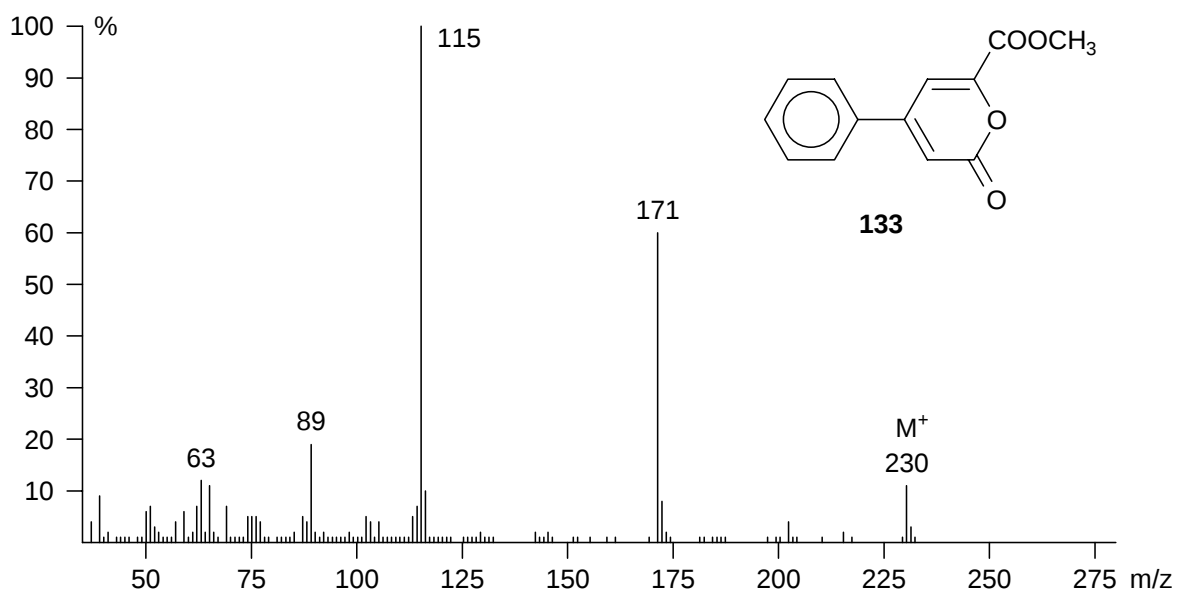


Abb. 5.2 Massenspektrum Metabolit II: 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäuremethylester **133**

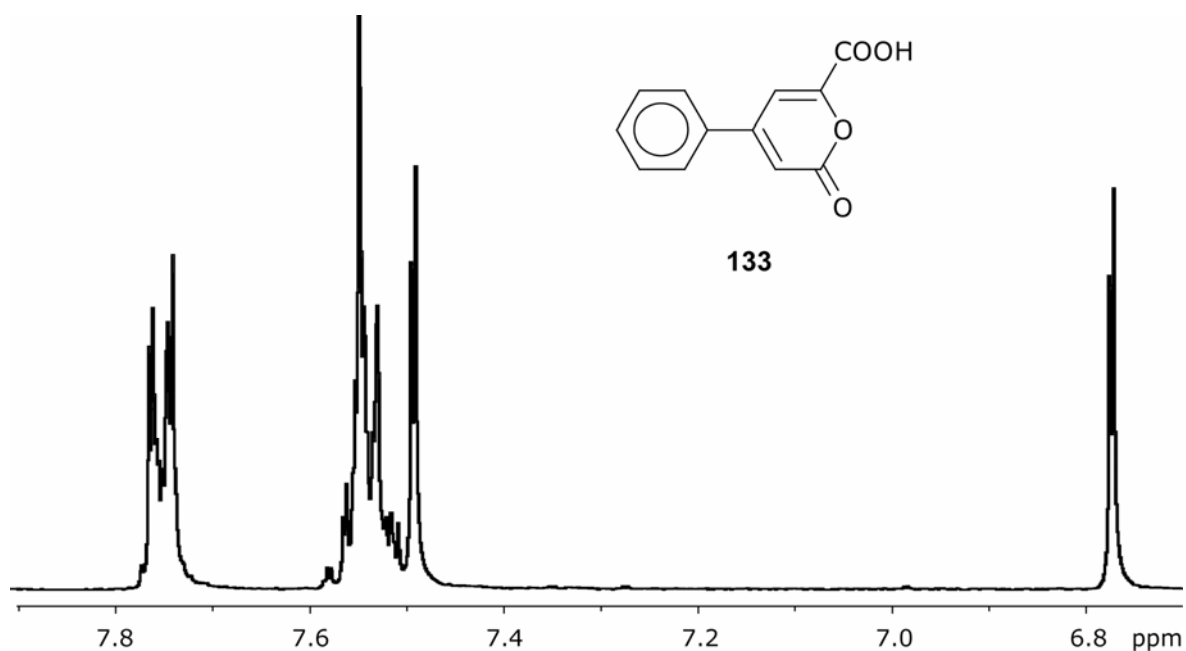


Abb. 5.3 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN) von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133**

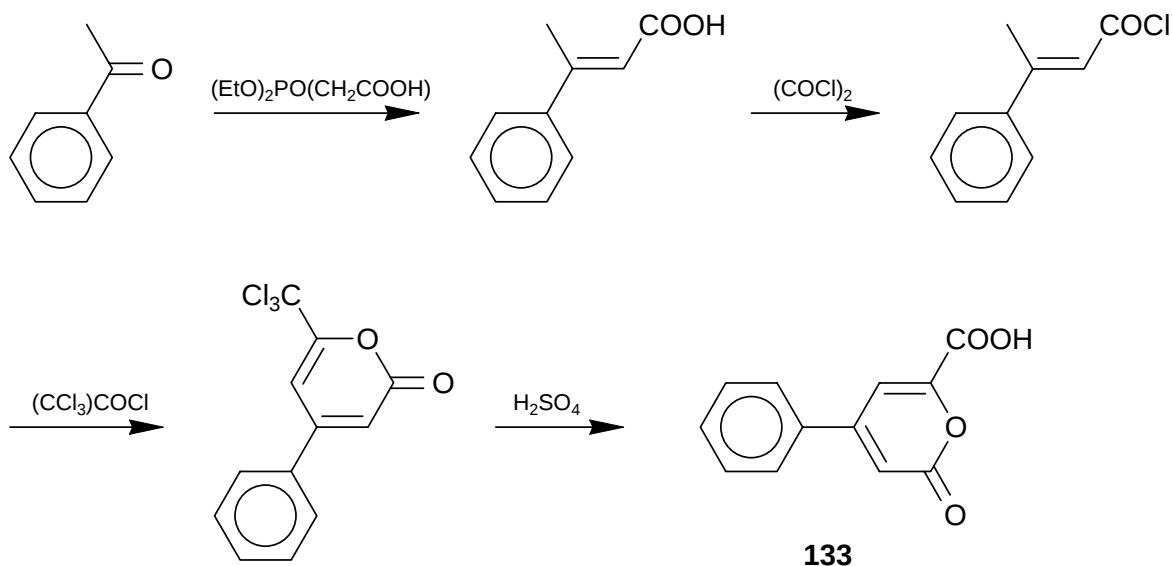


Abb. 5.4 Synthese von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133**

Der Einsatz von 3,4-Dihydroxybiphenyl unter gleichen Bedingungen erbrachte ebenfalls 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure als Metabolit. Ein cometabolischer Abbau von 4-Hydroxybiphenyls durch *Debaryomyces vanrijaiae* über mehrfache Hydroxylierung mit 3,4-Dihydroxybiphenyl als Zwischenprodukt und unter Ringspaltung zu 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure ist daher anzunehmen.

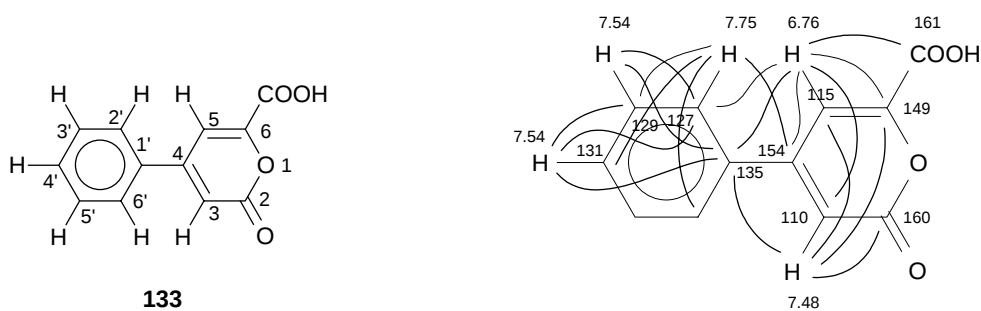
NMR-Daten 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure 133

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz):

$\delta = 6.77$ (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.54 (m, 3H), 7.75 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3CN , 67 MHz):

$\delta = 109.8$ (CH), 114.5 (CH), 126.7 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 152.2 (C_{q}), 159.5 (C_{q}), 160.4 (C_{q}) ppm.



¹H-NMR-Rohdaten

ppm	H's	Aufsp.	Kopp.
6.76	1	d	1.8 Hz
7.48	1	d	1.8 Hz
7.54	3	m	
7.75	2	m	

HMQC-Rohdaten

ppm	an C ~ppm
6.76	115
7.48	110
7.54	129.5 + 131.5
7.75	127.5

¹³C-NMR-Rohdaten

ppm	C's	Art
109.8	1	CH
114.5	1	CH
126.7	2	CH _{Ar}
129.0	2	CH _{Ar}
130.8	1	CH _{Ar}
134.1	1	C _q
148.4	1	C _q
153.2	1	C _q
159.5	1	C _q
160.4	1	C _q

¹H

6.76, 1H, d, ⁵ J= 1.8 Hz	H-5
7.48, 1H, d, ⁵ J= 1.8 Hz	H-3
7.54, 3H, m	H-3',H-4',H-5'
7.75, 2H, m	H-2',H-6'

¹³C

109.8, 1C, CH	C-3
114.5, 1C, CH	C-5
126.7, 2C, CH _{Ar}	C-2', C-6'
129.0, 2C, CH _{Ar}	C-3', C-5'
130.8, 1C, CH _{Ar}	C-4'
134.1, 1C, C _q	C-1'
148.4, 1C, C _q	C-6
153.2, 1C, C _q	C-4
159.5, 1C, C _q	C-2
160.4, 1C, C _q	COOH

HMBC-Rohdaten

ppm	C's
6.76	110.5 127.4 134.8 149.3 154.0 161.1
7.48	115.1 134.8 149.3 160.3
7.54	127.4 129.4 134.8
7.75	127.4 129.4 131.5 154.0

Abb. 5.5 Korrelationsdaten der NMR-Untersuchungen von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133**

Abdruck des Manuskripts

Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanriijiae*

J. Lange, E. Hammer, M. Specht, W. Francke, F. Schauer

Appl Microbiol Biotechnol **1998**, 50, 364-368

mit Genehmigung des Springer Verlags.

Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanriijiae*

Jana Lange; Elke Hammer* ; Michael Specht¹; Wittko Francke¹ and Frieder Schauer

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, and ¹Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg, Germany

* Correspondence: Elke Hammer, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, F.-L.-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, Tel. 49-3834-864211 Fax. 49-3834-864202, e-mail: hammer@microbio1.biologie.uni-greifswald.de

Abstract

Cells of the yeast strain *Debaryomyces vanriijiae* SBUG 770 grown with glucose converted biphenyl to 4-hydroxybiphenyl as the major metabolite. Additionally, 2-hydroxybiphenyl was formed in minor amounts. Further degradation of these substances was not detected. However, these monohydroxylated derivatives were oxidised by alkane-grown cells in the presence of the co-metabolic substrate, tetradecane. Under these conditions 2-hydroxybiphenyl was oxidised to 2,5-dihydroxybiphenyl, and 4-hydroxybiphenyl was rapidly metabolised by formation of two major metabolites. One was identified as 3,4-dihydroxybiphenyl. Characterisation of the second product as 4-phenylmuconolactone points to a further metabolisation of the initially formed dihydroxylated biphenyl via ortho- ring fission.

Introduction

Biphenyl has been found to be widespread in the environment due to its extensive commercial use in the conservation of citrus fruits. Prolonged exposure to biphenyl containing air produced liver injury as well as central and peripheral nervous damage. Cutaneous application also gave rise to toxic effects (Hakkinen et al. 1973). The interest in the biological fate of this compound in fungi arises not only from its toxic effect on human and its use as a fungistat but also from its value as a model compound for the study of the metabolism of xenobiotic compounds in mammals (Smith and Rosazza 1974; Smith et al. 1976). Furthermore, any catabolic activities identified may be applicable to the synthesis of specific hydroxylated intermediates (Salvo et al. 1990).

From the results reported so far, it has been concluded that pathways of biphenyl catabolism are similar in filamentous fungi and mammals. The degradation involves initial oxidative attacks leading to the formation of derivatives hydroxylated in the 4-, 2- or 4,4'-position. Further transformations result in conjugates which are more water soluble. This process is considered to be a mechanism for the detoxification of

xenobiotics (Smith and Rosazza 1974; Dodge et al. 1979).

Although many fungal species have been tested for their ability to oxidise biphenyl, few do so, presumably because of biphenyl's fungistatic activity. The few data available concerning yeasts are controversial. There was no biphenyl transformation detectable by the yeast strains tested (*Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) by Smith et al. (1980). However, a biphenyl transforming cytochrome P-450 of *C. tropicalis* was characterised some years ago (Wiseman et al. 1975), traces of hydroxylated biphenyls were analysed in assays with *S. cerevisiae* by Dodge and co-workers (1979), and hydroxylation of biphenyl was shown for *C. lipolytica* (Cerniglia & Crow 1981).

In this paper we describe the transformation of biphenyl by the ascomycetous yeast, *Debaryomyces vanriijiae*, as well as the isolation and identification of several hydroxylated metabolites and a ring cleavage product.

Material and Methods

Microorganism, growth and incubation conditions. *Debaryomyces vanriijiae* SBUG 770 was chosen from 60 ascomycetous yeast strains by comparing the oxygen consumption rates with biaryl substrates. All these strains were from the collection in the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG).

The strain *Debaryomyces vanriijiae* SBUG 770 was cultivated on malt agar slants. Precultivation of cells with glucose (1%) as carbon source was carried out in a mineral salts medium as previously described (Schauer et al. 1995). Tetradecane was used as a substrate by cultivating the yeast on mineral salt agar plates supplemented with alkanes evaporating from a filter sheet in the plate cover. After 2 days, cells from the plates were suspended in sterile medium, harvested by centrifugation (3000 x g, 10 min) and washed twice with sterile buffer (0.066 M potassium phosphate, pH 5.4).

For degradation experiments, 100 ml of cells resuspended in mineral salts medium ($OD_{600nm} = 7.0$) supplemented with 1 ml vitamin solution (van der Walt, 1970) were shaken in 500 ml shake flasks at 180 rpm and at 30°C. Because of the low water solubility biaryl compounds were added as fine powdered crystals.

Toxic effects of the biphenyl derivatives used were estimated by their influence on biomass production by *Debaryomyces vanriijiae* with 1 % glucose as a growth substrate.

Estimation of the oxygen consumption rates. Oxygen uptake was measured respirometrically in a Warburg apparatus over 3 hours. Reaction vessels contained 3.8 ml buffer (see above) with cells corresponding to 2.6 mg dry weight and 0.2 ml 20 % potassium hydroxide in the centre for carbon dioxide elimination. Substrates were added as fine powdered crystals at concentrations of 125 and 500 mg/l.

Chemical analysis and identification of metabolites. Formation of metabolites was followed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the aqueous culture supernatant as described previously (Hammer et al. 1997). At suitable times (after 20-70 h of incubation) metabolites were extracted from the centrifuged culture fluid according to Schauer et al. (1995). Purification of intermediates for mass spectral analysis and nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were done by preparative HPLC on a LiChroCart 125-4 RP-18 endcapped column (Merck, Darmstadt, Germany). Separation of metabolites was achieved with a solvent system of methanol and 1 % acetic acid with a gradient from 30 % to 100 % methanol. The flow rate was 1ml/min.

Capillary column gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed as described in Hammer et al. (1998). NMR spectra were recorded on a Bruker AMX-400 NMR-spectrometer (400 MHz for ^1H , 67 MHz for ^{13}C).

Chemicals. Biphenyl and 2-hydroxybiphenyl were purchased from Merck. 3-, 4-Hydroxy-, 2,5- and 4,4'-dihydroxybiphenyl were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) and 3,4-dihydroxybiphenyl from Promochem (Wesel, Germany). Tetradecane was from Fluka (Buchs, Switzerland).

Results

Estimation of oxygen consumption rates

In order to investigate the ability of ascomycetous yeasts to oxidise biaryl compounds, 60 yeast strains were studied in a Warburg apparatus for their oxygen consumption in the presence of diphenyl ether, dibenzofuran and biphenyl as substrates. Many of the strains tested out of 60 showed no increase in the oxygen consumption rates after addition of these substrates. In some cases even endogenous respiration was inhibited in the presence of the biaryl compounds.

In contrast, cells of *Debaryomyces vanrijae* grown with glucose oxidised biphenyl (500 mg/l) consuming oxygen at a rate of $17 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. The preculture conditions appear to have little influence on the result since the oxygen consumption rate for biphenyl by tetradecane-grown cells was $14 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Perhaps due to the toxic features of the hydroxylated derivatives 2-hydroxy-biphenyl was only oxidised up to concentrations of 125 mg/l. Oxidation of 3-hydroxybiphenyl was not detected at all. In contrast, oxidation of 4-hydroxy-biphenyl was readily demonstrated at a substrate concentration of 125 mg/l and was substantially greater at a substrate concentration of 500 mg/l (Table 1).

Toxic effect of biphenyl derivatives on the growth with glucose

To get more information about toxic effects of the biphenyl derivatives, their influence on the growth of *Debaryomyces vanrijae* with glucose was studied. As expected, biphenyl showed only minor effects on growing cells probably due to its low solubility in

aqueous systems (7 mg/l). However, growth of cells was inhibited drastically by the hydroxylated derivatives in concentrations of more than 5 mg/l (Fig. 1). Surprisingly, the better oxidised 4-hydroxybiphenyl seemed to be more toxic than 2-hydroxybiphenyl. Obviously, there could be differences in the effects of these compounds depending on whether the cells are growing or resting, and higher oxygen consumption rates may also be due to decoupling of the respiratory chain. On the other hand, the much lower water solubility of 4-hydroxybiphenyl (46 mg/l) compared to that of the other derivatives (202 mg/l; 185 mg/l) can result in different toxic effects at the same concentration used.

Transformation of biphenyl derivatives

Incubation of glucose-grown cells in the presence of biphenyl (500 mg/l) resulted in the accumulation of one major metabolite in the culture fluid. The shorter retention time of this intermediate (10.4 min) as compared to biphenyl (13.2 min) on a reverse phase column during HPLC analysis pointed to a hydroxylation of the substrate. Coinjection of standards of hydroxylated biphenyls and comparison of UV spectral data demonstrated the formation of 4-hydroxy-biphenyl as the major metabolite. No further degradation of this oxidation product was observed either under the conditions described nor in the presence of various amounts of glucose as co-substrate.

In addition to 4-hydroxybiphenyl, a second intermediate enriched only in minor amounts was detected after diethyl ether extraction of the culture fluid, and was identified as 2-hydroxybiphenyl by GC-MS.

When *Debaryomyces vanrijae* was grown with tetradecane the cells showed a lower capability to metabolise biphenyl, and little of the hydroxylated derivatives accumulated.

Under these conditions 2-hydroxybiphenyl (25 mg/l) was transformed slowly to 2,5-dihydroxybiphenyl, which was identified by comparing the UV and mass spectra with that of the authentic standard. However, the 4-hydroxybiphenyl was rapidly degraded by cells grown in the presence of alkane. Variations in the concentrations of 4-hydroxybiphenyl and tetradecane led to an optimisation of the transformation rates. The highest rates of 40 to $60 \mu\text{g} \times \text{h}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ were reached in incubations with 25 mg/l 4-hydroxybiphenyl in the presence of 0.2 % tetradecane as a co-substrate. Simultaneously with the decrease of 4-hydroxy-biphenyl two new metabolites were produced in similar amounts. The metabolites designated I and II had HPLC retention times of 8.6 and 6.1 min, respectively. Metabolite I accumulated after 20 h of incubation. The highest level was reached about 70 h after which this intermediate was degraded completely. Metabolite II was first detectable after 48 h; its concentration increased constantly over the entire course of the incubation period (Fig. 2).

Identification of metabolites

UV spectral data recorded by a diode array detector during HPLC analysis gave UV absorption maxima at 242 nm and 322 nm for metabolite I and 202 nm and 260 nm for metabolite II. For further characterisation by GC-MS and ¹H-NMR metabolites were extracted from the culture fluid with diethyl ether at different pH values to obtain a neutral and an acid extract. This procedure led to a separation of metabolite I and the substrate 4-hydroxybiphenyl which were already extracted at neutral pH from metabolite II which was enriched in the acid extract.

The mass spectrum of metabolite I showed a molecule ion peak at m/z 186 which corresponded with a molecular formula of C₁₀H₈O₂ and is consistent with the structure of a dihydroxylated biphenyl. Comparison of the GC retention time and the fragmentation pattern with authentic standards is consistent with the formation of 3,4-dihydroxybiphenyl.

Derivatisation with diazomethane was necessary for the analysis of metabolite II by GC-MS. Analysis of the methyl derivative showed a molecular ion peak at m/z 230 and significant fragments at m/z 202 (loss of CO), 171 (loss of COO-CH₃), 115, 89, 77 (C₆H₅⁺) and 63 (Fig. 3). From the molecular mass m/z 230 of the methyl derivative (corresponding to the molecular formula C₁₀H₈O₄ of the unmethylated compound), the occurrence of a carboxyl group (M⁺ -59), and a quinone group (M⁺ -28), we deduced the formation of a lactone of a phenylmuconic acid derivative. Because this lactone was also formed from 3,4-dihydroxybiphenyl as a substrate, metabolite II appeared to be a lactone originating from 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid. Structure elucidation of this metabolite was achieved by comparison of its spectrometric data with those of a synthetic reference sample. Starting from trans-β-methyl-cinnamic acid chloride the synthesis of the target compound was carried out as described by Rey et al. (1970). The starting material was obtained via Horner-Emmons coupling of acetophenone with diethylphosphonoacetic acid in tetrahydrofuran followed by transformation into the acid chloride with oxalyl chloride.

The ¹H-NMR spectra of both, the synthetic product (Fig. 4) and the natural metabolite, showed two doublets at 6.77 and 7.49 ppm (representing one hydrogen each) for non-aromatic hydrogens and two multiplets at 7.54 and 7.75 ppm (representing 3 and 2 hydrogens) for aromatic hydrogens. Since an ¹H-NMR of a 1:1 mixture of metabolite II and the synthetic compound showed no deviation from the ¹H-NMR spectra of the pure compounds, metabolite II was identified as 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid.

The spectral assignments can be summarised as follows: ¹H-NMR (CD₃CN, 400 MHz): = 6.77 (d, 1H), 7.49 (d, 1H), 7.54 (m, 3H), 7.75 (m, 2H) ppm. ¹³C-NMR (CD₃CN, 67 MHz): = 109.8 (CH), 114.5 (CH), 126.7 (CH_A), 128.9 (CH_A), 130.8 (CH_A), 152.2 (C_q), 159.5 (C_q), 160.4 (C_q) ppm.

Discussion

Debaryomyces vanrijae is a yeast which grows well on several n-alkanes (C10-C18). In contrast to many other basidiomycetous yeasts and yeasts of the genus *Trichosporon* the strain used cannot assimilate monoaromatic compounds or oxidise phenol or benzoic acid. From this phenotype we assume that this strain lacks an inducible specific monoaromatic ring hydroxylase. That is why the hydroxylation of biphenyl to the main product 4-hydroxybiphenyl and also to 2-hydroxybiphenyl by *Debaryomyces vanrijae* grown with glucose seems to be catalysed by a non-specific, constitutive oxidation system. The monohydroxylated derivatives could be formed by spontaneous isomerisation of biphenyl 3,4-oxide and biphenyl 2,3-oxide as shown for the latter by Serve and Jerina (1978). However, we did not find these intermediates. The formation of 4-hydroxybiphenyl as the predominant metabolite was reported for various filamentous fungi, mammalian systems and yeasts (Dodge et al. 1979, Smith et al. 1980, Cerniglia & Crow 1981). The similarity of the results to that found in experiments with mammals point to cytochrome P-450 enzymes involved in the hydroxylation of biphenyl in *Debaryomyces vanrijae*.

Transformation rates for biphenyl by *Debaryomyces vanrijae* were only low, in line with previous studies on biphenyl hydroxylation activity by fungi. Para-hydroxylated biphenyl is often converted to 4,4'-hydroxybiphenyl by filamentous fungi (Smith et al. 1980), but neither this nor any other product was detected in incubation assays with glucose-grown cells of *Debaryomyces vanrijae*. From this result it seems that this yeast strain possesses no further transformation capability as it was concluded for many filamentous fungi. However, incubations of the yeast in the presence of 4-hydroxybiphenyl and tetradecane as a co-substrate demonstrated that this compound is not essentially a dead-end product, but that it can be further oxidised. The addition of the alkane substrate may lead to a two-phase system decreasing both the bioavailable hydroxybiphenyl concentration and its toxic effects on the cells. Alkane growing cells also show changes in their cell wall composition and in their permeability for hydrophobic substrates (Kaeppli et al. 1978). Furthermore, the presence of a growth substrate can provide energy necessary for the oxidation of 4-hydroxybiphenyl via 3,4-dihydroxybiphenyl to the ring fission product 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid. Presumably ring cleavage of the aromatic structure can only take place after introduction of a third hydroxyl group into the dihydroxylated intermediate as was also described for the degradation of diphenylether by *Trichosporon* spec. SBUG 752 (Schauer et al. 1995).

The formation of 3-arylmucunolactons from biphenyl by fungi was also described in the deuteromycete *Aspergillus parasiticus*. However, in this case the formation of these products occurred only from biphenyls para-substituted at both phenyl rings and was not detected with unsubstituted biphenyl or m-terphenyl (Mobley et al. 1993). In contrast,

ring fission of biphenyl by bacteria produces a yellow coloured *meta*-cleavage product, 2-hydroxy-6-oxophenylhexa-2,4-dienoic acid (Catelani & Colombi 1974; Smith 1990).

The capability of yeasts to cleave aromatic hydrocarbons was also reported for diphenyl ether (Schauer et al. 1995) and dibenzofuran (Hammer et al. 1998). These compounds were ring-cleaved by strains of the genus *Trichosporon* which represents imperfect yeasts showing basidiomycetous cell wall structures in contrast to the ascomycetous *Debaryomyces vanriijae* used in our experiments. Although this yeast may be of low relevance for a practical approach in bioremediation the results encourage further studies regarding biodegradation capabilities of yeast.

The detection of ring fission products from biphenyl, dibenzofuran or diphenyl ether after oxidation by ascomycetous or basidiomycetous yeasts and deuteromycetes indicates that the ability to form phenylmuconic acids or the corresponding lactones is widely distributed among fungi. In this way fungi may be involved in the biodegradation pathways for biaryl and oxygen heterocyclic compounds in nature to a larger extent than has hitherto been realised.

Acknowledgements

The work of J.L. was supported by a grant provided by the Rainbow foundation, Germany. We thank R. Schulz for skilful technical assistance.

References

- Catelani D, Colombi A (1974) Metabolism of biphenyl. J Biochem 143:431-434
- Cerniglia CE, Crow SA (1981) Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. Arch Microbiol 129:9-13
- Dodge RH, Cerniglia CE, Gibson DT (1979) Fungal metabolism of biphenyl. Biochem J 178:223-230
- Hakkinen I, Hernberg S, Karli P, Vikkula E (1973) Diphenyl poisoning in fruit paper production. Arch Environ Health 26: 70-74
- Hammer E, Schauer F (1997) Fungal hydroxylation of dibenzofuran. Mycol Res 101:433-436
- Hammer E, Krowas D, Schäfer A, Specht M, Francke W, Schauer F (1998) Isolation and characterization of a dibenzofuran degrading yeast: Identification of oxidation and ring cleavage products. Appl Environ Microbiol 64:2215-2219
- Kaeppli O, Mueller M, Fiechter A (1978) Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. J. Bacteriol. 133:952-958
- Mobley DP, Finkbeiner HL, Lockwood SH, Spivack J (1993) Synthesis of 3-aryl-muconolactones using biphenyl metabolism in *Aspergillus*. Tetrahedron 49: 3273-3280
- Rey M, Dunkelblum E, Allain R, Dreiding S (1970) Synthesen von 2-Pyronen aus

α,β -ungesättigten Säurechloriden und tertiären Aminen. Helv Chim Acta 53: 2159-2175

Salvo JJ, Mobley DP, Brown D, Caruso L, Yake A, Spivack J, Dietrich DK (1990) Biosynthesis of p-hydroxylated aromatics. Biotechnol Prog 6: 193-197

Schauer F, Henning K, Pscheidt H, Wittich RM, Fortnagel P, Wilkes H, Sinnwell V, Francke W (1995) Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporon beigelii* SBUG 752. Biodegradation 6:173-180

Serve MP, Jerina DM (1978) Synthesis of biphenyl 2,3-oxide. J Org Chem 43:2711-2713

Smith MR (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation 1:191-206

Smith RV, Davis PJ, Clark AM, Glover-Milton S (1980) Hydroxylations of biphenyl by fungi. J Appl Bacteriol 49:65-73

Smith RV, Humphrey DW, Engel KO, Rosazza JP (1976) Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation of isomeric xylenes. Appl Environ Microbiol 31:448-449

Smith RV, Rosazza JP (1974) Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. Arch Biochem Biophys 161:551-558

van der Walt, JP (1970) Criteria and methods used in classification. In: Lodder, J (Edit.): The yeasts, a taxonomic study, 34-113, North Holland Publ. So., Amsterdam, The Netherlands

Wiseman A, Gondal JA, Sims P (1975) 4'-Hydroxylation of biphenyl by yeast containing cytochrome P-450; radiation and thermal stability, comparison with liver enzyme (oxidized and reduced forms). Biochem Soc Trans 3:278-281

Legends

Fig. 1 Toxic effect of biphenyl derivatives on the biomass formation of *Debaryomyces vanriijae* with glucose as a carbon source (biomass formation was estimated by measuring the optical density (600 nm) of the cultures after 24 hours)

Fig. 2 Kinetics of 4-hydroxybiphenyl (25 mg/l) transformation by *Debaryomyces vanriijae* precultivated with tetradecane. Incubation was performed in the presence of 0.2 % tetradecane as a co-substrate.

Fig. 3 Mass spectrum of metabolite II (methyl derivative), formed as a ring cleavage product from 4-hydroxybiphenyl via 3,4-dihydroxybiphenyl by *Debaryomyces vanriijae* in the presence of 0.2 % tetradecane as a co-substrate.

Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of 4-phenyl-2-pyron-6-carboxylic acid, as also detected for metabolite II, a ring cleavage product formed during incubation of *Debaryomyces vanriijae* with 4-hydroxybiphenyl.

Table 1

Oxygen consumption rates of resting cells of *Debaryomyces vanijijae* incubated with biphenyl derivatives for 3 hours after precultivation with glucose as a carbon source

Oxygen consumption rates		
substrate (mg/l)	cells	($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) glucose-grown
biph enyl	500	17
	125	5
2-OH-BP	500	0
	125	36
3-OH-BP	500	0
	125	0
4-OH-BP	500	72
	125	33

Figure 1

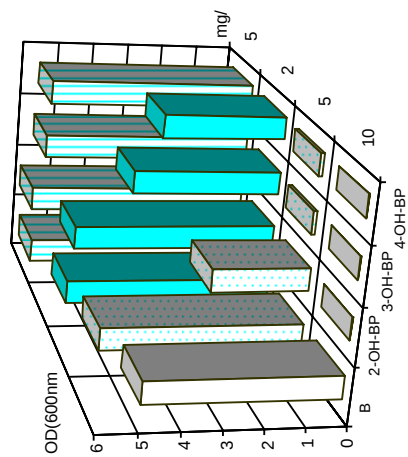


Figure 2

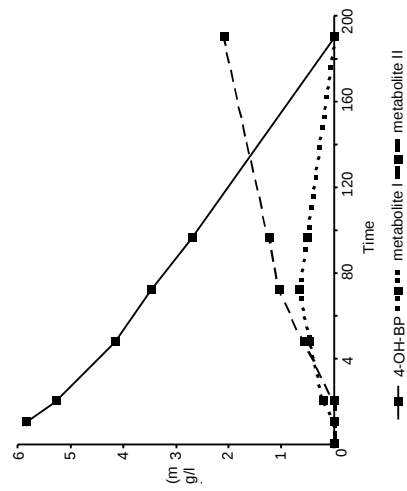


Figure 3

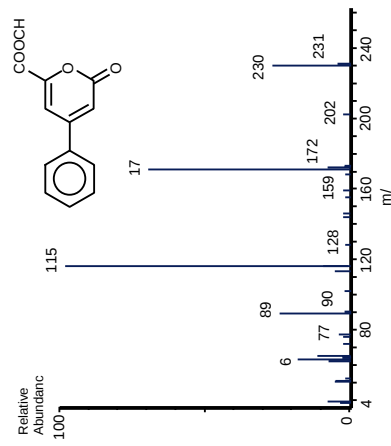
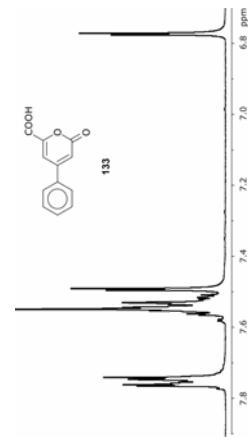


Figure 4



5.2 Biphenyl-Abbau durch *Paecilomyces lilacinus*

Biotransformation of Biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and Characterization of Ring Cleavage Products

Manuela Gesell, Elke Hammer, Michael Specht, Wittko Francke, Frieder Schauer
Appl. Environ. Microbiol. **2001**, 67(4), 1551–1557

Der weit verbreitete Schimmelpilz *Paecilomyces lilacinus* zeigt eine hohe Resistenz gegen das Fungizid Biphenyl. Diese Eigenschaft wird seiner Fähigkeit zugeschrieben, Oxidationsprodukte auch unter Ringspaltung zu bilden. Zur Aufklärung der initialen Schritte der Metabolisierung durch *Paecilomyces lilacinus* wurden Abbauprobversuche mit Biphenyl und Biphenyl-Derivaten durchgeführt. In Extrakten des Kulturüberstandes konnten 14 Metabolite identifiziert werden, unter ihnen die aus dem Abbau von Biphenyl mit der Hefe *Debaryomyces vanriijiae* bekannte 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133**. Anhand von Referenzsubstanzen konnten 7 ein- und zweifach hydroxylierte Biphenyle (OH-BP) identifiziert werden: 2-OH-BP, 3-OH-BP, 4-OH-BP, 2,3-Di-OH-BP, 3,4-Di-OH-BP, 4,4'-Di-OH-BP und 2,5-Di-OH-BP. 4,4'-Dihydroxybiphenyl wurde als Hauptmetabolit gebildet, 4- und 2-Hydroxybiphenyl sowie eine weitere Verbindung fanden sich in etwas geringeren Mengen. Diese Verbindung trat ebenso in den Inkubationen von 3,4-Dihydroxybiphenyl und 4,4'-Dihydroxybiphenyl auf. GC-MS-Analyse des methylierten Extrakts ergab das Molekülion dieses Metaboliten bei $m/z = 244$ und intensive Fragmente bei 229 ($-\text{CH}_3$), 201 ($-\text{COCH}_3$) sowie 115 (C_9H_7). Zusammen mit der durch hochauflösende MS bestimmten Zusammensetzung des Molekülions $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ schien ein dreifach hydroxyliertes Biphenyl wahrscheinlich. Zur Überprüfung des Strukturvorschlages und zum Einsatz in weiteren Abbauprobversuchen wurden die drei Trihydroxybiphenyle 2,3,4-Trihydroxy-, 3,4,5-Trihydroxy- und 3,4,4'-Trihydroxybiphenyl synthetisiert (**134**, **135**, **136**; Abbildung 5.6) [131]. Der Vergleich der Massenspektren und Coinjektion von methylierter Probe und Referenz identifizierten den Metaboliten als 3,4,4'-Trihydroxybiphenyl **136**.

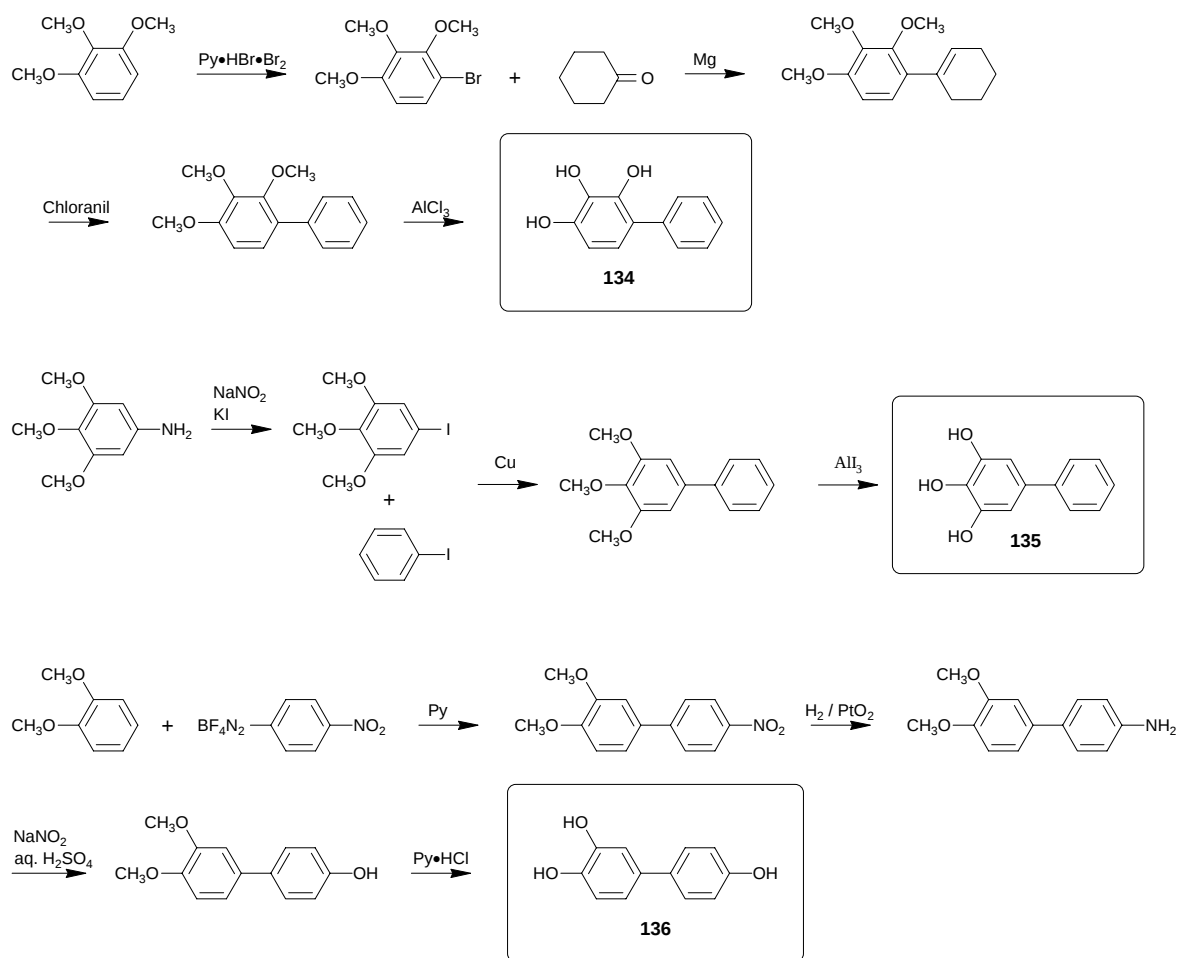


Abb. 5.6 Synthesen von 2,3,4-Trihydroxybiphenyl **134**, 3,4,5-Trihydroxybiphenyl **135** und 3,4,4'-Trihydroxybiphenyl **136**

Die synthetisierten Trihydroxy-Biphenyle, die vorhandenen Hydroxy- und Dihydroxy-Biphenyle sowie 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure wurden jeweils als Substrat für weitere Versuche eingesetzt. Hierbei konnten fünf weitere Metabolite angereichert werden. Sowohl ihre Retentionszeiten aus der HPLC-Analyse des Mediums, als auch ihre Extrahierbarkeit im sauren Milieu legten nahe, dass es sich um Carbonsäuren und damit um Ringspaltungsprodukte handelt. Analyse der GC/MS-Eigenschaften der methylierten Metabolite, Berücksichtigung des Auftretens im Überstand nach Inkubation mit verschiedenen Substraten sowie NMR-Untersuchungen führten zur Identifizierung dieser Metabolite als 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carbonsäure **137**, 2-Hydroxy-4-phenyl-muconsäure **138**, 2-Hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)muconsäure **139**, (5-Oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)essigsäure **140** und [5-Oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]essigsäure **141** (Abbildung 5.7).

Für 2-Hydroxy-4-phenylmuconsäure erfolgte die exakte Identifizierung durch einen Vergleich mit einer bei der photochemischen Synthese von 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure in kleiner Menge erhaltenen Referenzsubstanz [132].

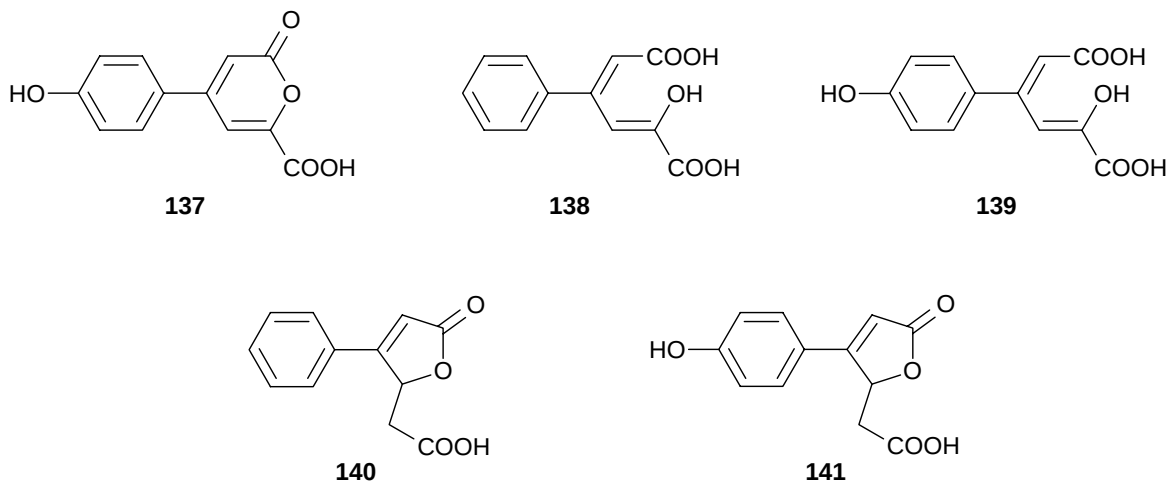


Abb. 5.7 wichtige Ringspaltungsprodukte des Biphenyl-Abbaus mit *Paecilomyces lilacinus*

Nachdruck der Publikation

Biotransformation of Biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and Characterization of Ring Cleavage Products

Manuela Gesell, Elke Hammer, Michael Specht, Wittko Francke, Frieder Schauer

Appl. Environ. Microbiol. **2001**, 67(4), 1551–1557

mit Genehmigung der American Society for Microbiology.

Biotransformation of Biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and Characterization of Ring Cleavage Products

MANUELA GESELL,^{1*} ELKE HAMMER,¹ MICHAEL SPECHT,² WITTKO FRANCKE,²
AND FRIEDER SCHAUER¹

*Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald D-17487,¹ and
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg D-20146,² Germany*

Received 30 August 2000/Accepted 25 January 2001

We examined the pathway by which the fungicide biphenyl is metabolized in the imperfect fungus *Paecilomyces lilacinus*. The initial oxidation yielded the three monohydroxylated biphenyls. Further hydroxylation occurred on the first and the second aromatic ring systems, resulting in the formation of five di- and trihydroxylated metabolites. The fungus could cleave the aromatic structures, resulting in the transformation of biphenyl via *ortho*-substituted dihydroxybiphenyl to six-ring fission products. All compounds were characterized by gas chromatography-mass spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. These compounds include 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid and 2-hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)-muconic acid, which were produced from 3,4-dihydroxybiphenyl and further transformed to the corresponding lactones 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid, which accumulated in large amounts. Two additional ring cleavage products were identified as (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-acetic acid and [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-acetic acid. We found that *P. lilacinus* has a high transformation capacity for biphenyl, which could explain this organism's tolerance to this fungicide.

Biphenyl and 2- and 4-hydroxybiphenyl have been used to limit fungal growth on citrus fruit. Toxic effects to humans after prolonged exposure to air containing biphenyl and after cutaneous application are known (14). Some biphenyl derivatives also are suspected carcinogens and have estrogenic activity (21, 33, 39).

Most research on the degradation of biphenyls has been conducted with bacteria (3, 11, 24, 36). Fungal transformation of biphenyl has been studied to determine how this antifungal substance may be inactivated but, more importantly, as a model of mammalian biphenyl metabolism. Primary oxidation of biphenyl by yeasts of the genera *Candida* and *Debaryomyces* (5, 22, 34, 44) and by filamentous fungi of the genera *Absidia*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Gliocladium*, and *Helicostylum* (7, 9, 12, 37), yields monohydroxylated biphenyls, which can undergo a second hydroxylation step or sugar conjugate formation (5, 7, 9, 12, 34, 37, 44). Usually, the initial hydroxylation favors the 4-position of biphenyl (34, 37). Induction of biphenyl hydroxylase activity in *Aspergillus* by several biphenyl substrates and also by 4,4'-dihydroxybiphenyl has been reported (28).

Although fungi constitute the majority of microbial biomass in soil, reports on fungal metabolism of biphenyl are limited to a few yeasts and filamentous fungi and usually restricted to hydroxylation processes (9, 34, 37). Since 1993 there have been two reports suggesting that these organisms may transform hydroxylated biphenyls and cleave the aromatic rings (22, 27). Each strain appears to be able to form only a single ring

cleavage product, however, and the overall capacity for ring cleavage seemed low.

Our objective in this study was to determine how the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus* transforms the fungicide biphenyl. The ability of this fungus to form a variety of oxidation products including ring cleavage products not previously described in fungi may be one reason that this fungus appears resistant to high levels of biphenyl.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Biphenyl and 2-hydroxybiphenyl were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and 3-hydroxy-, 4-hydroxy-, and 2,5-dihydroxybiphenyl as well as 4,4'-dihydroxybiphenyl were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). 3,4-Dihydroxybiphenyl was obtained from Promochem (Wesel, Germany), and 2,3-dihydroxybiphenyl was obtained from Wako Pure Chemical Industries (Neuss, Germany). All chemicals and solvents were of the highest purity available.

The compounds 2,3,4-trihydroxybiphenyl, 3,4,5-trihydroxybiphenyl, 3,4,4'-trihydroxybiphenyl, 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid, and 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid were not commercially available and were synthesized as follows.

2,3,4-Trihydroxybiphenyl was synthesized by bromination of 1,2,3-trimethoxybenzene (17). The Grignard reagent formed from the resulting 1-bromo-2,3,4-trimethoxybenzene was coupled with cyclohexanone. The reaction products were dehydrated with oxalic acid and treated with *p*-chloranil to produce 2,3,4-trimethoxybiphenyl. Demethylation with AlCl₃ yielded the corresponding 2,3,4-trihydroxybiphenyl (2, 23).

3,4,5-Trihydroxybiphenyl was synthesized by Ullmann coupling of iodobenzene with 5-iodo-1,2,3-trimethoxybenzene (10). Separation of the 3,4,5-trimethoxybiphenyl from the mixture of biphenyls followed by demethylation with AlI₃ yielded the target product 3,4,5-trihydroxybiphenyl (1).

3,4,4'-trihydroxybiphenyl was synthesized by coupling of veratrole with *N'*-(4-nitrophenyl)-diazonium tetrafluoroborate and transformation of the nitro group of the resulting compound into the corresponding amino derivative by hydrogenation with a PtO₂ catalyst. The *p*-substituted aniline was transformed to the corresponding phenol via the diazenium salt following conventional methods (29). The 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybiphenyl obtained was demethylated with pyridine hydrochloride to trihydroxylated biphenyl (16, 29).

4-Phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid was synthesized starting from *trans*- β -methyl cinnamic acid chloride as outlined by Rey et al. (32).

2-Hydroxy-4-phenylmuconic acid was produced photochemically from 4-phenyl-

* Corresponding author. Mailing address: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, F.-L.-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, Germany. Phone: 49-3834-864225. Fax: 49-3834-864202. E-mail: gesell@biologie.uni-greifswald.de.

TABLE 1. Formation of hydroxylated biphenyls and ring cleavage products after incubation of *P. lilacinus* SBUG-M 1093 with biphenyl, several hydroxylated biphenyls, and a synthesized ring cleavage product

Product ^a	Substrate								
	BP	2-OHBP	3-OHBP	4-OHBP	4,4'-DiOHBP	3,4-DiOHBP	3,4,5-TriOHBP	3,4,4'-TriOHBP	PPCA
Hydroxylated biphenyls									
2-OHBP	+								
3-OHBP	+								
4-OHBP	+								
4,4'-DiOHBP	+			+					
3,4-DiOHBP			+	+					
2,3-DiOHBP		+							
2,5-DiOHBP		+							
3,4,4'-TriOHBP	+		+	+	+	+			
Ring cleaved products									
PPCA	+		+	+		+	+		
C	+		+	+	+	+	+	+	+
D						+			
E						+			
F					+	+		+	
G						+			

^a BP, biphenyl; OHBP, hydroxybiphenyl; DiOHBP, dihydroxybiphenyl; TriOHBP, trihydroxybiphenyl; PPCA, 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid; C, 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid; D, 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid; E, 2-hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)-muconic acid; F, [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-acetic acid; G, (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-acetic acid.

nyl-2-pyrone-6-carboxylic acid. Photochemical treatment of 2-pyrones in methanol results in the formation of bicyclic lactones and/or ketenes, which add methanol under the reaction conditions (19). Thus, treatment of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid at 300 nm and 15°C yielded 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid in small amounts.

Growth and incubation conditions. *P. lilacinus* SBUG-M 1093 was isolated from wood chip piles (31) and has been deposited in the strain collection of the Department Biology of Greifswald University (SBUG) (DSMZ accession no. 14052). The strain was maintained on malt agar slants (3% malt; Serva). For incubation experiments, mycelium from an agar plate (1 cm²) was transferred to a 500-ml Erlenmeyer flask with 100 ml of Sabouraud glucose broth containing 40 g of D-glucose and 10 g of peptone of casein (Merck) per liter. After growth for 72 h at 30°C and 180 rpm on a rotary shaker, 5 ml of homogenized mycelium (homogenized three times for 2 s each time at 3,000 U/min in an IKA Ultra-Turrax homogenizer [Janke & Kunkel, Stauffen, Germany]) was used to inoculate 500-ml shake flasks containing 100 ml of a mineral salts medium (MM) (20) and 1 g of D-glucose as a carbon source. The slurry was cultivated as before for another 72 h. Glucose-grown cells were harvested by centrifugation (at 6000 × g for 5 min) and washed twice with sterile MM. The pellet was resuspended in 100 ml of sterilized MM. As substrates, biphenyl, 2-, 3-, or 4-hydroxybiphenyl, 3,4- or 4,4'-dihydroxybiphenyl, 3,4,4'- or 3,4,5-trihydroxybiphenyl, and 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid were added at concentrations ranging from 0.05 or 0.1 to 1 mg/ml. Cells in MM without substrates and biphenyl derivatives in MM were used as controls. All cultures were tested for microbiological purity.

Chemical analysis and identification of intermediates. For the detection and quantification of metabolites in the aqueous culture supernatant, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used. RP (reversed-phase) analytical HPLC was performed on a Hewlett-Packard (Bad Homburg, Germany) 1050 M HPLC apparatus equipped with a quaternary pump system, a 1040 M series 1 diode array detector, and a Hewlett-Packard Chemstation. Gradient elution mode was used for separation in a mobile phase consisting of methanol and 0.1% (wt/vol) (10.2 mM) phosphoric acid starting from an initial ratio of 20% methanol and reaching 100% methanol in 14 min. The flow rate was 1 ml/min; detection wavelengths were 220 nm (UV) and 254 and 280 nm.

Data are reported as means for two separate experiments with replicated batch cultures. Standard deviation was no more than 7%.

Purification of intermediates was carried out on a Merck-Hitachi HPLC (Merck) system equipped with a model L 6200 A Intelligent Pump, a Rheodyne 7161 injection valve with a 100-μl loop, and a model L-4250 absorbance detector operating at 254 nm. Gradient elution mode was used for separation in a mobile phase consisting of methanol and 0.1% (wt/vol) (16.7 mM) acetic acid starting from an initial ratio of 20% methanol and reaching 60% methanol in 18.5 min, at a flow rate of 1 ml/min. For both HPLC systems a LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5-μm) column (Merck) was used.

For gas chromatographic analysis, whole cultures were lyophilized using an Alpha 1-4 apparatus (Christ, Osterode, Germany). The dried samples were resolved in 10 ml of methanol, centrifuged (at 5,000 × g for 5 min), and evaporated under a vacuum at 40°C. The methanol extracts were examined by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). The GC-MS system consisted of a GC 8000 gas chromatograph (Fisons, Mainz, Germany) and a Fisons MD 800 mass spectrometer operating at 70 eV. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.9 ml/min. Separation was carried out on a 30-m BPX 5 column (0.25-mm by, 0.33-μm film; SGE, Weiterstadt, Germany) at a temperature program from 80 to 300°C (10°C/min). High-resolution mass spectra were recorded on a Vacuum Generators (Manchester, United Kingdom) analytical instrument, model 70-250 SE.

Derivatization was achieved by methylation with diazomethane as described by De Boer and Backer (8) in a microapparatus (Z 10,100-1; Aldrich-Chemie).

Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy was carried out on a Bruker (Karlsruhe, Germany) ARX 300-MHz spectrometer or on a Bruker DRX500 instrument at 500 MHz. Deuterated methanol (99.99%) was used as a solvent and tetramethyl silane was used as a reference.

RESULTS

We identified 14 metabolites formed by *P. lilacinus* SBUG-M 1093 from biphenyl and selected biphenyl derivatives in aqueous supernatants or in methanol extracts obtained from lyophilized whole cultures (Table 1). After extraction of supernatants with ethyl acetate, the same pattern of metabolites was found. Seven mono- and dihydroxylated biphenyls were identified by comparison of UV and mass spectra with those of authentic standards. For some additional metabolites (products A through G), standards were not available. These products were characterized by GC-MS, by ¹H NMR, and (partially) by comparison with literature data (products B and G).

Formation of hydroxylated biphenyls. *P. lilacinus* strain SBUG-M 1093 can tolerate biphenyl at concentrations up to 1 mg/ml, accumulating 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl. During incubations with a lower concentration of biphenyl (0.1 mg/ml), 4,4'-dihydroxybiphenyl was formed as the major metabolite (Fig. 1). 2- and 4-Hydroxybiphenyl and an

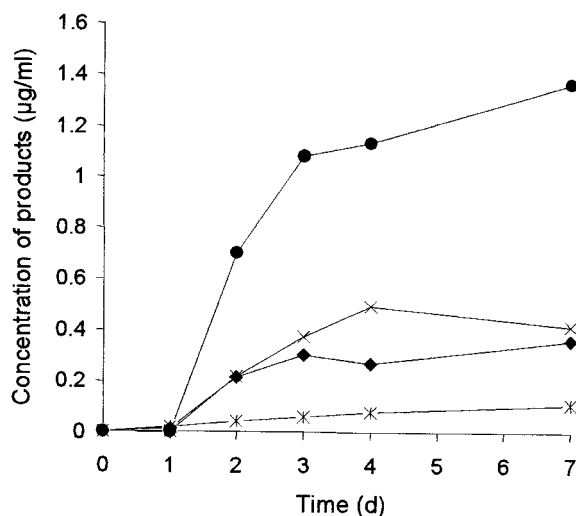


FIG. 1. Time-dependent formation of hydroxylated products from biphenyl by glucose-grown cells of *P. lilacinus* SBUG-M 1093 during incubation with biphenyl (0.1 mg/ml). Symbols: *, 2-hydroxybiphenyl; ♦, 4-hydroxybiphenyl; ●, 4,4'-dihydroxybiphenyl; ×, product A.

additional product (product A) were detected in smaller amounts by HPLC. After 24 to 96 h of incubation, concentrations of 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl increased. In contrast, the concentration of 2-hydroxybiphenyl increased slowly and at a constant rate (Fig. 1).

Initial oxidation of biphenyl leading to 4-hydroxybiphenyl, 2-hydroxybiphenyl, and traces of 3-hydroxybiphenyl was monitored by HPLC (for 4-hydroxybiphenyl, $\lambda_{\max} = 200, 262$ nm; for 2-hydroxybiphenyl; $\lambda_{\max} = 248, 276$ nm) and GC-MS analysis [m/z 170 ($C_{12}H_{10}O^+$, M^+), 141 ($C_{11}H_9^+$, M^+-CHO), 139 ($C_{11}H_7^+$, M^+-CH_3O), 115 ($C_9H_7^+$)] in comparison with synthetic standards. Mass spectral data [m/z 186 ($C_{12}H_{10}O_2^+$, M^+) 157 ($C_{11}H_9O^+$, M^+-CHO), 128 ($C_{10}H_8^+$, M^+-2CHO), 115 ($C_9H_7^+$), 77 ($C_6H_5^+$)] of the main product after incubation with biphenyl (0.1 mg/ml [Fig. 1]) were consistent with those for an authentic standard of 4,4'-dihydroxybiphenyl.

When *P. lilacinus* SBUG-M 1093 was incubated with 2-hydroxybiphenyl, 3-hydroxybiphenyl, and 4-hydroxybiphenyl, the cultures accumulated dihydroxylated derivatives of biphenyl, recognized by the fragmentation pattern in their mass spectra after GC separation [m/z 186 ($C_{12}H_{10}O_2^+$, M^+), 157 ($C_{11}H_9O^+$, M^+-CHO), 128 ($C_{10}H_8^+$, $M^+-C_2H_2O_2$), 115 ($C_9H_7^+$, $M^+-C_3H_3O_2$), 77 ($C_6H_5^+$, $M^+-C_6H_5O_2$)]. Incubation of 2-hydroxybiphenyl led to the formation of 2,3- and 2,5-dihydroxybiphenyl; 3-hydroxybiphenyl was transformed to 3,4-dihydroxybiphenyl; and 4-hydroxybiphenyl was transformed to 4,4'-dihydroxybiphenyl. Structural determinations were made following comparison of R_f -values (HPLC), UV spectra, and GC-MS retention times with the data of authentic standards.

GC-MS analyses of a methylated methanol extract of the lyophilized culture supernatant suggest the presence of an additional hydroxylated product (named product A) in cultures incubated with biphenyl (Fig. 1), 3,4-dihydroxybiphenyl (Fig. 2), and 4,4'-dihydroxybiphenyl. The molecular ion peak of the methyl derivative of this compound at m/z 244 and those of the

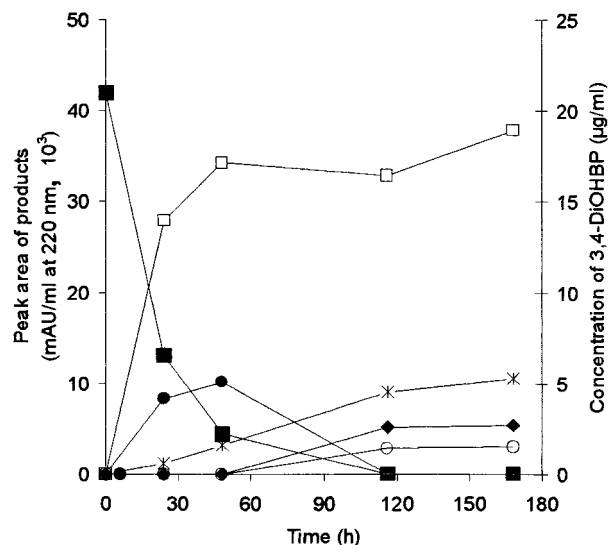


FIG. 2. Formation of products by glucose-grown cells of *P. lilacinus* SBUG-M 1093 during incubation with 3,4-dihydroxybiphenyl (0.05 mg/ml). Symbols: ●, product A; *, product B; □, product C; ♦, product D; ○, product E; ◼, product F; ■, 3,4-dihydroxybiphenyl (3,4-DiOHBP).

main fragments at m/z 229 ($C_{14}H_{13}O_3^+$, M^+-CH_3), 201 ($C_{13}H_{13}O_2^+$, M^+-COCH_3), and 115 ($C_9H_7^+$) were consistent with data for trihydroxylated biphenyl. In accordance with this assumption, high-resolution mass spectrometry showed the molecular formula to be $C_{15}H_{16}O_3$ (mass found, 244.109138; mass calculated, 244.109945). By comparing the GC-MS data with those of the synthesized 2,3,4-, 3,4,5-, and 3,4,4'-trihydroxybiphenyls and by coinjection of the methylated standards, product A was identified as 3,4,4'-trihydroxybiphenyl.

Formation of ring cleavage products. In addition to the hydroxylated biphenyl derivatives, further products (products B and C) were enriched in the supernatant after incubation with biphenyl (0.1 mg/ml). When fungal cells were incubated with hydroxylated intermediates (Table 1), it became clear that products B and C were formed from 3- and 4-hydroxybiphenyl as well as from 3,4-dihydroxybiphenyl. When 3,4-dihydroxybiphenyl was used as the substrate, additional metabolites (products D through G) were detected by HPLC (Fig. 3) or GC-MS analyses. Metabolites B, C, F, and G have HPLC retention values that suggested these compounds were acids. Consequently, methylation of the extracted compounds was necessary for GC-MS analysis.

Metabolite B was identified as 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid by GC-MS and 1H NMR analysis. The methyl derivative of this metabolite showed a molecular ion peak at m/z 230 ($C_{13}H_{10}O_4$) and main fragment ions at m/z 202 ($C_{12}H_{10}O_3^+$, M^+-CO), 171 ($C_{11}H_9O_2^+$, $M^+-COOCH_3$), and 115 ($C_9H_7^+$, $M^+-COOCH_3-2CO$) in GC-MS. The mass spectrum (Fig. 4) and 1H NMR data [6.83 (d, $J_{3,5} = 1.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.54 (m, $J_{2',4',4',6'} = 2.1$, $J_{3',4',4',5'} = 8.6$ Hz, 1H, 4'-H) 7.55 (m, $J_{3',4',4',5'} = 8.6$ Hz, 2H, 3', 5'-H), 7.57 (d, $J_{3,5} = 1.7$ Hz, 1H, 3-H), 7.78 (dd, $J_{2',4',4',6'} = 2.1$, 2H, 2', 6'-H) ppm] were consistent with those of a sample of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid, synthesized for reference.

Metabolite C, the main product resulting from transforma-

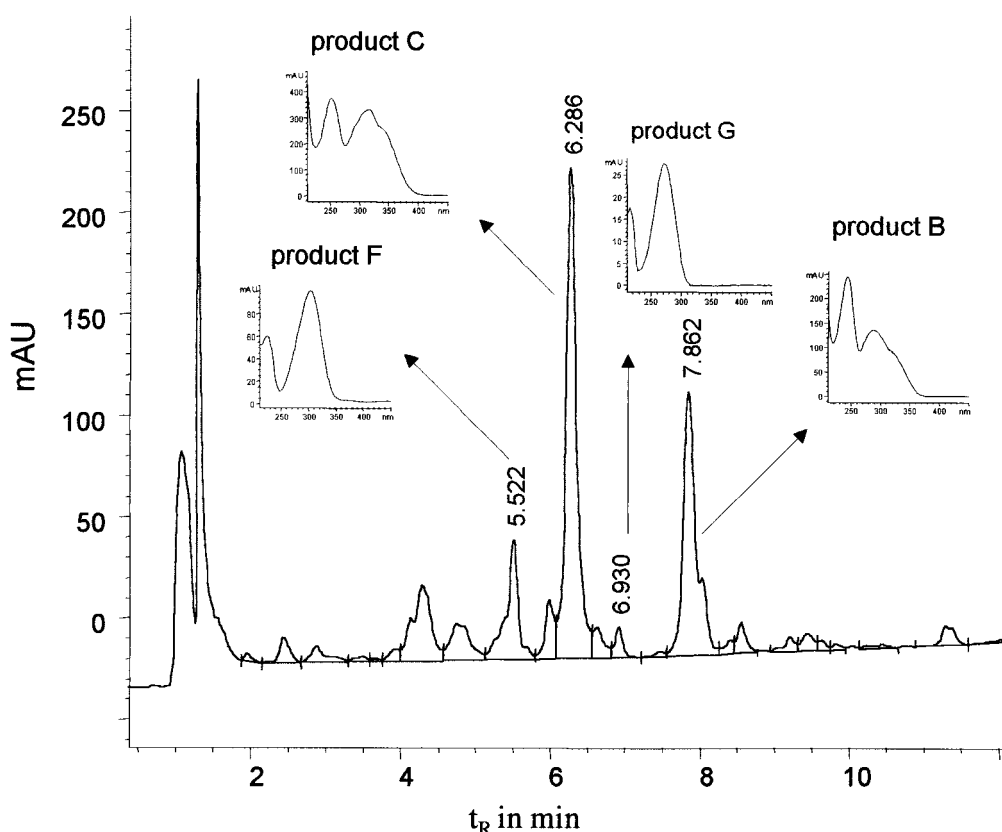


FIG. 3. HPLC elution profile of the aqueous supernatant after incubation of *P. lilacinus* SBUG-M 1093 with 3,4-dihydroxybiphenyl ($t_R = 8.57$ min; 0.1 mg/ml; 7 days) and UV absorption spectra of products B ($t_R = 7.86$ min), C ($t_R = 6.28$ min), F ($t_R = 5.52$ min), and G ($t_R = 6.93$ min).

tion of 3,4-dihydroxybiphenyl (Fig. 2), also was accumulated during incubation of *P. lilacinus* with 4,4'-dihydroxybiphenyl, 3,4,5-trihydroxybiphenyl, 3,4,4'-trihydroxybiphenyl, and 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid (Fig. 5). On the basis of the MS and ^1H NMR data, the formation of this compound from different *p,p'*-hydroxylated biphenyls, and its direct formation by hydroxylation of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid (Table 1), the structure of metabolite C was determined to be 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid. The mass spectral data of the methylated compound (Fig. 4) showed a molecular ion at m/z 260 and fragment ions at m/z 232 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$, $\text{M}^+ - \text{CO}$), 201 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3$, $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3$), and 145 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}$, $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3 - 2\text{CO}$). High-resolution mass spectrometry indicated that the molecular formula of product C was $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$ after methylation. The ^1H NMR data (500 MHz) obtained after separation of the lyophilized extract by preparative HPLC were as follows: δ 6.70 (s, 1H, 5-H), 6.95 (d, 2H, 3',5'-H), 7.57 (s, 1H, 3-H), 7.70 (d, 2H, 2',6'-H) ppm. The ^1H NMR spectrum showed two signals with single intensity and two signals with double intensity, pointing to six protons. The doublet signals at $\delta = 6.95$ and 7.70 ppm with a coupling constant of $J_{2',3';5',6'} = 8.7$ Hz indicate a phenyl ring with a hydroxyl group in the *para* position due to two pairs of protons in *ortho* positions of the aromatic ring.

Metabolites D and E, formed from 3,4-dihydroxybiphenyl, were detected only in the methanol extract by GC-MS. Product D was identified as 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid as follows.

According to high-resolution mass spectrometry analysis, the molecular ion peak m/z 276 of the methylated intermediate D had the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (mass found, 276.101303; mass calculated, 276.099774). The base peak at m/z 217, assigned to $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$, resulted in the loss of COOCH_3 from the molecular ion. Further fragment ions at m/z 261 ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5^+$, $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 245 ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4^+$, $\text{M}^+ - \text{OCH}_3$), 202 ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3^+$, $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3 - \text{CH}_3$), 185 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2^+$, $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3 - \text{CH}_4\text{O}$), and 59 (COOCH_3^+) correspond with a structure containing one or two methyl esters and one methoxy function, indicating that intermediate D is a hydroxylated (di)carboxylic acid. This compound was identical to a sample of 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid, derived from the photochemical treatment of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid, by GC-MS analysis. This structural assignment was further corroborated by the fact that products B and D can be chemically interconverted.

Product E, formed from 3,4-dihydroxybiphenyl and 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid (Table 1), was identified as 2-hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)-muconic acid. After methylation, the mass spectrum of this compound showed a molecular ion peak at m/z 306 and the main fragment ions at m/z 275 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5^+$, $\text{M}^+ - \text{OCH}_3$), 247 ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4^+$, $\text{M}^+ - \text{COOH}$), 232 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4^+$, $\text{M}^+ - \text{COOCH}_3 - \text{CH}_3$), 145 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}^+$), and 59 (COOCH_3^+). The similarities in the fragmentation pattern to that of metabolite D and the difference of m/z 30 between the distinctive fragments of both metabolites suggests, a doubly

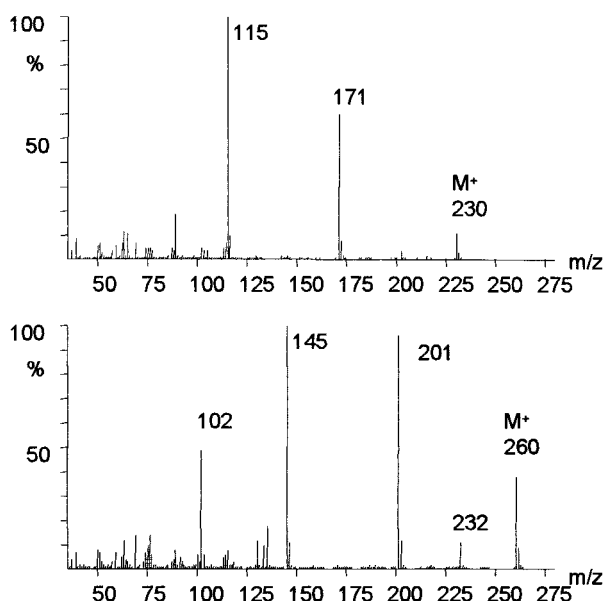


FIG. 4. Mass spectra of methylated products B (4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid) (top) and C [4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid] (bottom).

hydroxylated muconic acid with one hydroxy group at the *para* position of the aromatic ring system.

Metabolite F, formed after incubation with 3,4-dihydroxybiphenyl (Fig. 2 and 3), 4,4'-dihydroxybiphenyl, and 3,4,4'-trihydroxybiphenyl, was separated by HPLC and identified by GC-MS as well as by ^1H NMR as [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-acetic acid. The molecular ion peak of the methylated compound and the fragment ions were detected at m/z 262 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$, M^+), 234 ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$, M^+-CO), 189 ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3$, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 161 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2$, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3-\text{CO}$), 133 ($\text{C}_9\text{H}_9\text{O}^+$, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3-2\text{CO}$), and 132 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}^+$). The ^1H NMR data were as follows: δ 2.38 (dd, $J_{1,2} = 16.4$ Hz, $J_{1,3} = 9.5$ Hz, 1H, 1-H), 2.96 (dd, $J_{1,2} = 16.4$ Hz, $J_{2,3} = 2.7$ Hz, 1H, 2-H), 5.95 (ddd, $J_{1,3} = 9.3$ Hz, $J_{2,3} = 2.7$ Hz, $J_{3,4} = 1.4$ Hz, 1H, 3-H), 6.27 (d, $J_{3,4} = 1.4$ Hz, 1H, 4-H), 6.92 (m, 2H, 2',6-H), 7.52 (m, 2H, 3'5'-H) ppm.

Metabolite G resulted from the degradation of 3,4-dihydroxybiphenyl (Fig. 2 and 3) to (3-phenyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-acetic acid. The mass spectrum of the methylated compound showed the molecular ion peak at m/z 232 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$) and the main fragment ions at m/z 204 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$, M^+-CO), 159 ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_2$, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 131 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}^+$, $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3-\text{CO}$), 103 (C_8H_7^+ , $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{COOCH}_3-2\text{CO}$), and 102 (C_8H_6^+). Four signals in the ^1H NMR spectrum [δ 2.38 (dd, $J_{1,2} = 16.2$ Hz, $J_{1,3} = 9.3$ Hz, 1H, 1-H), 2.92 (dd, $J_{1,2} = 16.2$ Hz, $J_{2,3} = 2.8$ Hz, 1H, 2-H), 6.04 (ddd, $J_{1,3} = 9.3$ Hz, $J_{2,3} = 2.8$ Hz, $J_{3,4} = 1.5$ Hz, 1H, 3-H), 6.45 (d, $J_{3,4} = 1.5$ Hz, 1H, 4-H) ppm] showed a system of nonaromatic protons similar to that concluded from the ^1H NMR spectrum of compound F. In contrast, the aromatic proton signals at δ 7.49 (d, 1H, 4'-H), 7.51 (m, 2H, 2',6-H), and 7.65 (m, 2H, 3'5'-H) ppm indicated a monosubstituted and hence unhydroxylated aromatic ring system. HPLC, GC-MS, and ^1H NMR spectra, corresponded to a metabolite isolated and char-

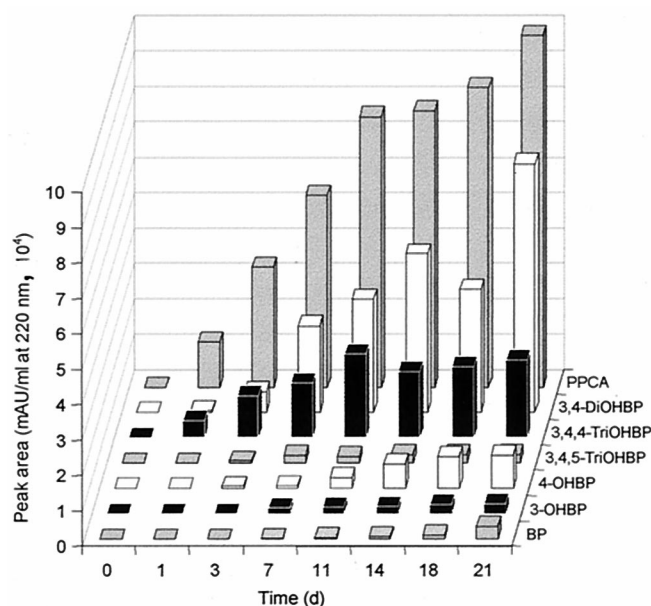


FIG. 5. Formation of product C [4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid] after incubation of glucose-grown cells of *P. lilacinus* SBUG-M 1093 with different biphenyl derivatives (BP, biphenyl; OHBP, hydroxybiphenyl; DiOHBP, dihydroxybiphenyl; TriOHBP, trihydroxybiphenyl; PPCA, 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid).

acterized after incubation of *Trichosporon mucoides* SBUG-M 801, a yeast that accumulates large amounts of intermediate G after incubation with 3,4-dihydroxybiphenyl (R. Sietmann et al., unpublished data).

DISCUSSION

P. lilacinus SBUG-M 1093 can metabolize biphenyl to monohydroxylated biphenyls (2-, 3-, and 4-hydroxybiphenyl), suggesting the action of monooxygenases during the initial oxidation step. Similar initial oxidation during transformation of biphenyl is known for yeasts of the genera *Candida* (5) and *Debaryomyces* (22) and for genera of the filamentous fungi *Absidia*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Gliocladium*, and *Helicostylum* (9, 12, 37). Secondary hydroxylation occurs on the first hydroxylated aromatic ring to produce 2,3-, 2,5-, and 3,4-dihydroxybiphenyl (4, 22). Furthermore, Mobley et al. (27) have reported the formation of 3,4-catechols of substituted biphenyls. As reported for several fungi, *P. lilacinus* favors the initial hydroxylation in the 4-position, yielding 4-hydroxybiphenyl, and the second hydroxylation in the 4'-positions, yielding 4,4'-dihydroxybiphenyl. This fungus also can perform a third hydroxylation of biphenyl to produce 3,4,4'-trihydroxybiphenyl. These results suggest that primary oxidation steps leading to monohydroxylated and dihydroxylated biphenyls and to 3,4,4'-trihydroxybiphenyl are similar to the metabolic conversion of biphenyl in mammals (25, 26, 38).

We detected two new ring fission products, 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid and 2-hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)muconic acid, as intermediates during degradation of 3,4-dihydroxybiphenyl by *P. lilacinus*. Formation of similar intermediates with a 2-hydroxy muconic acid structure was reported for degradation of phloroglucinol by *Fusarium solani* (43), of gallic acid by

Aspergillus flavus (13), of dibenzofuran by *T. mucoides* (15), and of diphenyl ether by *Trametes versicolor* (18).

Presumably ring cleavage of the aromatic structure can take place after introduction of a third hydroxyl group into the dihydroxylated aromatic ring (22). After incubation with 3,4,5-trihydroxybiphenyl, only the lactone structure 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid was detected. The formation of 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid is possible but not detectable after this incubation.

After incubation with 3,4-dihydroxybiphenyl, lactonic structures were prominent products (Fig. 2). However, 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid also was formed as a result of further hydroxylation of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid. The enrichment of further lactonic structures, (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid and [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]acetic acid, was demonstrated. The latter product also was found after incubation of *Aspergillus parasiticus* with biphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl (27). In this case the authors suggested that each biphenyl ring must be *para*-hydroxylated as a prerequisite for lactone formation. In contrast, in *P. lilacinus* a muconolactone structure, (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid, was formed from 3,4-dihydroxybiphenyl after hydroxylation of one of the aromatic ring systems followed by ring cleavage. Lactonization of substituted and unsubstituted muconic acids yielding corresponding muconolactone structures was reported by nonenzymatic isomerization under acidic conditions (30) as well as by the action of muconate cycloisomerases from various bacteria (40, 41, 42).

The accumulation of 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid and [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]acetic acid and the formation of 2-hydroxy-4-(4'-hydroxyphenyl)muconic acid suggest that *P. lilacinus* can further transform ring cleavage products B, D, and G. On the other hand, the trihydroxylated intermediate (3,4,4'-trihydroxybiphenyl) was cleaved by this filamentous fungus, leading directly to the hydroxylated lactone structures (Fig. 6).

The accumulation of hydroxyphenyl lactones suggests that they are deadend products in the pathway of the metabolism of biphenyl and substituted biphenyls. Comparison of the toxicity of hydroxylated biphenyls and the lactonic structures formed, using the method of Singer-Bohne et al. (35), pointed to detoxification of hydroxylated biphenyls by ring cleavage accompanied by lactone formation.

The results show that *P. lilacinus* oxidizes biphenyl to a broad variety of products that were not previously known from filamentous fungi. Six different ring cleavage products were identified. Their structures indicate a ring fission mechanism going via di- and trihydroxylated intermediates to muconic acid structures which can lactonize. Since the same ring fission mechanism had been described for *Aspergillus* (27) and *Debaryomyces* (22)—genera that are not related to *Paecilomyces*—the strain-specific ability of this feature seems to be widely distributed among different fungal species. The ability to produce di- or trihydroxylated biphenyls which can undergo ring fission to nontoxic products may be the reason for the resistance of several filamentous fungi to the fungicide biphenyl.

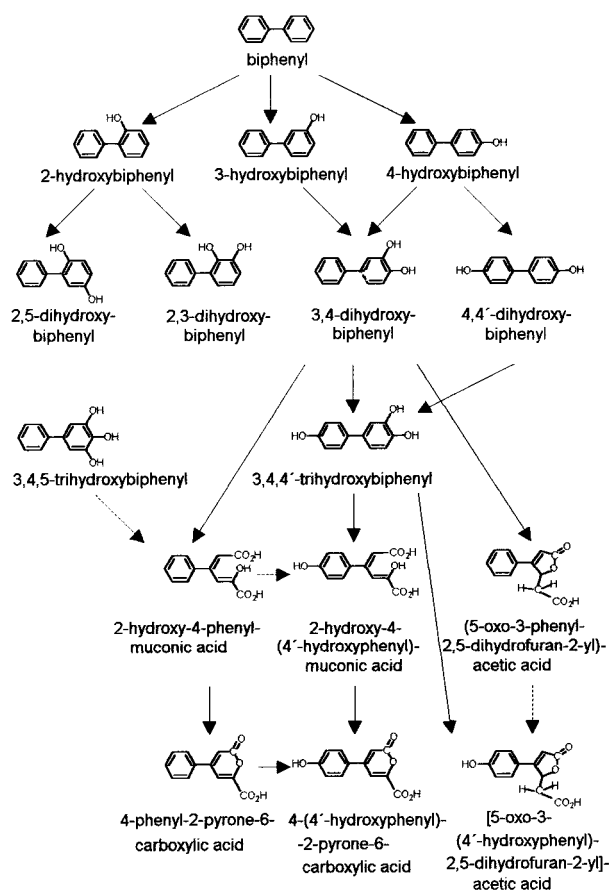


FIG. 6. Proposed pathway for the initial steps of biphenyl degradation in *P. lilacinus* SBUG-M 1093. →, transformation of *P. lilacinus*; —→ proposed transformation step, but intermediate not observed.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Deutsche Bundesstiftung Umwelt. We thank M. Kindermann and S. Siegert (Institute of Chemistry and Biochemistry, University of Greifswald) for recording NMR data, S. Franke (Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg) for acquiring high-resolution mass spectrometry data, and R. Jack (Institute of Immunology, University of Greifswald) for revising the manuscript.

REFERENCES

- Andersson, S. 1985. An improvement of the aluminium iodide method for ether cleavage: catalysis by quaternary ammonium iodides. *Synthesis* 4:437-439.
- Bruce, J. M., and F. K. Sutcliffe. 1955. Synthetic and oxidative studies in the polyhydroxydiphenyl series. Part I. *J. Chem. Soc.* 2:4435-4440.
- Catellani, D., A. Colombi, C. Sorlini, and V. Treccani. 1973. Metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* 134:1063-1066.
- Cerniglia, C. E. 1980. Aromatic hydrocarbons. Metabolism by bacteria, fungi and algae. *Rev. Biochem. Toxicol.* 3:321-361.
- Cerniglia, C. E., and S. A. Crow. 1981. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Arch. Microbiol.* 129:9-13.
- Coutrot, P., M. Snoussi, and P. Savignac. 1978. An improvement in the Wittig-Horner synthesis of 2-alkenoic acids. *Synthesis* 1978:33-134.
- Cox, J. C., and J. H. Golbeck. 1985. Hydroxylation of biphenyl by *Aspergillus parasiticus*: approaches to yield improvement in fermentor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 27:1395-1402.
- De Boer, T. D., and H. J. Backer. 1956. Diazomethane. *Org. Synth.* 36:14-16.
- Dodge, R. H., C. E. Cerniglia, and D. T. Gibson. 1979. Fungal metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* 178:223-230.
- Erdtman, H., G. Eriksson, T. Norin, and S. Forsen. 1963. Aucuparin and methoxyaucuparin, two phenolic biphenyl derivatives from the heartwood of

- Sorbus aucuparia* (L.). Acta Chem. Scand. **17**:1151–1156.
11. Gibson, D. T., R. L. Roberts, M. C. Wells, and V. M. Kobal. 1973. Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. Biochem. Biophys. Res. Commun. **50**:211–219.
 12. Golbeck, J. H., S. A. Albaugh, and R. Radmer. 1983. Metabolism of biphenyl by *Aspergillus toxicarius*: induction of hydroxylating activity and accumulation of water-soluble conjugates. J. Bacteriol. **156**:49–57.
 13. Gurujeyalakshmi, G., and A. Mahadevan. 1987. Degradation of gallic acid by *Aspergillus flavus*. Zentbl. Mikrobiol. **142**:187–192.
 14. Häkkinen, E., Siltanen, I., S. Hernberg, A. M. Seppäläinen, P. Karli, and E. Vakkula. 1973. Diphenyl poisoning in fruit paper production. Arch. Environ. Health **26**:70–74.
 15. Hammer, E., D. Krowas, A. Schäfer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 1998. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2215–2219.
 16. Horner, L., and K.-H. Weber. 1967. Darstellungen und Eigenschaften weiterer Chinone des Biphenyls. Chem. Ber. **100**:2842–2853.
 17. Horning, E. C., and J. A. Parker. 1952. Polymethoxybromobenzenes. J. Am. Chem. Soc. **74**:2107–2108.
 18. Hundt, K., U. Jonas, E. Hammer, and F. Schauer. 1999. Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. Biodegradation **10**:279–286.
 19. Javaheripour, H., and D. C. Neckers. 1977. Solid phase and solution photochemistry of coumalate esters. J. Org. Chem. **42**:1844–1851.
 20. Kaufman, D. D., and J. Blake. 1973. Microbial degradation of several acetamide, acylanilide, carbamate, toluidine, and urea pesticides. Soil Biol. Biochem. **5**:297–308.
 21. Körner, W., V. Hanf, W. Schuller, H. Bartsch, M. Zwirner, and H. Hagemmaier. 1998. Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. Chemosphere **12**:2395–2407.
 22. Lange, J., E. Hammer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 1998. Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanrijae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:364–368.
 23. Lotspeich, F. J., and S. Karickhoff. 1966. The synthesis and stereochemistry of 1,2,3,4,4a,11b-hexahydro-9,10,11-trimethoxydibenzo[b,d]thiepin-7(6H)-one. J. Org. Chem. **31**:2183–2187.
 24. Lunt, D., and W. C. Evans. 1970. The microbial metabolism of biphenyl. Biochem. J. **118**:54.
 25. Meyer, T., J. C. Larsen, E. V. Hansen, and R. R. Scheline. 1976. The metabolism of biphenyl. III. Phenolic metabolites in the pig. Acta Pharmacol. Toxicol. **39**:433–441.
 26. Meyer, T., and R. R. Scheline. 1976. The metabolism of biphenyl. II. Phenolic metabolites in the rat. Acta Pharmacol. Toxicol. **39**:419–432.
 27. Mobley, D. P., H. L. Finkbeiner, S. H. Lockwood, and J. Spivack. 1993. Synthesis of 3-aryl muconolactones using biphenyl metabolism in *Aspergillus*. Tetrahedron **49**:3273–3280.
 28. Mobley, D. P. 1994. Study of biphenyl hydroxylase activity in *Aspergillus parasiticus* using a colorimetric assay. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**:622–628.
 29. Musso, H., and H. Pietsch. 1967. Zur Struktur von 3,3'-Dihydroxy-diphenochinonen. Chem. Ber. **100**:2854–2869.
 30. Pieken, W. A., and J. W. Kozarich. 1990. Lactonization of *cis*, *cis*-3-halomuconates: influence of pH and halo substituent on the regiochemistry. J. Org. Chem. **55**:3029–3035.
 31. Reinhard, A. 1994. Characterization of fungi isolated from woody-chip piles, especially thermophilic and thermotolerant isolates. Microbiol. Res. **149**:75–83.
 32. Rey, M., E. Dunkelblum, R. Allain, and A. S. Dreiding. 1970. Synthesen von 2-Pyrenen aus α,β -ungesättigten Säurechloriden und tertiären Aminen. Helv. Chim. Acta **53**:2159–2175.
 33. Schultz, T. W., D. H. Kraut, G. S. Sayler, and A. C. Layton. 1998. Estrogenicity of selected biphenyls evaluated using a recombinant yeast assay. Environ. Toxicol. Chem. **17**:1727–1729.
 34. Schwartz, R. D., A. L. Williams, and D. B. Hutchinson. 1980. Microbial production of 4,4'-dihydroxybiphenyl: biphenyl hydroxylation of fungi. Appl. Environ. Microbiol. **39**:702–708.
 35. Singer-Bohne, B., M. Hofeneder, and H. P. Koch. 1993. Der Hefetest: Eine Ergänzungsmethode zur Bestimmung der akuten Toxizität von Arzneistoffen und Umweltgiften. BIOforum **16**:244–248.
 36. Smith, M. R., and C. Ratledge. 1989. Catabolism of biphenyl by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643 and *Nocardia* sp. 10503. Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**:395–401.
 37. Smith, R. V., P. J. Davis, A. M. Clark, and S. Glover-Milton. 1980. Hydroxylation of biphenyl by fungi. J. Appl. Bacteriol. **49**:65–73.
 38. Smith, R. V., and J. P. Rosazza. 1974. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. **161**:551–558.
 39. Soto, A. M., K. L. Sonnenschein, K. L. Chung, N. Fernandez, N. Olea, and M. F. Olea-Serrano. 1995. The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspect. **103**:113–122.
 40. Vollmer, M. D., and M. Schlömann. 1995. Conversion of 2-chloro-*cis*, *cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by chloromuconate cycloisomerase of pJP4 and pAC27. J. Bacteriol. **177**:2938–2941.
 41. Vollmer, M. D., H. Hoier, H.-J. Hecht, U. Schell, J. Gröning, A. Goldman, and M. Schlömann. 1998. Substrate specificity of and product formation by muconate cycloisomerase: an analysis of wild-type enzymes and engineering variants. Appl. Environ. Microbiol. **64**:3290–3299.
 42. Vollmer, M. D., U. Schell, V. Seibert, S. Lakner, and M. Schlömann. 1998. Substrate specificities of chloromuconate cycloisomerase from *Pseudomonas* sp. B13, *Ralstonia eutropha* JMP134 and *Pseudomonas* sp. P51. Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**:598–605.
 43. Walker, J. R. L., and B. G. Taylor. 1983. Metabolism of phloroglucinol by *Fusarium solani*. Arch. Microbiol. **134**:123–126.
 44. Wiseman, A., J. Gondal, and P. Sims. 1975. 4-Hydroxylation of biphenyl by yeasts containing cytochrome P-450. Biochem. Soc. Trans. **3**:278–285.

5.3 Biphenyl-Abbau durch *Trichosporon mucoides*

Novel Ring Cleavage Products in the Biotransformation of Biphenyl by the Yeast *Trichosporon mucoides*

Rabea Sietmann, Elke Hammer, Michael Specht, Carl. E. Cerniglia, Frieder Schauer
Appl. Environ. Microbiol. **2001**, 67(9), 4158–4165

Im Gegensatz zu den bei *Debaryomyces vanrijae* und *Paecilomyces lilacinus* ausschließlich durch ortho-Spaltung zwischen Position 3 und 4 erhaltenen Ringspaltungsprodukten des Biphenyls konnten für *Trichosporon mucoides* auch Metabolite aus dem Bruch der Bindung zwischen den Positionen 2 und 3 nachgewiesen werden. Die Hefe *Trichosporon mucoides* wurde aus einer mit Dioxinen kontaminierten Bodenprobe isoliert und auf Nährböden mit Glucose oder Phenol als Kohlenstoffquelle gezüchtet. *T. mucoides* ist in der Lage, Biphenyl in eine Vielzahl hydroxylierter Produkte zu transformieren, wobei der Umsatz bei mit Phenol angesetzten Kulturen stark erhöht ist. Zur Klärung des Metabolismus des Biphenyls in *T. mucoides* wurden Inkubationsversuche mit Biphenyl und nach Nachweis der initialen Metabolite diese als Substrate eingesetzt. Neben den möglichen Mono-Hydroxybiphenylen wurden die ortho-ständigen 2,3- und 3,4-Dihydroxydibenzofurane anhand kommerziell erhältlicher Standards als Abbauprodukte identifiziert. Der Nachweis von Trihydroxy-Biphenylen erfolgte anhand synthetisierten Referenzmaterials (siehe Kapitel 5.2). 2,3,4-, 3,4,5- und 3,4,4'-Trihydroxybiphenyl (**134-136**) waren nachweisbar. Zusätzlich wurden acht Ringspaltungsprodukte gefunden. Fünf waren bereits aus den Versuchen mit *Paecilomyces lilacinus* bekannt: 4-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **133**, 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyron-6-carbonsäure **137**, 2-Hydroxy-4-phenyl-muconsäure **138**, (5-Oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)essigsäure **140** und [5-Oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]essigsäure **141**. Die GC/MS-Analyse zweier methylierter Produkte zeigte bis auf geringe Intensitätsunterschiede das gleiche Fragmentierungsverhalten wie **133** bzw. **137** (Abbildung 5.8). Aufgrund von in den ¹H-NMR-Spektren vorhandenen J₃ Kopplungen zwischen den nicht-aromatischen Protonen konnten die Verbindungen als 3-Aryl-Isomere von **133** und **137** identifiziert werden: 3-Phenyl-2-pyron-6-carbonsäure **142** (Abbildung 5.9) und 3-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyron-6-carbonsäure **143**.

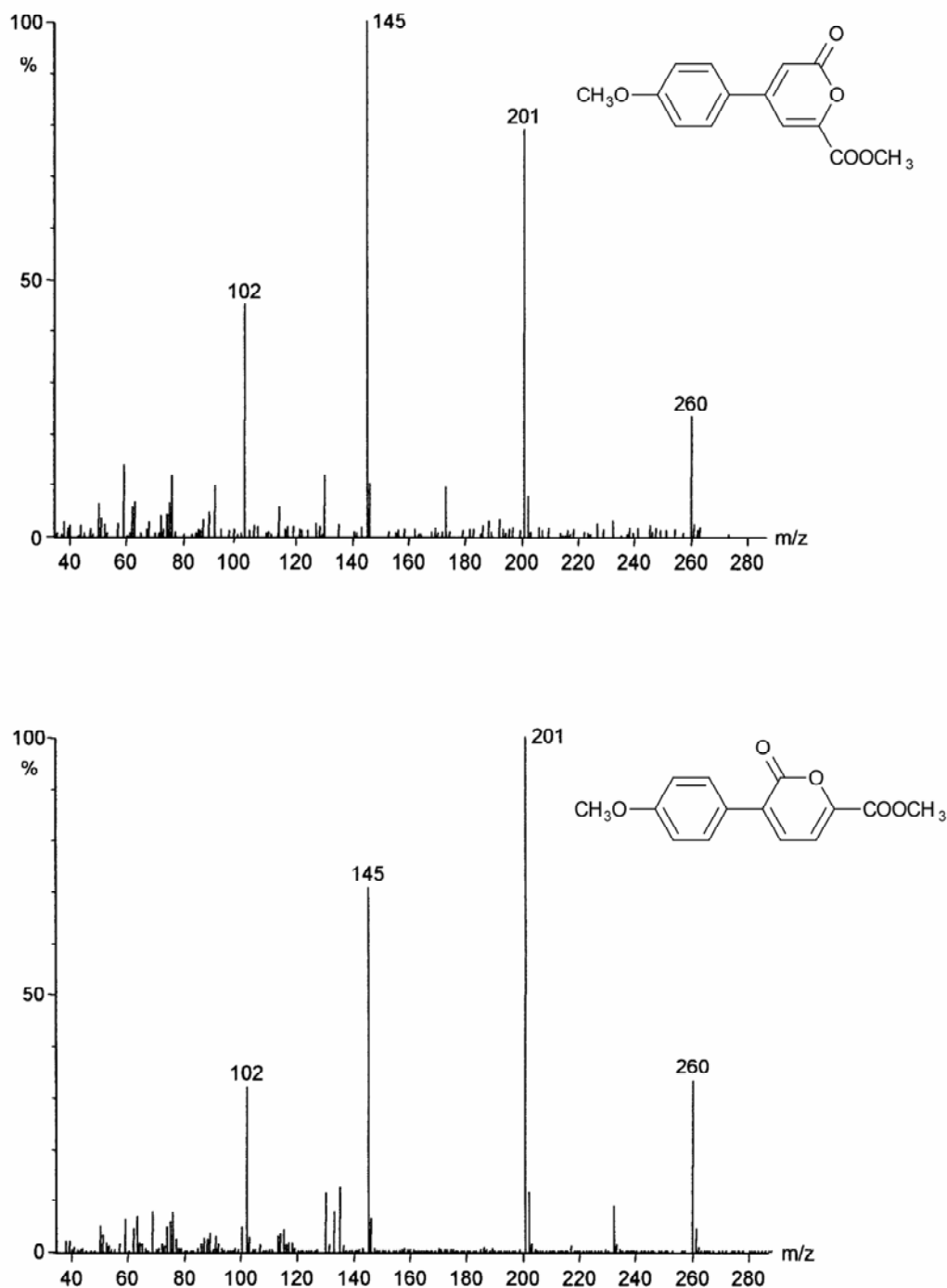
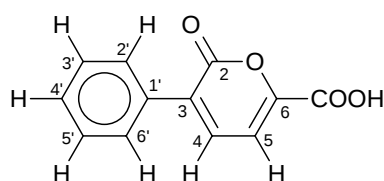
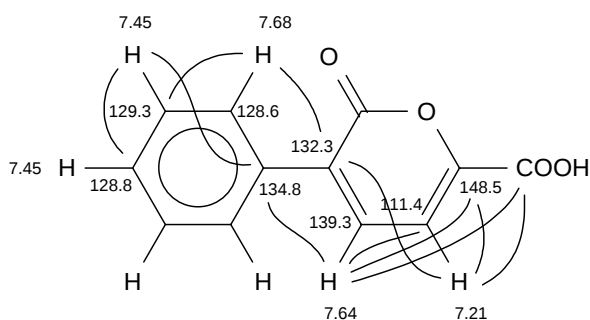


Abb. 5.8 Massenspektren der Methylderivate von 4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carbonsäure **137** und 3-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carbonsäure **143**

Ebenso konnte 2-Hydroxy-5-phenylmuconsäure, der wahrscheinliche Vorläufer des Metaboliten 3-Phenyl-2-pyrone-6-carbonsäure nachgewiesen werden. Mit diesen Ergebnissen konnte ein umfassendes Schema des Metabolismus von Biphenyl in *Trichosporon mucoides* erarbeitet werden.



142



¹H-NMR-Rohdaten

ppm	H's	Aufsp.	Kopp.
7.21	1	d	6.9 Hz
7.45	3	m	
7.64	1	d	6.9 Hz
7.68	2	m	

HMQC-Rohdaten

ppm	an C ~ppm
7.21	111.5
7.45	128.8 + 129.3
7.64	139.3
7.68	128.6

¹³C (HMBC+HMQC)

ppm
111.4
128.6
128.8
129.3
132.3
134.8
139.3
148.5
160.3

¹H

7.21, 1H, d, ³ J= 7.0 Hz	H-5
7.45, 3H, m	H-3',H-4',H-5'
7.64, 1H, d, ³ J= 7.0 Hz	H-4
7.68, 2H, m	H-2',H-6'

¹³C

111.4, 1C, CH	C-5
128.6, 2C, CH _{Ar}	C-2', C-6'
128.8, 1C, CH _{Ar}	C-4'
129.3, 2C, CH _{Ar}	C-3', C-5'
132.3, 1C, C _q	C-3
134.8, 1C, C _q	C-1'
139.3, 1C, CH	C-4
148.5, 1C, C _q	C-6
160.3, 1C, C _q	C-COOH

HMBC-Rohdaten

ppm	C's
7.21	132.3 148.5 160.3
7.45	128.8 134.8
7.64 (111)	134.8 148.5 160.3
7.68	129.4 132.3

Abb. 5.9 Korrelationsdaten der NMR-Untersuchungen von 3-Phenyl-2-pyrone-6-carbonsäure **142**

Nachdruck der Publikation

Novel Ring Cleavage Products in the Biotransformation of Biphenyl by the Yeast *Trichosporon mucoides*

Rabea Sietmann, Elke Hammer, Michael Specht, Carl. E. Cerniglia, Frieder Schauer
Appl. Environ. Microbiol. **2001**, 67(9), 4158–4165

mit Genehmigung der American Society for Microbiology.

Novel Ring Cleavage Products in the Biotransformation of Biphenyl by the Yeast *Trichosporon mucoides*

RABEA SIETMANN,^{1*} ELKE HAMMER,¹ MICHAEL SPECHT,² CARL E. CERNIGLIA,³ AND FRIEDER SCHAUER¹

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, D-17487 Greifswald,¹ Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, D-20146 Hamburg,² Germany, and National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas 72079³

Received 2 April 2001/Accepted 26 June 2001

The yeast *Trichosporon mucoides*, grown on either glucose or phenol, was able to transform biphenyl into a variety of mono-, di-, and trihydroxylated derivatives hydroxylated on one or both aromatic rings. While some of these products accumulated in the supernatant as dead end products, the *ortho*-substituted dihydroxylated biphenyls were substrates for further oxidation and ring fission. These ring fission products were identified by high-performance liquid chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance analyses as phenyl derivatives of hydroxymuconic acids and the corresponding pyrones. Seven novel products out of eight resulted from the oxidation and ring fission of 3,4-dihydroxybiphenyl. Using this compound as a substrate, 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid, (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid, and 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid were identified. Ring cleavage of 3,4,4'-trihydroxybiphenyl resulted in the formation of [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]acetic acid, 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid, and 3-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid. 2,3,4-Trihydroxybiphenyl was oxidized to 2-hydroxy-5-phenylmuconic acid, and 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid was the transformation product of 3,4,5-trihydroxybiphenyl. All these ring fission products were considerably less toxic than the hydroxylated derivatives.

Biphenyl occurs naturally in coal tar, crude oil, and natural gas. It is commonly used as an intermediate in the production of a variety of compounds, as a heat transfer medium in heating fluids, as a dye stuff carrier for textiles and copying paper, as a solvent in pharmaceutical production, and in the preservation of citrus fruits (7; Integrated Risk Information System [IRIS] on 1,1 Biphenyl [91-51-4], U.S. Environmental Protection Agency [http://www.epa.gov/ngispgm3/iris]). Biphenyl is commonly identified in environmental samples since it is formed during the incomplete combustion of mineral oil and coal and is present in the exhaust gases of vehicle traffic and from residential and industrial heating devices. Due to its widespread use, the toxicological properties have been investigated (14, 23). Biphenyl is not considered a human carcinogen and is nonmutagenic in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reversion assay with and without mammalian postmitochondrial supernatant (S9) to induce mutations. Negative genotoxicity results were also obtained in several mammalian gene mutation assays. However, chronic human exposure via inhalation can cause muscular weakness, central and peripheral nerve damage, and liver injury. Furthermore, process workers in a paper mill that were exposed to biphenyl-impregnated fruit wrapping paper had symptoms of biphenyl poisoning that included headache, tremors, abdominal pain, hepatic impairment, and neurological abnormalities (15).

The in vitro and in vivo metabolism of unsubstituted biphe-

nyls by eukaryotic organisms has been studied extensively. Mineralization has been proven for the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* producing ¹⁴CO₂ from radioactive labeled biphenyl (34). However, the most common transformation reaction is the hydroxylation of the aromatic ring, leading to a variety of mono-, di- and trihydroxylated intermediates (1, 2, 4, 8, 13, 20, 26, 30). Filamentous fungi and mammals favor initial hydroxylation at the 2 and 4 positions, respectively, followed by further hydroxylation on the second ring (6, 12, 25, 31). Conjugates of these hydroxylated derivatives of biphenyl have also been reported (6, 12, 37). In contrast, some yeasts prefer the same aromatic ring for the second hydroxylation (19). Most of these hydroxylated intermediates accumulated as dead end products. Only a few studies on the isolation and identification of ring cleavage products of biphenyl by eukaryotic organisms have been done. Strains of the fungus *Aspergillus* were able to form 3-arylmuconolactones from 4,4'-dihydroxybiphenyl (21) and the ascomycetous yeast *Debaryomyces hansenii* produced 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid from 3,4-dihydroxybiphenyl (19). Our objectives were (i) to determine the pathway of biphenyl up to cleavage of the aromatic ring system by the anamorphic basidiomycetous yeast *Trichosporon mucoides*, the structure of ring cleavage products, and the chemical intermediates through which the ring cleavage occurs and (ii) to investigate the toxicity of these ring cleavage products.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms, media, and incubation conditions. *T. mucoides* was isolated from a dioxin-contaminated soil sample (16). The strain was deposited as *T. mucoides* SBUG 801 into the strain collection of the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG) and as DSM 12017 into the Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

* Corresponding author. Mailing address: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, F.-L.-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, Germany. Phone: 49-3834-864210. Fax: 49-3834-864202. E-mail: sietmann@biologie.uni-greifswald.de.

Saccharomyces cerevisiae SBUG 118 was obtained from the collection of strains in the Department of Biology at the University of Greifswald.

Biphenyl transformation experiments involved *T. mucoides* SBUG 801 cells grown under two different conditions. The cultivation of glucose-grown cells was carried out in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of mineral salts medium (MM), pH 5.4, supplemented with 2% glucose and 1 ml of vitamin solution (35) according to a method described previously (16). Cultures were incubated for 48 h on a rotary shaker at 30°C and 180 rpm. For the cultivation of *T. mucoides* cells with phenol, cells were first grown in 100 ml of MM supplemented with 1% glucose and 0.2% yeast extract. After 24 h of cultivation, 5-ml cell suspensions were transferred into 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of MM supplemented with 0.05% phenol and 0.2% yeast extract. After 16 h of cultivation, cells were induced again with 0.05% phenol for an additional 3 h.

Glucose- and phenol-grown cells were harvested by centrifugation at $3,100 \times g$ for 5 min at 4°C, washed twice in sterile MM, and resuspended in 5 to 10 ml of MM. Biphenyl was added to sterile 200-ml Erlenmeyer flasks as a diethyl ether solution in a final concentration of $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1.62 \text{ mmol liter}^{-1}$). After the evaporation of the diethyl ether in about 12 h, 40 ml of MM was added to each flask and flasks were shaken for 24 h at 30°C and 180 rpm to reach saturation of the compound in the liquid medium. Transformation products of biphenyl used as substrates were added to a final concentration of 20 or $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Then, the cell suspension was added until an optical density (A_{600}) of 6.0 was reached. Cultures were incubated with biphenyl or transformation products for 120 h on a rotary shaker at 30°C and 180 rpm. Flasks with cell suspension in MM without substrate, or with biphenyl and transformation products without cells, and autoclaved cells were used as controls.

Detection and identification of transformation products. At intervals during the incubation, 1 ml of cell suspension was removed aseptically and centrifuged to remove cells. Then, 100- μl aliquots of the supernatant were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) for biotransformation products. Experiments were replicated at least three times, and the standard deviation of each metabolite concentration was not more than 12%.

To purify products for further characterization, larger amounts of cell suspensions were used. For that, 10 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of cell suspension with the different substrates were incubated as mentioned earlier. Supernatants were extracted three times with an equal volume of ethyl acetate, pH 7, and then extracted again in the same manner after acidification of the aqueous phase to pH 2 with 6 N HCl. Extracts were dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated by rotary evaporation. The residues obtained were dissolved in methanol and analyzed by HPLC and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis for detection and characterization of the transformation products.

Chemical analysis and identification of products. HPLC was performed on a Hewlett Packard (Bad Homburg, Germany) HPLC model 1050 M equipped with a quaternary pump system, a diode array detector (1040 M series I) set at 220 and 254 nm, and an HP Chemstation. Transformation products were separated on a LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5 μm) column (Merck, Darmstadt, Germany) using a solvent system of acetonitrile and phosphoric acid (0.1% [wt/vol]) with a linear gradient from 20 to 90% acetonitrile within 14 min at a flow rate of 1 ml min^{-1} .

For the purification of products, a semipreparative HPLC was conducted on a LiChrospher 100 RP-18 end-capped column (16 by 250 mm, 10 μm ; Knauer, Berlin, Germany) by using methanol–0.1% acetic acid (80:20 [vol/vol]) for neutral extracts and 50:50 [vol/vol] for acidic extracts as the mobile phase at a flow rate of 8 ml min^{-1} .

For GC-MS analyses, a coupled system consisting of a GC 8000 gas chromatograph (Fisons Instruments, Mainz, Germany) equipped with a 30-m DB5-ms column (0.25-mm-by-0.33- μm film; J and W Scientific, Folsom, Calif.) and a mass selective detector MD 800 (Fisons Instruments) operating at 70 eV or a TSQ 700 (Finnigan Corp., San Jose, Calif.) triple quadrupole mass spectrometer operated in a single quadrupole mode (Q1) was used. Separation on the column was achieved by using a temperature program from 80 to 300°C (10°C/min). Acid extracts were derivatized by methylation with diazomethane (5).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained at 500 MHz with a Bruker AM500 spectrometer (Bruker Instruments, Billerica, Mass.) at 28°C. The products were dissolved in methanol- d_3 (99.96 atom% ^2H). ^1H NMR spectra of product I were recorded on a 500-MHz Inova spectrometer Varian (Palo Alto, Calif.) at 27°C. The sample was dissolved in dimethyl sulfoxide. Assignments of resonance signals to specific proton and carbon atoms are based on their chemical shifts, integrals, and data from selective homonuclear decoupling experiments (correlated spectroscopy [COSY] and nuclear Overhauser effect spectroscopy [NOESY]) as well as data from heteronuclear experiments (heteronuclear

multiple bond correlation [HMBC] and heteronuclear multiple quantum coherence [HMQC]).

Toxicity test. The toxicity of biphenyl transformation products was estimated by their influence on the growth of eukaryotic cells with glucose in MM (28) for *T. mucoides* SBUG 801 and *S. cerevisiae* SBUG 118. The cultivation of cells was carried out in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of MM supplemented with 2% glucose and 1 ml of vitamin solution (*T. mucoides*) as well as 2% glucose and 0.2% yeast extract (*S. cerevisiae*) as described above. Cultures were incubated for 24 h at 30°C with rotary shaking (180 rpm).

For the tests, various concentrations of biphenyl as well as transformation products (10, 50, 100, and $250 \mu\text{g ml}^{-1}$) were added to 200-ml Erlenmeyer flasks containing 40 ml of MM. Flasks were shaken for 24 h at 30°C and 180 rpm so the compounds could reach saturation in the liquid medium. After 24 h, 1% glucose and 0.2 ml of vitamin solution (*T. mucoides*) and 1% glucose and 0.2% yeast extract (*S. cerevisiae*), respectively, were added to the flasks as well as an equal amount of the culture described above to reach an optical density (A_{600}) of 0.2. Flasks were shaken for 48 h at 30°C and 180 rpm, and samples were removed at intervals for spectrometric analysis (optical density at 600 nm) to determine the cell growth. Supplemented flasks without biphenyl or transformation products were used as controls.

All experiments described were carried out in duplicate.

Chemicals. Biphenyl and 2-hydroxybiphenyl were obtained from Merck, 3-hydroxybiphenyl and 4-hydroxybiphenyl were from Aldrich (Steinheim, Germany), and 2,3-dihydroxybiphenyl was from Wako Chemicals (Neuss, Germany). 3,4-Dihydroxybiphenyl was purchased from Promochem (Wesel, Germany). 2,3,4-Trihydroxybiphenyl, 3,4,5-trihydroxybiphenyl, 3,4,4'-trihydroxybiphenyl, and 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid were synthesized by methods described by Gesell et al. (11).

NMR solvents were purchased from Cambridge Isotope Labs (Andover, Mass.). All other chemicals were of reagent grade or were the highest available purity.

RESULTS

Glucose-grown as well as phenol-grown cells of *T. mucoides* SBUG 801 were able to hydroxylate biphenyl into a large variety of mono-, di-, and trihydroxylated products. Hydroxylation occurred on one or both aromatic rings. About 30% of the biphenyl used ($1.62 \text{ mmol liter}^{-1}$) based on the molar yield was transformed by glucose-grown cells to products within 120 h, quantified by gas chromatographic analysis (27). Most of the transformation products accumulated in the culture supernatant. While 2,3- and 3,4-dihydroxybiphenyl as well as 3,4,4'-trihydroxybiphenyl were isolated as transformation products of biphenyl, 2,3,4- and 3,4,5-trihydroxybiphenyl were not detected but were transformed if used as substrates. Phenol-grown cells oxidized biphenyl and its transformation products more rapidly, and the resulting products were produced in higher quantity. Thus, for instance, after 24 h of incubation with biphenyl, the amount of product I (see below) was 3.75 times higher with phenol-grown cells than with glucose-grown cells. However, in general, the transformation pathway of biphenyl by *T. mucoides* was independent of the previous mode of cultivation. The only exception was observed in the case of 2,3-dihydroxybiphenyl, which was transformed only by phenol-grown cells. We recently reported that hydroxylated biphenyls with at least two hydroxy groups adjacent to each other underwent further transformation, revealing transformation products with unknown chemical structures (27). Therefore, such di- and trihydroxylated derivatives of biphenyl were used as substrates in this investigation to determine the identification of ring cleavage products and the pathway of biphenyl transformation.

Biotransformation of ortho-substituted dihydroxylated derivatives of biphenyl. The 3,4-dihydroxybiphenyl was oxidized completely by glucose- as well as phenol-grown cells into 3,4,4'-trihydroxybiphenyl (found in trace amounts and detect-

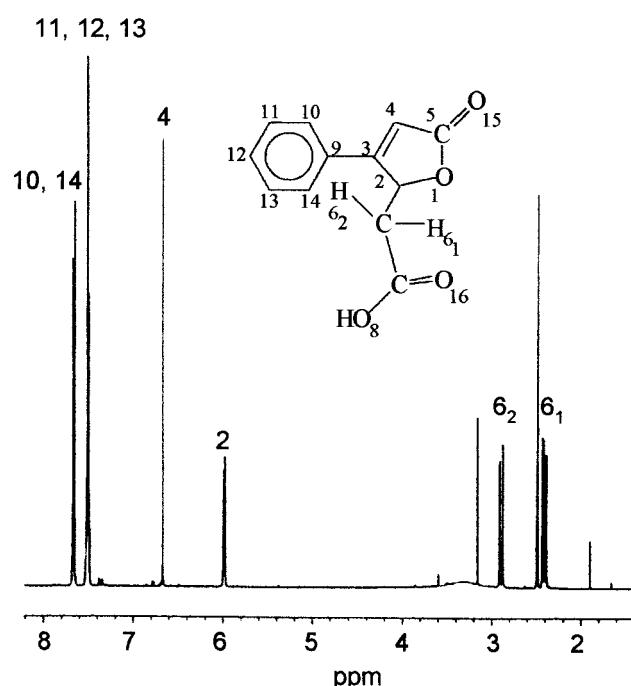


FIG. 1. ^1H NMR spectrum of (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid (product I).

able only by GC-MS analysis) and four unknown products named I, II, III, and IV. For instance, phenol-grown cells transformed 3,4-dihydroxybiphenyl ($108 \mu\text{mol liter}^{-1}$) completely within 24 h, accumulating product I (80% of the substrate added), product II (4%), and product IV (15%). Product III was found only in trace amounts.

Product I was extracted at pH 7 and pH 2. The other three transformation products (II, III, and IV) were enriched only by extraction with ethyl acetate at pH 2. Acidic extracts suggest that ring fission products were formed. This assumption was

verified for product IV, identified by HPLC and GC-MS analysis as 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid by comparison with the available standard (19). The other products extracted at pH 2 (I, II, and III) were separated by semipreparative HPLC and identified by extensive GC-MS and NMR analysis.

2,3-Dihydroxybiphenyl was transformed only by phenol-grown cells into product II, extractable with ethyl acetate at pH2.

Identification of product I. Spectra received by ^1H NMR (Fig. 1), ^{13}C NMR, and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -correlated NMR spectroscopy as well as long-range coupling experiments like HMQC and NOESY identified one methylene group, a carboxyl group, a hydrofuran ring, and a monosubstituted phenyl ring for product I. The data were as follows: δ 2.42 (dd, 1H, $J_{6-1/6-2} = 16.5$ Hz, $J_{6-1/2} = 8.8$ Hz (v), H6-1), 2.88 (dd, 1H, $J_{6-1/6-2} = 16.5$ Hz, $J_{6-2/2} = 3.03$ Hz, H6-2), 5.99 (dq, 1H, $J_{2/6-1} = 8.8$ Hz, $J_{2/6-2} = 3.03$ Hz, $J_{2/4} = 1.6$ Hz, H2), 6.67 (d, 1H, $J_{4/2} = 1.6$ Hz, H4), 7.51 (m, 3H, H11; H12; H13), and 7.66 (m, 2H, H10; H14) ppm. The proton-proton spin coupling of product I showed a high similarity to ^1H NMR spectra reported for 3-arylmucolactones (21). GC-MS analysis of product I showed a molecular mass (m/z) of 218. By high-resolution mass spectral analysis, the result was verified (218.058200, 218.057909). The fragmentation pattern of this compound (Table 1) indicated the loss of two carboxylic groups and ethylene. The data obtained by GC-MS and NMR analysis led to the identification of product I as (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid.

Identification of product II. GC-MS analysis of the methylated compound II showed a peak in the chromatogram with a molecular weight of m/z 230 (Table 1). The fragmentation pattern of the compound was very similar to the one obtained for 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid. Only the intensities of the fragment ions varied. The loss of a carboxyl group ($M^+ - 59$) and a quinone group ($M^+ - 28$) were strong hints for the occurrence of a lactone structure. The ^1H NMR spectrum of product II showed the presence of seven protons [δ 7.21 (d, 1H, $J^3 = 7.0$ Hz, H5), 7.45 (m, 3H, H3'; H4'; H5'), 7.64 (d, 1H,

TABLE 1. Ring cleavage products produced during the biotransformation of hydroxylated biphenyls by *T. mucoides* SBUG 801 as revealed by GC-MS analyses

Compounds ^a	Identification	Characteristic mass ions (m/z) (relative abundance [%])
I	(5-Oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid	218 [M^+] (32), 172 [M]-HCOOH (56), 131 [M]-CH ₂ COOH-CO (56), 103 [M]-CH ₂ COOH-2CO (100), 77 C ₆ H ₅ (32)
II	3-Phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid	230 [M^+] (20), 202 [M]-CO (6), 171 [M]-COOCH ₃ (100), 115 [M]-COOCH ₃ -2CO (95)
III	2-Hydroxy-4-phenylmuconic acid	276 [M^+] (2), 261 [M]-CH ₃ (2), 245 [M]-OCH ₃ (5), 217 [M]-COOCH ₃ (100), 202 [M]-CH ₃ -COOCH ₃ (5), 185 [M]-COOCH ₃ -CH ₃ OH (12), 115 [M]-COOCH ₃ -2CO (28), 59 (COOCH ₃ ⁺) (8)
IV	4-Phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid	230 [M^+] (30), 202 [M]-CO (4), 171 [M]-COOCH ₃ (72), 115 [M]-COOCH ₃ -2CO (100)
V	2-Hydroxy-5-phenylmuconic acid	276 [M^+] (4), 245 [M]-OCH ₃ (6), 217 [M]-COOCH ₃ (100), 202 [M]-CH ₃ -COOCH ₃ (14), 185 [M]-COOCH ₃ -CH ₃ OH (4), 115 [M]-COOCH ₃ -2CO (52), 59 [COOCH ₃ ⁺] (18)
VI	[5-Oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]acetic acid	262 [M^+] (30), 234 [M]-CO (35), 189 [M]-CH ₂ COOCH ₃ (20), 161 [M]-CH ₂ COOCH ₃ -CO (45), 133 [M]-CH ₂ COOCH ₃ -2CO (100), 132 [C ₉ H ₈ O ⁺] (75)
VII	4-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid	260 [M^+] (22), 232 [M]-CO (5), 201 [M]-COOCH ₃ (80), 145 [M]-COOCH ₃ -2CO (100), 102 (45)
VIII	3-(4'-Hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid	260 [M^+] (35), 232 [M]-CO (10), 201 [M]-COOCH ₃ (100), 145 [M]-COOCH ₃ -2CO (70), 102 (32)

^a Compounds II to VIII were completely methylated

$J^3 = 7.0$ Hz, H4), 7.68 (m, 2H, H2'; H6') ppm]. One triplet and two multiplets indicated a nonsubstituted aromatic ring, and two coupling doublets presented the other ring system. By ^{13}C NMR analysis, the presence of 12 carbons was demonstrated. By using extensive NMR techniques like HMQC and HMBC as well as GC-MS analysis, product II was identified as 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid.

Identification of product III. The mass spectrum of the methylated compound consisted of a base peak at m/z 276 and a major fragment ion at m/z 217 [M^+]- COOCH_3 (Table 1). These mass spectral data corresponded to a product isolated and characterized after incubation of the imperfect fungus *Paecilomyces lilacinus* with 3,4-dihydroxybiphenyl (11), and thus product III was identified as 2-hydroxy-4-phenylmuconic acid.

Biotransformation of trihydroxylated derivatives of biphenyl. Similar to incubation experiments with 2,3-dihydroxybiphenyl, the carbon source of cultivation of the yeast cells had a great influence on the transformation of 2,3,4-trihydroxybiphenyl. This substrate ($99 \mu\text{mol liter}^{-1}$) was transformed completely by phenol-grown cells into the novel product V within 6 h of incubation. Glucose-grown cells produced the same product only in very small quantities, and the 2,3,4-trihydroxybiphenyl decreased only insignificantly.

Using 3,4,5-trihydroxybiphenyl as a substrate, HPLC analysis showed the formation of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid (product IV) as a major product as well as two other products with UV spectra similar to those of products I and II. Phenol-grown cells transformed 3,4,5-trihydroxybiphenyl ($99 \mu\text{mol liter}^{-1}$) completely within 6 h, accumulating 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid ($26 \mu\text{mol liter}^{-1}$) and the products mentioned above, whereas glucose-grown cells did not totally transform the substrate within 120 h of incubation and less 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid ($6.5 \mu\text{mol liter}^{-1}$) was produced.

HPLC analysis of the incubation assay with 3,4,4'-trihydroxybiphenyl revealed the formation of two additional products (VI and VII). GC-MS analysis of the ethyl acetate extract showed three products, VI, VII, and VIII. While product VI was extractable with ethyl acetate at pH 7 and pH 2, products VII and VIII were recovered from the organic phase only after acidification of the supernatant and were purified by semi-preparative HPLC analysis. This distribution of the products was similar to that obtained by using 3,4-dihydroxybiphenyl as a substrate.

Identification of product V. GC-MS analysis of the methylated compound V revealed two peaks in the chromatogram with masses of m/z 230 and m/z 276. The compound with the mass m/z 230 had a fragmentation pattern identical to the one obtained for product II (Table 1). The electron impact mass spectrum of the peak (m/z 276) indicated the loss of two carboxylic groups and one methylated hydroxy group. Product II was identified as 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid. Together with the fact that lactones can result from muconic acids (9, 10), we assumed that product V was the methylated derivative of 2-hydroxy-5-phenylmuconic acid. The ^1H NMR spectrum of product V showed one multiplet, two doublets of doublets indicating a nonsubstituted aromatic ring, and two coupled doublets [δ 6.40 (d, 1H, $J^3 = 9.5$ Hz, H3), 7.33 (m, 1H, H4'), 7.36 (dd, 2H, $J^3 = 6.8$ Hz, H3'; H5'), 7.42 (d, 2H, $J^3 = 8.0$ Hz, $J^4 = 1.3$ Hz, H2'; H6'), 7.65 (d, 1H, H4) ppm]. An addi-

tional ^{13}C NMR analysis proved the presence of 12 carbons. Based on these NMR and GC-MS data, the product V was identified as 2-hydroxy-5-phenylmuconic acid.

Identification of product VI. Derivatization with diazomethane was necessary to analyze product VI by GC-MS, showing a fragmentation pattern in the mass spectrum similar to the one of the methylated product I (m/z 232). The methylated derivative revealed a molecular ion at m/z 262 and significant fragment ions (Table 1) at m/z 132 and m/z 133, indicating the loss of two methylated carboxyl groups and ethylene. UV-Vis spectra, HPLC retention time, and GC-MS data were identical with those of [5-oxo-3-(4'-hydroxyphenyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]acetic acid characterized after incubation of *P. lilacinus* with 3,4,4'-trihydroxybiphenyl (11).

Identification of products VII and VIII. To analyze products VII and VIII by GC-MS, derivatization with diazomethane was necessary. Both products showed molecular masses of m/z 260 (Fig. 2). The high similarity of the mass spectral data to those of product II, as well as to an already identified product within the transformation of biphenyl by *P. lilacinus*, resulted in the identification of product VII as 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid. This structure was confirmed by high-resolution mass spectral data and ^1H NMR analysis (11).

The fragmentation pattern of product VIII resembled the one of 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid (product VII). The only difference consisted in the varying intensities of the fragment ions. Behavior such as that of the intensities of the fragment ions within the same fragmentation pattern can also be seen for product II (Table 1). Therefore, product VIII can be postulated to be 3-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid.

Toxicity of biphenyl and products formed during the transformation of biphenyl. Biphenyl, 2-, 3-, and 4-hydroxybiphenyl, and 2,3- and 3,4-dihydroxybiphenyl, as well as the ring fission products 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and a mixture of (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid and 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid, were tested for their influence on glucose-grown cells of *T. mucoides* (Fig. 3). Cultures in the presence of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and the mixture of (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid and 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid showed only slightly reduced growth (93 to 95%) compared with the control experiment. At the end of cultivation (48 h), the optical densities of all cultures and of the control were similar. In contrast, cultures grown in the presence of biphenyl and monohydroxylated intermediates reached the same optical density only at the lowest concentration of the compound ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). The same dependency between the concentration of the aromatic compound and the inhibition of growth was observed in the presence of 3,4-dihydroxybiphenyl, but the growth was already reduced at the lowest concentration used. 2,3-Dihydroxybiphenyl inhibited growth at increasing concentrations. These results were confirmed by growth inhibition experiments done with the yeast *S. cerevisiae*, which does not have the capability to transform hydroxylated biphenyls. A strong inhibition was found in case of 4-hydroxybiphenyl and 3,4-dihydroxybiphenyl. On the other hand, the addition of the same amount of 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and the mixture of (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid and 3-phenyl-2-py-

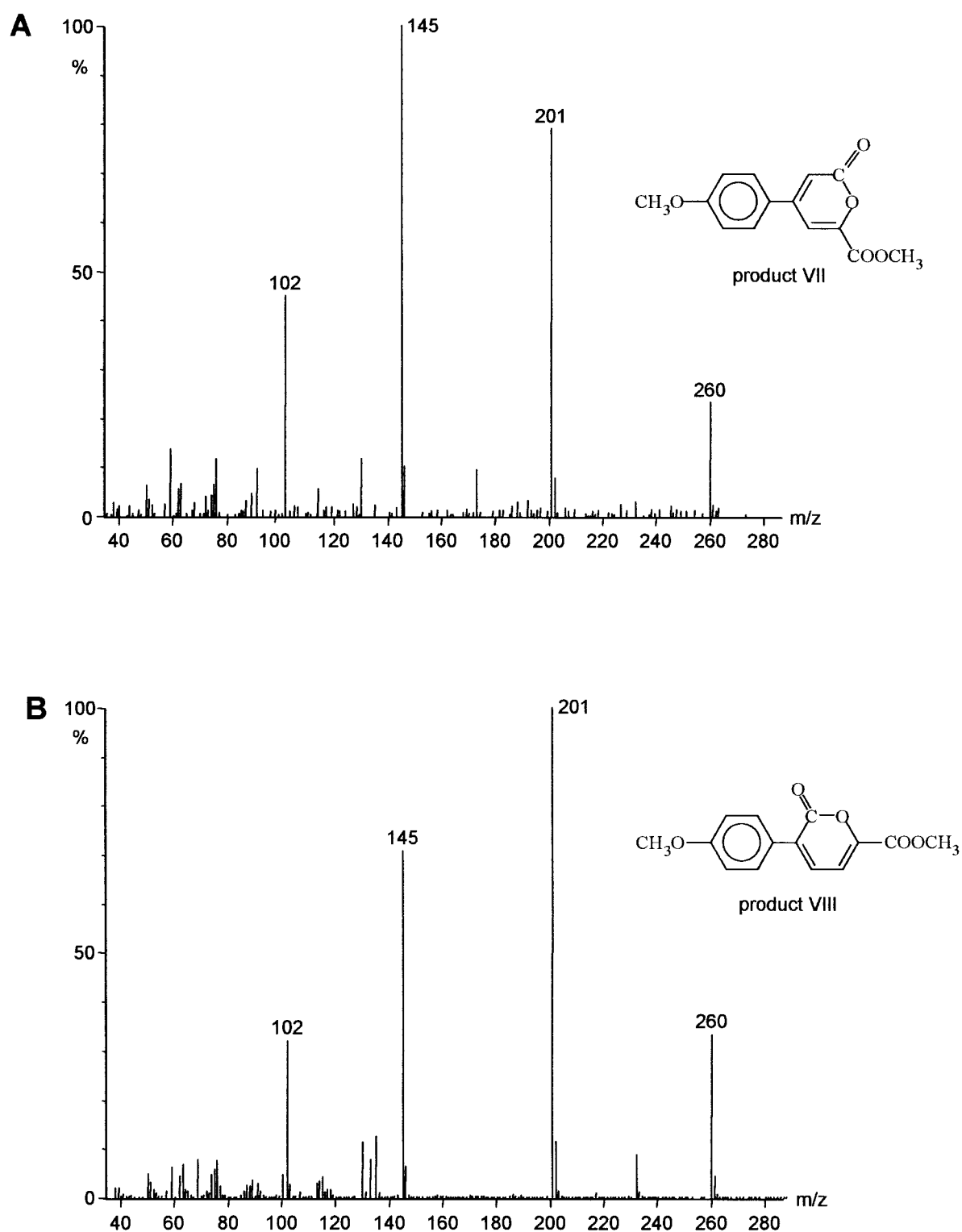


FIG. 2. Mass spectra of methylated 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid (product VII) (A) and methylated 3-(4'-hydroxyphenyl)-2-pyrone-6-carboxylic acid (product VIII) (B).

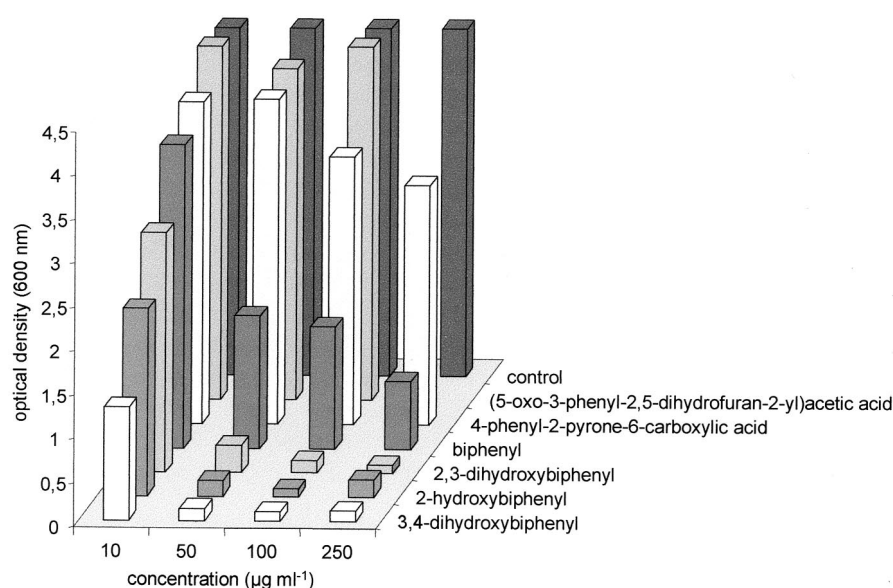


FIG. 3. Influence of biphenyl and selected products formed during the biotransformation of biphenyl by *T. mucoides* SBUG 801 on the growth of this organism with 1% glucose by measuring the optical density (A_{600}) after 12 h. Cells grown with 1% glucose without the presence of aromatic compounds were used as a control. (5-Oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid was in a mixture with 3-phenyl 1-2-pyrone-6-carboxylic acid (1:0.01). There are no data available for the influence of 250 µg of this mixture ml⁻¹ on the growth of the yeast cells because of the limited amount of this mixture enriched by semipreparative HPLC.

rone-6-carboxylic acid (20 µg ml⁻¹) showed little or no effect on the growth rate of *S. cerevisiae*.

DISCUSSION

In this study, we extended previous studies on the transformation of biphenyl by *T. mucoides* SBUG 801 with special emphasis on novel ring cleavage products. Most fungi and mammals initially hydroxylate biphenyl into mono-, di-, and trihydroxylated intermediates. The same process was observed for *T. mucoides*. However, the kinetic data show that all 4-hydroxybiphenyl produced was transformed via 3,4-dihydroxybiphenyl to the main ring cleavage products 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid. A large variety of further ring cleavage products (Fig. 4) was produced from other *ortho*-di- and trihydroxylated biphenyls via *ortho*-ring fission, which is unique on this scale for eukaryotic organisms until now. Ring fission occurred as well as from substrates hydroxylated on one or both aromatic rings, leading to hydroxymuconic acids as well as the corresponding lactones. Previously, products with hydroxymuconic acid structure were also described for the transformation of dibenzofuran by *T. mucoides* (16) and diphenyl ether by *Trametes versicolor* (17) as well as for the metabolism of phloroglucinol by *Fusarium solani* (36). Trihydroxylated biphenyls with all hydroxy groups on one aromatic ring were supposed to be the preliminary stage for the lactones produced. Although these products were not detected, this assumption was confirmed by using them as a substrate. The possible *ortho*-fission of a trihydroxylated transformation product was first assumed in the metabolism of diphenyl ether by *Trichosporon domesticum* (formerly as *Trichosporon beigelii*), but such a product had not been detected as an intermediate (24).

The genus *Trichosporon* is known for its ability to cleave the ring systems of aromatic compounds. Thus, *T. mucoides* produced a hydroxymuconic acid derivative with dibenzofuran as a substrate (16) and incubation of *T. domesticum* SBUG 752 with diphenyl ether led to a lactone as the major product (24). Because of the fact that ring fission of compounds with two or more aromatic ring systems is not common in eukaryotic organisms, the toxicity of transformation products of biphenyl produced by the yeast *T. mucoides* was investigated. Only the ring fission products 4-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid and the mixture of (5-oxo-3-phenyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid and 3-phenyl-2-pyrone-6-carboxylic acid, obtained by semipreparative HPLC, hardly showed any effect on the growth of the yeast cells independent of the concentration used. In contrast, biphenyl as well as mono- and dihydroxylated transformation products inhibited the growth, with the response increasing when higher concentrations were tested.

The hydroxylation of hydrophobic aromatic compounds by eukaryotic organisms is very often linked to the formation of relatively toxic products, as described above. The formation of glucuronide conjugates (29) is generally considered a mechanism for detoxification and rapid excretion of transformation products of biphenyl and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in filamentous fungi and mammals. The filamentous fungus *Cunninghamella elegans* produces glucuronide conjugates during biphenyl metabolism (6) and glucoside conjugates during the transformation of PAHs (22), as does *Phanerochaete chrysosporium* (32). Mammals and fungi also produce glucuronide and sulfate conjugates (3, 12, 37). *Rhizoctonia solani* was even able to produce xylose conjugates with anthracene (33). The formation of xylose as well as glucose conjugates was also described for the transformation of triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether) by *T. versicolor*

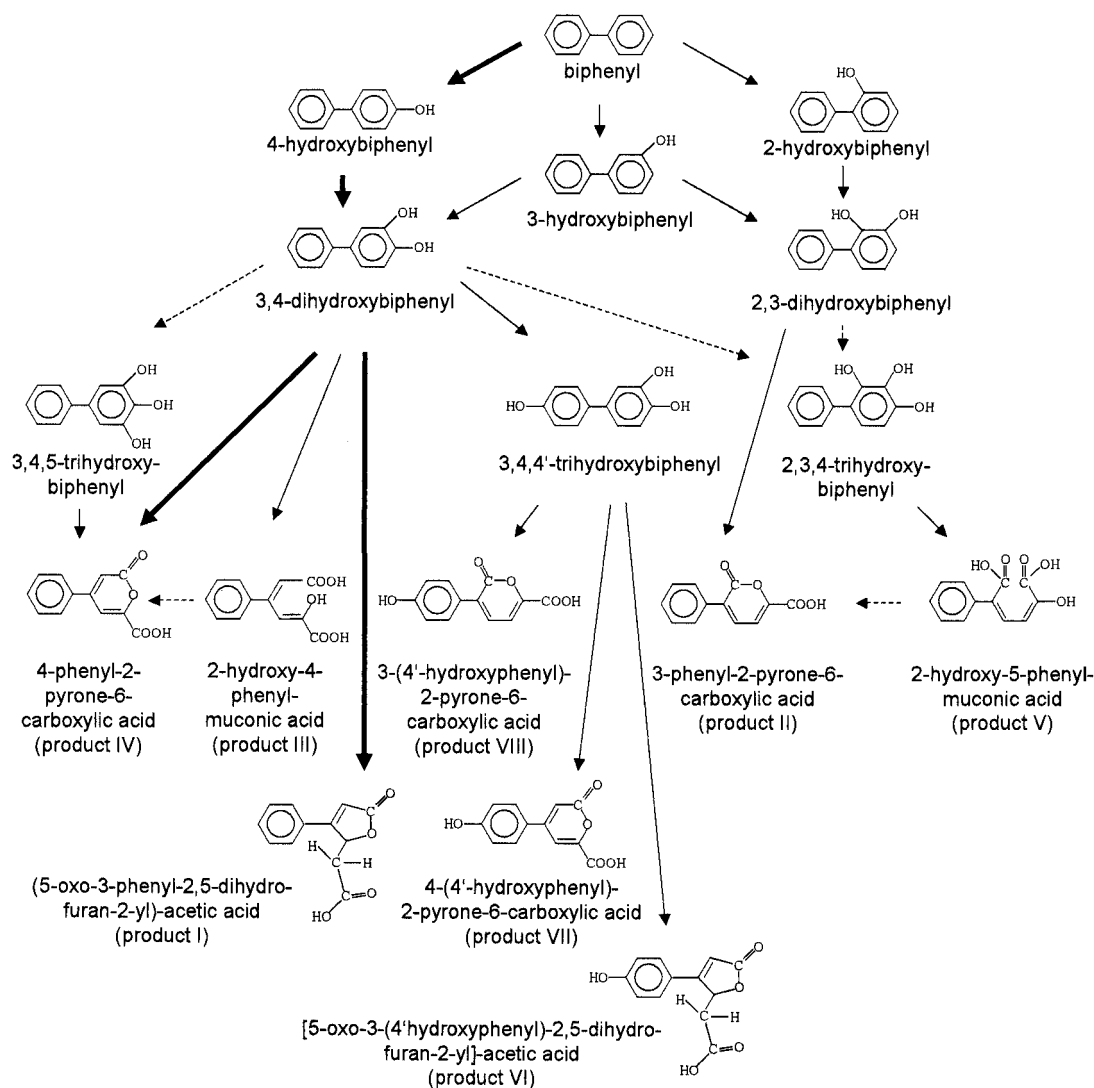


FIG. 4. Proposed pathway for the transformation of biphenyl by *T. mucoides* SBUG 801 via 2-, 3-, and 4-hydroxybiphenyl, resulting in ring cleavage products. Other oxidation products of biphenyl formed by this yeast strain (27) were not included in this scheme. →, Proved product formation; ---→, assumed product formation.

(18). In contrast, conjugates with hydroxylated intermediates were not found during biphenyl transformation by *T. mucoides*. A second possible reaction is a further transformation of these toxic hydroxylated derivatives via cleavage of one of the aromatic ring systems. In the case of the transformation of biphenyl by *T. mucoides*, the resulting ring fission products were considerably less toxic.

It seems that there is at least one more mechanism for the detoxification of foreign aromatic compounds with two or more aromatic ring systems in eukaryotic organisms. The inability to cleave the aromatic ring might be an explanation for the production of conjugates with the hydroxylated intermediates as a common mechanism of detoxification of those kinds of aromatic compounds by the organisms described above. *T. mucoides* did not produce conjugates but formed less-toxic ring fission products from hydroxylated biphenyls as an alternative detoxification mechanism. Nevertheless, only a few of all the different hydroxylated products seemed to be transformed by

such a mechanism which depends on the enzyme pattern and specificity of the organism.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Studienstiftung des deutschen Volkes.

We specially thank B. Shoulders (University of Texas at Austin) for carrying out extensive NMR analysis and helping with structure elucidation. M. Kindermann and S. Siegert (University of Greifswald) are acknowledged for recording NMR data, as is B. Schneider (Max-Planck-Institute of Jena) for carrying out high-resolution mass spectrometry. The help of A. Schäfer with the interpretation of NMR data is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Block, W. D., and H. H. Cornish. 1959. Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit. *J. Biol. Chem.* **234**:3301-3302.
2. Cerniglia, C. E., and S. A. Crow. 1981. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Arch. Microbiol.* **129**:9-13.
3. Cerniglia, C. E., J. P. Freeman, and R. K. Mitchum. 1982. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons.

- Appl. Environ. Microbiol. **43**:1070–1075.
4. Cox, J. C., and J. H. Golbeck. 1985. Hydroxylation of biphenyl by *Aspergillus parasiticus*: Approaches to yield improvement in fermenter cultures. Biotechnol. Bioeng. **27**:1395–1402.
 5. De Boer, T. D., and H. J. Backer. 1956. Diazomethane. Org. Synth. **36**:14–16.
 6. Dodge, R. H., C. E. Cerniglia, and D. T. Gibson. 1979. Fungal metabolism of biphenyl. Biochem. J. **178**:223–230.
 7. Eckert, J. W. 1977. Control of postharvest diseases, p. 269–352. In M. R. Siegel and H. D. Sisler (ed.), Antifungal compounds, vol. 1. Discovery, development, and uses. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
 8. Fry, J. R. 1981. A comparison of biphenyl 4-hydroxylation and 4-methoxy-biphenyl o-demethylation in rat liver microsomes. Biochem. Pharmacol. **30**: 1915–1919.
 9. Gaal, A., and H. Y. Neujahr. 1979. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. J. Bacteriol. **137**:13–21.
 10. Gaal, A., and H. Y. Neujahr. 1980. *cis,cis*-Muconate cyclase from *Trichosporon cutaneum*. Biochem. J. **191**:37–43.
 11. Gesell, M., E. Hammer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 2001. Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1551–1557.
 12. Golbeck, J. H., S. A. Albaugh, and R. Radmer. 1983. Metabolism of biphenyl by *Aspergillus toxicarius*: induction of hydroxylating activity and accumulation of water-soluble conjugates. J. Bacteriol. **156**:49–57.
 13. Golbeck, J. H., and J. C. Cox. 1984. The hydroxylation of biphenyl by *Aspergillus toxicarius*: conditions for a bench scale fermentation process. Biotechnol. Bioeng. **26**:434–441.
 14. Gosselin, R. E., R. P. Smith, and H. D. Hodge. 1984. Clinical toxicology of commercial products 5th ed, p. II–152. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
 15. Häkkinen, I., E. Siltanen, S. Hernberg, A. M. Seppäläinen, P. Karli, and E. Vakkula. 1973. Diphenyl poisoning in fruit paper production. Arch. Environ. Health **26**:70–74.
 16. Hammer, E., D. Krowas, A. Schäfer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 1998. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2215–2219.
 17. Hundt, K., U. Jonas, E. Hammer, and F. Schauer. 1999. Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. Biodegradation **10**:279–286.
 18. Hundt, K., D. Martin, E. Hammer, U. Jonas, M. K. Kindermann, and F. Schauer. 2000. Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl. Environ. Microbiol. **66**:4157–4160.
 19. Lange, J., E. Hammer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 1998. Biodegradation of biphenyl by the ascomycetous yeast *Debaryomyces vanrijae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:364–368.
 20. Meyer, T., and R. R. Scheline. 1976. The metabolism of biphenyl. II. Phenolic metabolites in the rat. Acta Pharmacol. Toxicol. **39**:419–432.
 21. Mobley, D. P., H. L. Finkbeiner, S. H. Lockwood, and J. Spivack. 1993. Synthesis of 3-arylmuconolactones using biphenyl metabolism in *Aspergillus*. Tetrahedron **49**:3273–3280.
 22. Pothuluri, J. V., J. P. Freeman, F. E. Evans, and C. E. Cerniglia. 1990. Fungal transformation of fluoranthene. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2974–2983.
 23. Sandmeyer, E. E. 1981–1982. Aromatic hydrocarbons, p. 3253–3258. In G. D. Clayton and F. E. Clayton (ed.), Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, vol. 2A. Toxicology. John Wiley Sons, New York, N.Y.
 24. Schauer, F., K. Henning, H. Pscheidl, R. M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes, V. Sinnwell, and W. Francke. 1995. Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporon beigeli* SBUG 752. Biodegradation **6**:173–180.
 25. Schwartz, R. D., A. L. Williams, and D. B. Hutchinson. 1980. Microbial production of 4,4'-dihydroxybiphenyl: biphenyl hydroxylation by fungi. Appl. Environ. Microbiol. **39**:702–708.
 26. Schwartz, R. D. 1981. A novel reaction: *meta* hydroxylation of biphenyl by an actinomycete. Enzyme Microb. Technol. **3**:158–159.
 27. Sietmann, R., E. Hammer, J. Moody, C. E. Cerniglia, and F. Schauer. 2000. Hydroxylation of biphenyl by the yeast *Trichosporon mucoides*. Arch. Microbiol. **174**:353–361.
 28. Singer-Bohne, B., M. Hofeneder, and H. P. Koch. 1993. Der Hefetest: Eine Ergänzungsmethode zur Bestimmung der akuten Toxizität von Arzneistoffen und Umweltgiften. BIOforum **16**:244–248.
 29. Smith, R. L., and R. T. Williams. 1966. Implications of the conjugation of drugs and other exogenous compounds, p. 457–491. In G. J. Dutton (ed.), Glucuronic acid: free and combined. Academic Press, London, United Kingdom.
 30. Smith, R. V., and J. P. Rosazza. 1974. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. **161**:551–558.
 31. Smith, R. V., P. J. Davis, A. M. Clark, and S. Glover-Milton. 1980. Hydroxylations of biphenyl by fungi. J. Appl. Bacteriol. **49**:65–73.
 32. Sutherland, J. B., A. L. Selby, J. P. Freeman, F. E. Evans, and C. E. Cerniglia. 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3310–3316.
 33. Sutherland, J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. J. Ind. Microbiol. **9**:53–62.
 34. Thomas, D. R., K. S. Carswell, and G. Georgiou. 1992. Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Bioeng. **40**:1395–1402.
 35. van der Walt, J. P. 1970. Criteria and methods used in classification, p. 34–113. In J. Lodder (ed.), The yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
 36. Walker, J. R. L., and B. G. Taylor. 1983. Metabolism of phloroglucinol by *Fusarium solani*. Arch. Microbiol. **134**:123–126.
 37. Wiebkin, P., J. R. Fry, C. A. Jones, R. Lowing, and J. W. Bridges. 1976. The metabolism of biphenyl by isolated viable rat hepatocytes. Xenobiotica **6**:725–743.

5.4 Dibenzofuran-Abbau durch *Trichosporon mucoides*

Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products

Elke Hammer, Dirk Krowas, Annett Schäfer, Michael Specht, Wittko Francke, Frieder Schauer

Appl. Environ. Microbiol. **1998**, 64(6), 2215–2219

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau des Dibenzofurans mit der Hefe *Trichosporon mucoides* konnte erstmals für Pilze eine Metabolisierung von Dibenzofurans unter Spaltung einer aromatischen Bindung und Ringöffnung beschrieben werden.

In den Inkubationen von *Trichosporon mucoides* mit Dibenzofuran wurden im Verlauf der Metabolisierung sechs wasserlösliche Substanzen gefunden. Nur ein Metabolit akkumulierte im gesamten Verlauf des Experimentes. Vier der Metabolite wurden anhand ihrer Massenspektren als die isomeren Hydroxydibenzofurane erkannt und mittels verfügbarer Referenzsubstanzen eindeutig zugeordnet. 3-Hydroxydibenzofuran wurde hierfür aus 3-Aminodibenzofuran durch Diazotierung und wässrige Aufarbeitung dargestellt. Die größte Konzentration erreichte 2-Hydroxydibenzofuran.

Bei Einsatz von 2- bzw. 3-Hydroxydibenzofuran als Substrat entstanden ebenfalls die zwei weiterführenden Metabolite, einhergehend mit einem erhöhten Umsatz. Um ausreichende Mengen für hochauflösende GC/MS- und NMR-Untersuchungen zu erhalten, wurden weitere Umsätze mit 2-Hydroxydibenzofuran als Substrat durchgeführt. Extraktionen bei pH = 7 und pH = 2 brachten eine Trennung der Metabolite. Nach Reinigung durch HPLC wurden die Extrakte GC/MS- und NMR-Untersuchungen unterzogen. Das Massenspektrum des aus neutraler Lösung extrahierten Metaboliten zeigt ein Molekülion von m/z 200. Nach Methylierung findet man m/z 228, was zwei freie Hydroxylgruppen anzeigt. Anhand der GC/MS-Daten wurde eine Dihydroxydibenzofuran-Struktur favorisiert. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten bestätigen diese Annahme und führten zur Identifizierung von 2,3-Dihydroxydibenzofuran.

Der aus saurer Lösung extrahierte Metabolit konnte nach Methylierung gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht werden. Hochaufgelöste Massenspektren erbrachten für das Molekölion $m/z = 290$ eine Zusammensetzung von $C_{15}H_{14}O_6$. Prominente Fragmente ergaben sich mit $m/z = 259$ ($C_{14}H_{14}O_5$, Verlust CO), 231 (100%, $C_{13}H_{11}O_4$, Verlust $COOCH_3$) und 216 ($C_{12}H_8O_4$, Verlust $COOCH_3$, CH_3). Abbildung 5.10 zeigt das Massenspektrum dieser Substanz.

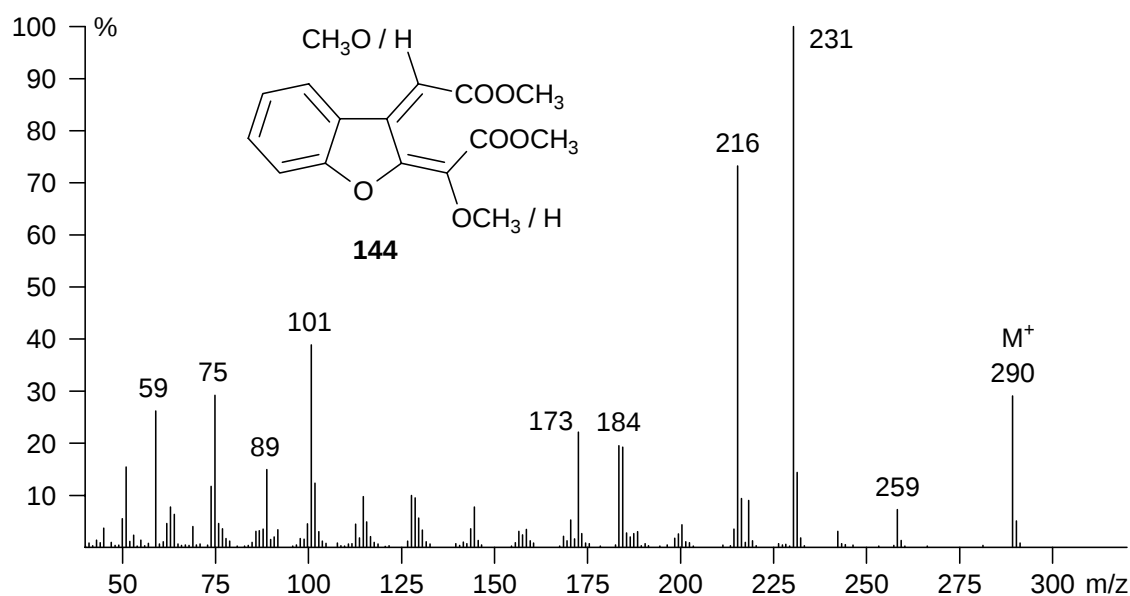


Abb. 5.10 Massenspektrum von [2-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-3(2H)-yliden]glycolsäure bzw. [3-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-2(3H)-yliden]glycolsäure **144**, dreifach methyliert

Die NMR-Untersuchungen (1H -, ^{13}C -) des unmethylierten Metaboliten zeigten die Anwesenheit von 12 Kohlenstoffatomen und 5 nicht austauschbare Protonen. Die ermittelten 1H - 1H -Kopplungen ergaben das Vorhandensein eines ortho-substituierten aromatischen Rings und eines isolierten Protons hoher Verschiebung (Abbildung 5.11). Aus den ermittelten GC/MS- und NMR-Daten wurde für die Substanz die Struktur **144(a,b)** vorgeschlagen (Abbildung 5.12). Die Ergebnisse weiterer NMR-Experimente (DEPT, HMQC, HMBC, NOESY) unterstützen diese Struktur. Aufgrund fehlender Kopplungen des isolierten Protons konnte die Lage der Hydroxyl-Gruppe nicht eindeutig bestimmt werden. Somit wurde dieser Substanz die Struktur von [2-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-3(2H)-yliden]glycolsäure **144a** oder [3-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-2(3H)-yliden]glycolsäure **144b** zugeordnet.

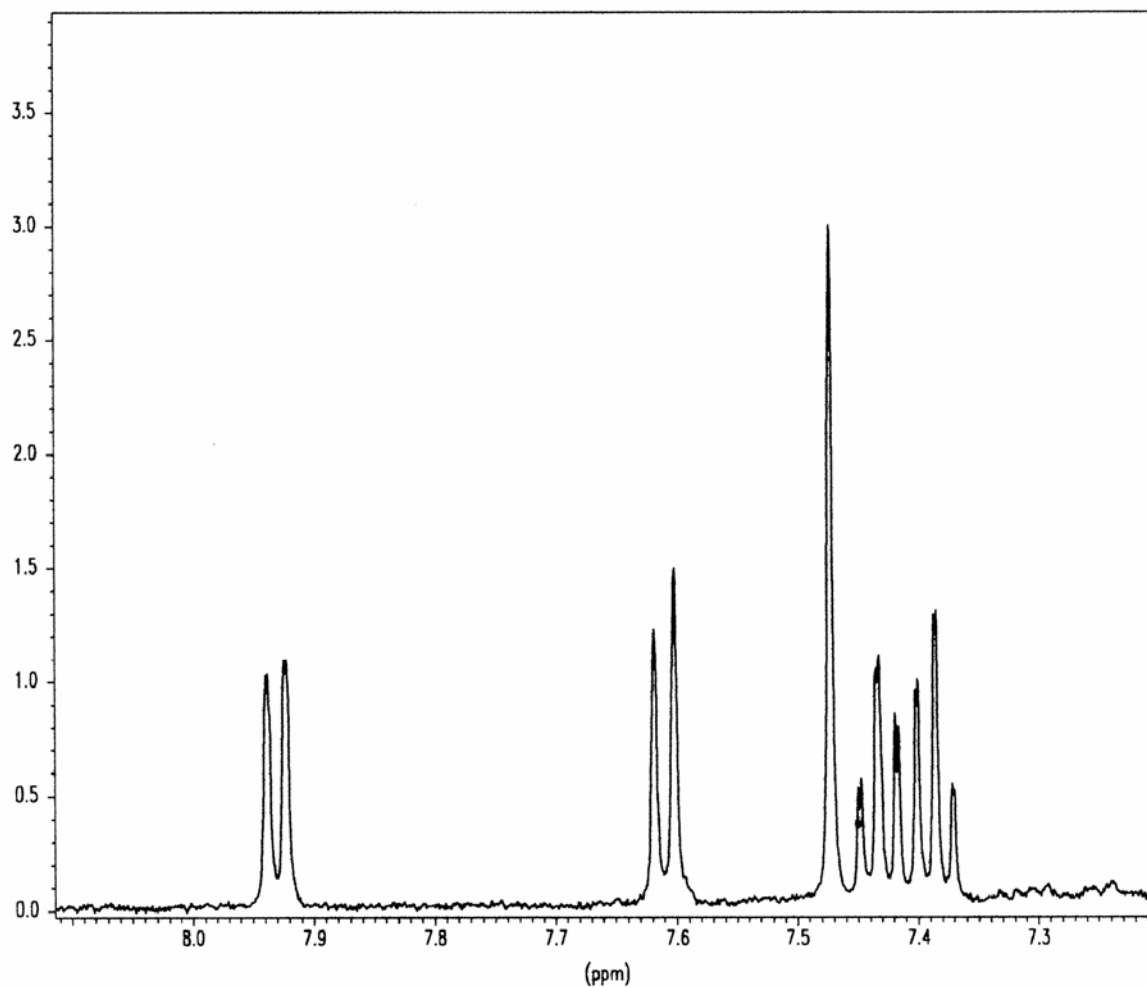


Abb. 5.11 ^1H -NMR (500 MHz, Methanol) von [2-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-3(2H)-yliden]glycolsäure bzw. [3-(Carboxymethylen)-1-benzofuran-2(3H)-yliden]glycolsäure **144**

Der Abbau des Dibenzofurans durch *Trichosporon mucoides* erfolgt über sequentielle dreifache Hydroxylierung via 2,3-Dihydroxybenzofuran unter Spaltung eines aromatischen Ringes zu Metabolit **144**. Eine weitergehende Transformation wird nicht beobachtet.

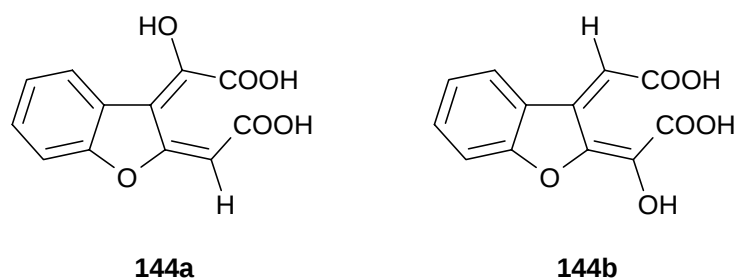


Abb. 5.12 Metabolit des Abbaus Dibenzofurans mit *Trichosporon mucoides*

Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products

ELKE HAMMER,^{1,*} DIRK KROWAS,¹ ANNETT SCHÄFER,¹ MICHAEL SPECHT,²
WITTKO FRANCKE,² AND FRIEDER SCHAUER¹

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, D-17489 Greifswald,¹ and Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, D-20146 Hamburg,² Federal Republic of Germany

Received 17 November 1997/Accepted 9 April 1998

We characterized the ability of a yeast to cleave the aromatic structure of the dioxin-like compound dibenzofuran. The yeast strain was isolated from a dioxin-contaminated soil sample and identified as *Trichosporon mucoides*. During incubation of glucose-pregrown cells with dibenzofuran, six major metabolites were detected by high-performance liquid chromatography. The formation of four different monohydroxylated dibenzofurans was proven by comparison of analytical data (gas chromatography-mass spectrometry) with that for authentic standards. Further oxidation produced 2,3-dihydroxydibenzofuran and its ring cleavage product 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[*b*]furanlydene glycolic acid, which were characterized by mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. These two metabolites are derived from 2-hydroxydibenzofuran and 3-hydroxydibenzofuran, as shown by incubation experiments using these monohydroxylated dibenzofurans as substrates.

Although many efforts have been made to reduce the emission of polychlorinated dibenzofurans and dioxins during combustion of dust or bleaching of pulp in paper mills, these compounds remain widespread environmental contaminants. This problem has given rise to an intensive search for microorganisms capable of metabolizing cyclic biaryl ether structures in order to evaluate their degradation potential in nature. Recently, some bacterial strains able to cometabolize (4, 13) or to grow with dibenzofuran (7, 16, 20) have been isolated and the mechanisms of oxygenation and ring cleavage have been described in detail (23). Degradation of halogenated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by aerobic bacteria has so far been shown only for derivatives with up to two chlorine substituents (24). The mineralization potential for higher chlorinated compounds might be rather low. The biodegradation capacity of aerobic microorganisms could be important in the destruction of nonhalogenated or slightly halogenated intermediates arising from anaerobic dehalogenation of dibenzofurans, e.g., in sediments (1) or soils.

Although fungi constitute the majority of microbial biomass in soil, data on fungal catabolism of biaryl ether compounds are limited and restricted to hydroxylation processes (4, 11). Our objectives were (i) to identify fungal strains that could degrade dibenzofuran and (ii) to determine the pathway and the chemical intermediates through which the breakdown occurs.

MATERIALS AND METHODS

Isolation procedure. We isolated yeast strains from a dioxin-contaminated soil sample from a copper works under selective conditions in a mineral salts medium (MM) (14) containing, per liter, 5 g of NH₄H₂PO₄, 2.5 g of KH₂PO₄, 1 g of MgSO₄ · 7H₂O, 2 mg of FeCl₃ · 6H₂O, 20 mg of Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, and 10 ml of a trace element solution (containing, per liter, 50 mg of H₃BO₃, 40 mg of MgSO₄ · 4H₂O, 40 mg of ZnSO₄ · 7H₂O, 20 mg of Na₂MoO₄, 10 mg of CuSO₄ · 5H₂O, 10 mg of CoCl₂, 10 mg of potassium iodide). Soil (2 g) was suspended in

100 ml of MM and supplemented with dibenzofuran (1 g/liter) as the sole source of carbon and chloramphenicol (30 µg/liter) to inhibit bacterial growth. After 7 days of shaking cultures at 30°C and 180 rpm, 10 ml was transferred to 90 ml of fresh medium and incubated under the same conditions. Identical transfers were performed 7 and 14 days later. Afterwards, microorganisms were obtained by plating 0.1 ml of the cultures on malt agar plates. Pure cultures were maintained on malt agar and stored at 4°C.

Yeast strains were characterized for their potential to degrade dibenzofuran by incubating glucose (1%) grown cells in MM with dibenzofuran (500 µg/ml) for 7 days. Degradation product formation was determined by analyzing the culture supernatant by high-performance liquid chromatography (HPLC). All experiments described below were carried out with strain SBUG 801, which accumulated the largest quantity of metabolites in the culture medium.

Identification and characterization of strain SBUG 801. The yeast used was assigned to the genus *Trichosporon* by the urea hydrolysis test, sugar utilization (IC32; Biomerieux, Nürtingen, Germany), and morphology. Further identification to the species level using physiological characteristics, coenzyme Q type, and the D2 domain of 26S rRNA sequences was performed by the method of Gueho et al. (9, 10). Strain SBUG 801 has been deposited as strain DSM 12017 in the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany.

Growth and incubation conditions. Cells were grown in 500-ml shake flasks with 100 ml of MM supplemented with 1 or 2% glucose and 1 ml of a vitamin solution (21). After incubation for 16 h at 30°C and 180 rpm on a rotary shaker, cells were harvested by centrifugation (3,100 × *g*, 5 min) and washed twice with sterile MM. The cell pellet was resuspended in MM to an optical density (600 nm) of 6. Dibenzofuran and 2- or 3-hydroxydibenzofuran were added in suitable concentrations of about 10 to 500 µg/ml (see Results) to the cell suspensions, and the cultures were incubated as described above. Cells in MM without substrate and dibenzofuran derivatives in MM without cells were used as controls.

Kinetics of dibenzofuran degradation and isolation of metabolites. Cultures were incubated in 100-ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of the cell suspension in MM and 160 µg of dibenzofuran per ml at 30°C with agitation at 180 rpm. Flasks with autoclaved cells and dibenzofuran were used as additional controls. At each sampling period, cultures were removed and stored at –20°C. At the end of the experiment all samples and controls were thawed and extracted with 4 ml of trichloromethane for 5 min. The organic layer was separated from the aqueous phase by centrifugation in glass tubes (3,100 × *g*, 5 min). The contents of dibenzofuran and metabolites were estimated by gas-chromatographic analysis of 1 µl of the trichloromethane phase and HPLC analysis of 100 µl of the aqueous supernatant. The data are reported as means for two separate experiments with replicated batch cultures. Standard deviation was no more than 8%.

Additional cultures (500-ml flasks with 100 ml of the cell suspension and 50 to 250 µg of dibenzofuran or 2-hydroxydibenzofuran per ml) were incubated to enrich the yield of intermediates. Metabolites were extracted from the centrifuged culture supernatant twice with ethyl acetate at pH 7 and once again after acidification of the aqueous residue to pH 2. The organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate, and the solvent was removed. The residues obtained were dissolved in methanol.

Chemical analysis and identification of metabolites. Gas chromatography was carried out on a Shimadzu model GC-14A gas chromatograph with a flame

* Corresponding author. Mailing address: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, F.-L.-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, Germany. Phone: 49-3834-864211. Fax: 49-3834-864202. E-mail: hammer@microbio1.biologie.uni-greifswald.de.

ionization detector at 310°C equipped with a PermaBond SE-54-DF-0.35 capillary column (50 m by 0.25 mm [inside diameter]; Macherey-Nagel, Düren, Germany). Helium was used as the carrier gas (180 kPa). The column temperature was programmed from 150 to 300°C at 10°C/min.

HPLC was performed on a Hewlett-Packard (Bad Homburg, Germany) HPLC apparatus 1050 M equipped with a quaternary pump system, a diode array detector 1040 M series I, and an HP Chemstation. The separation was achieved with a LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5- μ m) column (Merck, Darmstadt, Germany). The initial solvent composition was 30% methanol–70% phosphoric acid (0.1%), reaching 100% methanol after 14 min at a flow rate of 1 ml/min.

Metabolites were purified by semipreparative HPLC on a LiChrospher RP-18 end-capped column (16 by 250 mm, 10 μ m; Knauer, Berlin, Germany) by using methanol–1% acetic acid (80:20 [vol/vol]) for neutral extracts and 50:50 [vol/vol] for acidic extracts) as the mobile phase at a flow rate of 9 ml/min.

The UV-visible absorption spectra of degradation products were determined in a diode array detector.

Gas chromatography-mass spectrometry was carried out on a gas chromatograph GC 8000 linked to a mass selective detector MD 800 (Fisons Instruments, Mainz, Germany) operating at 70 eV, fitted with a 60-m DB5-ms column (0.25-mm by 0.33- μ m film; J & W Scientific, Folsom, Calif.). Acid-extractable compounds were derivatized before analysis by methylation with diazomethane as described by De Boer and Backer (5) in a microapparatus (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany). High-resolution mass spectra were recorded on a Vacuum Generators (Manchester, United Kingdom) analytical instrument, model 70-250 SE.

The ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker (Karlsruhe, Germany) WM 300 instrument at 300 MHz or on a DRX500 instrument at 500 MHz in CD_3OD (99.99%).

Chemicals. Dibenzofuran and 2-hydroxydibenzofuran were purchased from Aldrich-Chemie. 3-Hydroxydibenzofuran was synthesized from 3-aminodibenzofuran by the method of Wilkes (22). All chemicals and solvents were of the highest purity available.

RESULTS

From enrichment cultures with dibenzofuran various yeast strains were isolated, but none could grow with the biaryl compound as the sole source of carbon. Screening of the yeasts obtained for their potential to metabolize dibenzofuran following growth on glucose identified a strain that produced a broad pattern of degradation products when the culture supernatant was analyzed by HPLC.

Taxonomic characterization of the dibenzofuran-metabolizing yeast. Microscopic observation showed formation of arthroconidia. This finding together with the results of the carbon utilization spectrum (IC32) and the hydrolysis of urea led us to classify the organism as a yeast belonging to the genus *Trichosporon*. This genus can be separated into two groups, one consisting of 15 species containing coenzyme Q-9 ubiquinone systems, and the other consisting of four species containing coenzyme Q-10 ubiquinone systems (10). Since this isolate had coenzyme Q-10, subsequent studies were confined to *Trichosporon mucoides*, *T. moniliforme*, *T. cutaneum*, and *T. jirovecii*. The physiological features of the isolate pointed to *T. mucoides*: assimilation of specific carbon sources (galactitol, glucono- δ -lactone, L-arabinitol, melibiose, and erythritol), no growth with nitrate or creatine, and growth at 37°C. However, all four species have very similar carbon and nitrogen compound assimilation patterns (2, 10). For final identification, we sequenced the taxonomically most informative 26S rRNA region from strain SBUG 801 and compared the data obtained with data for the type strains of the four species obtained by Gueho et al. (10). The sequence of strain SBUG 801 was the same as that of the CBS 7625 type culture of *T. mucoides*.

Metabolism of dibenzofuran. Glucose-grown cells of *T. mucoides* SBUG 801 metabolized dibenzofuran very rapidly. More than 50% of the substrate added was degraded within 8 h (Fig. 1) at a degradation rate of about 15 μg of dibenzofuran $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$. After that time the degradation of the biaryl compound dropped drastically. The kinetics seem to be time dependent, because a similar decrease in the degradation rate occurred after 8 to 10 h when the initial dibenzofuran concen-

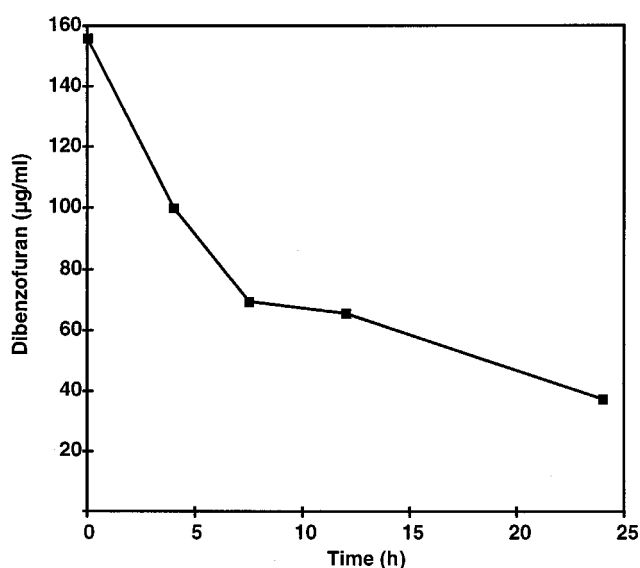


FIG. 1. Degradation of dibenzofuran (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$) by *T. mucoides* SBUG 801.

trations were 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nonsignificant change in the dibenzofuran concentration was observed in heat-killed cultures.

Detection and identification of intermediates. Dibenzofuran degradation was accompanied by the formation of at least six water-soluble intermediates. The major metabolites (designated I to VI) had retention times of 10 to 12 min (I to IV), 9.3 min (V), and 7.6 min (VI). The HPLC peak at 13.8 min was dibenzofuran (Fig. 2). Metabolites I to V accumulated over a period of about 10 h and seemed to be metabolized during subsequent incubation. The concentration of metabolite VI increased continuously (Fig. 3). Metabolites were characterized by their UV-visible spectra during detection with a diode

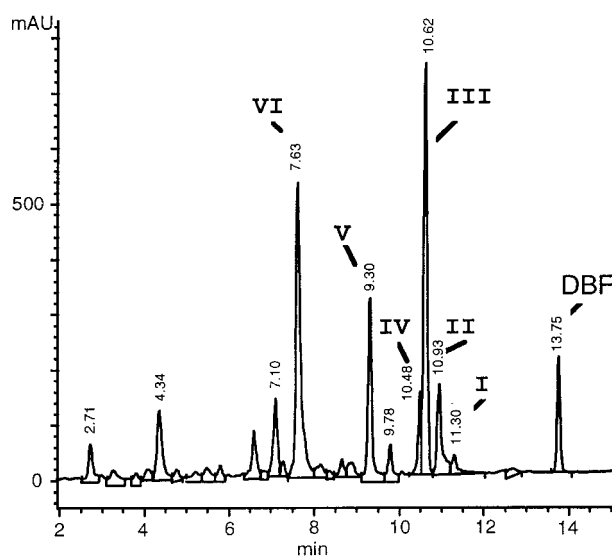


FIG. 2. HPLC elution profile of an aqueous culture supernatant after incubation of *T. mucoides* SBUG 801 with dibenzofuran (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 h. At least six dibenzofuran (DBF) degradation products (I to VI) were detectable after separation on a reversed-phase column. AU, absorbance units.

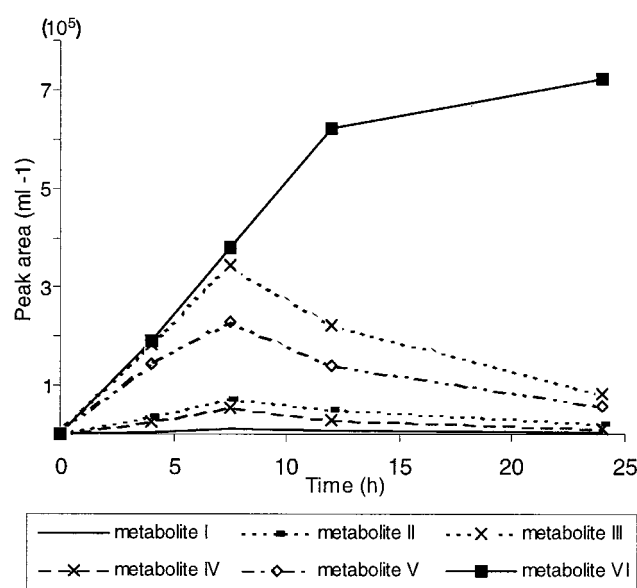


FIG. 3. Product accumulation and decomposition during incubation of glucose-grown cells of *T. mucoides* SBUG 801 with dibenzofuran (160 $\mu\text{g/ml}$). Amounts of intermediates were calculated from their absorbance at 220 nm.

array detector. None of these substances accumulated in the control flasks.

Monohydroxylated compounds. Compounds I to IV were identified as the four isomers of monohydroxylated dibenzofurans by comparing UV and mass spectra with those of available standards (2- and 3-hydroxydibenzofuran), with data from the literature (1-hydroxydibenzofuran [4]), or with our own data (4-hydroxydibenzofuran [11]). 2-Hydroxydibenzofuran was always the most common isomer (maximum concentration, approximately 20 $\mu\text{g/ml}$). In contrast, 3- and 4-hydroxydibenzofuran were detected at about 2 to 5 $\mu\text{g/ml}$, and 1-hydroxydibenzofuran was detected in much smaller quantities (no more than 0.5 $\mu\text{g/ml}$).

Metabolites V and VI. Metabolites V and VI were rapidly released into the medium. Compound V reached its maximum concentration (6 $\mu\text{g/ml}$) at about 8 h, while compound VI accumulated throughout the entire incubation up to 35 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3). Incubation experiments with glucose-grown cells of *T. mucoides* SBUG 801 with 125 μg of 2-hydroxydibenzofuran or 3-hydroxydibenzofuran per ml as the substrate also resulted in the accumulation of metabolites V and VI in the culture fluid. Thus, 2- and 3-hydroxydibenzofuran were formed as intermediates during dibenzofuran degradation.

After incubation of the yeast strain with 2-hydroxydibenzo-

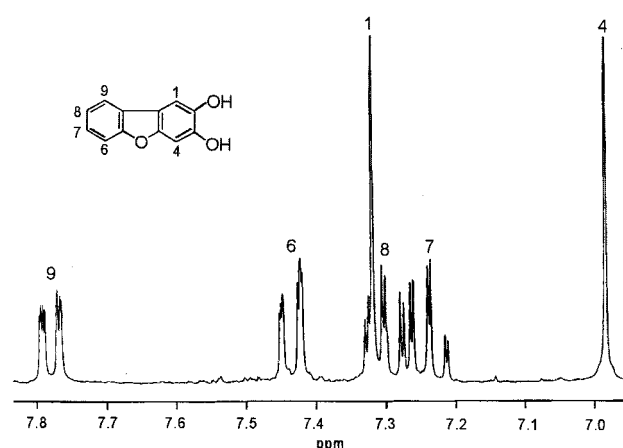


FIG. 4. ^1H NMR spectrum of metabolite V, 2,3-dihydroxydibenzofuran (300 Mhz; CD_3OD). Trimethylsilane was the internal standard.

furan (125 $\mu\text{g/ml}$) for 30 h, about 90% of the substrate had been transformed to metabolite VI, while a high level (18 $\mu\text{g/ml}$) of metabolite V was achieved with higher amounts of 2-hydroxydibenzofuran (250 $\mu\text{g/ml}$ and more). Therefore, all further incubations concerning enrichment and preparation of these compounds were carried out with 2-hydroxydibenzofuran as the substrate.

Metabolite V was extractable with ethyl acetate at a pH of 7 and yielded a light brown powder after purification by semi-preparative HPLC. The UV absorption spectrum showed absorption maxima at 247, 298, and 313 nm. The mass spectrum revealed a molecular weight of m/z 200. The molecular ion of the methyl derivative was observed at m/z 228, suggesting the presence of two hydroxyl groups in the molecule. The molecular weight of the metabolite, the gas-chromatographic behavior of the methyl derivative, and the mass spectrum all were consistent with metabolite V being a dihydroxylated dibenzofuran. ^1H NMR and ^{13}C NMR showed the presence of six protons and 12 carbons in the aromatic area. Apart from the signals of a nonsubstituted ring (two doublets, two triplets), two singlets were observed by ^1H NMR (Fig. 4). Because of the spin-spin coupling of isolated *meta* protons, the singlets in metabolite V must be in the *para* position, proving this intermediate to be 2,3-hydroxydibenzofuran.

Extraction of culture supernatants at pH 2 and evaporation of the solvent resulted in residues highly enriched in metabolite VI. Because of the acid character of this intermediate, it was assumed to be a ring cleavage product. After purification by preparative HPLC, the compound was obtained as a yellow powder showing UV absorption maxima at 242 and 329 nm

TABLE 1. Characterization of substrates and intermediates of dibenzofuran degradation by *T. mucoides* SBUG 801

Compound	Metabolite	UV absorption maxima (nm) ^a	Characteristic mass ions (m/z)
DBF ^b		249, 279, 294(s)	168 [M^+], 139 [M]-CHO
1-Hydroxy-DBF	I	224, 256, 268, 274, 298, 306	184 [M^+], 155 [M]-CHO, 128 [M]-COC ₂ H ₄
2-Hydroxy-DBF	III	251, 289, 317(s)	184 [M^+], 155 [M]-CHO, 128 [M]-COC ₂ H ₄
3-Hydroxy-DBF	II	213, 231, 253, 297	184 [M^+], 155 [M]-CHO, 128 [M]-COC ₂ H ₄
4-Hydroxy-DBF	IV	224(s), 255, 279, 295/305(s)	184 [M^+], 155 [M]-CHO, 128 [M]-COC ₂ H ₄
2,3-Dihydroxy-DBF	V	216, 247, 298, 313	200 [M^+], 171 [M]-CHO, 126 [M]-CH ₂ O-CH ₂ O-CH ₂
Ring cleavage product	VI	242, 329	290 [M^+], 259 [M]-OCH ₃ , 231 [M]-COOCH ₃ , 216 [M]-COOCH ₃ -CH ₃ ^c

^a s, shoulder.

^b DBF, dibenzofuran.

^c Methyl derivative.

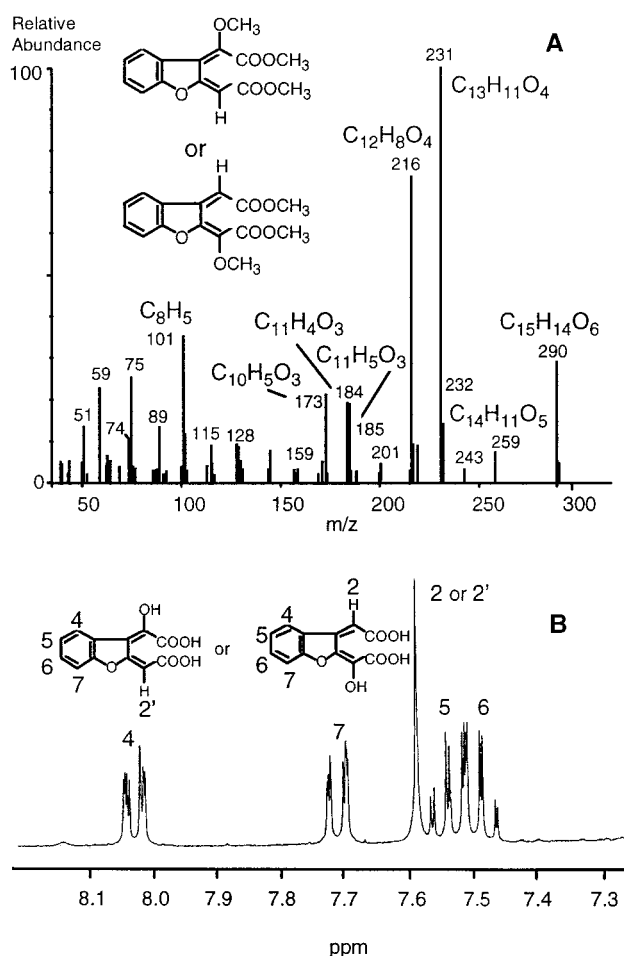


FIG. 5. Mass spectrum of the methyl derivative (A) and ^1H NMR spectrum of metabolite VI, 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanylidene glycolic acid, a ring cleavage product formed during incubation of *T. mucoides* SBUG 801 with dibenzofuran (B).

(Table 1). Gas chromatography-mass spectrometry was successful only after methylation. High-resolution mass spectrometry showed the molecular formula of the methylated compound to be $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$. The base peak at m/z 231 was assigned to $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4$, resulting in the loss of COOCH_3 from the molecular ion. Fragments at m/z 259 ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_5$) and m/z 216 ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$) were interpreted as loss of OCH_3 and $\text{CH}_3\text{-COOCH}_3$ (Fig. 5A). ^1H NMR and ^{13}C NMR of the unmethylated substance showed five protons and 12 carbon atoms. Similar to the spectrum of metabolite V, the ^1H NMR spectrum of metabolite VI showed the proton signals of an unsubstituted aromatic ring. In addition, only one singlet was obtained, representing one isolated proton (Fig. 5B). ^{13}C -distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) 90 NMR data (five signals) indicated seven quaternary carbons and only one aliphatic methine proton. Because of the molecular weight of 290 and the presence of carboxyl groups, the compound was assumed to be a ring cleavage product showing a hydroxylated muconic acid as a partial structure. All NMR signals presented in Table 2 and additional NMR studies (500 MHz) involving long-range coupling experiments like heteronuclear multiple bond correlation and nuclear Overhauser enhancement spectroscopy were consistent with the structure of 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanylidene

TABLE 2. ^1H NMR data for 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanylidene glycolic acid (metabolite VI) recorded at 300 MHz

Proton assignment	δ (ppm)	3J (Hz)	4J (Hz)
H4, dd	8.03	7.3 (4, 5)	1.7 (4, 6)
H5, m	7.48	7.4 (5, 6)	1.3 (5, 7)
H6, m	7.53	7.8 (6, 7)	
H7, dd	7.71		
H2', s	7.59		

glycolic acid. Since coupling between the hydrogen of the hydroxyl group and hydrogen atoms on the aromatic-ring system could not be detected, it was impossible to unambiguously identify the location of the hydroxyl group to either of the side chains.

During incubation of glucose-grown cells of *T. mucoides* SBUG 801 with low amounts of 2,3-dihydroxydibenzofuran, metabolite VI was detected.

DISCUSSION

We investigated the ability of a yeast to biodegrade dibenzofuran, a model compound for intermediates arising from highly persistent environmental pollution with biaryl ether structures. These structures may be nonhalogenated and slightly halogenated compounds which result from anaerobic or chemical dehalogenation processes. Screening of soil samples for suitable organisms revealed a strain identified as *T. mucoides* which had been isolated only from human tissue previously. This strain was able to grow with aromatic compounds like phenol or benzoic acid and transformed dibenzofuran as well. The degradation of monocyclic aromatic compounds is common in yeasts (12, 15), and phenol degradation by *T. cutaneum* has been investigated in detail (8, 17). However, information on the ability of yeasts to cleave the aromatic ring in biaryl or polycyclic compounds is still lacking.

We suggest that *T. mucoides* SBUG 801 degrades dibenzofuran via 2,3-hydroxydibenzofuran (metabolite V) since ring cleavage of this intermediate leads to the formation of 2-(1-carboxy methylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]furanylidene glycolic acid (metabolite VI [Fig. 6]). The accumulation of high levels of monohydroxylated dibenzofurans and the formation of the dihydroxylated derivative from both 2-hydroxydibenzofuran and 3-hydroxydibenzofuran indicated the action of monooxygenases during the first degradation steps. Hydroxylation of biaryl compounds by monooxygenases in fungi has been frequently described (3, 4, 6, 11, 19); however oxidation of the resulting hydroxylated derivatives has not been well documented. The only previous report of this activity in yeasts showed that diphenyl ether could be transformed via hydroxylated derivatives to a lactone by *Trichosporon* sp. strain SBUG 752 (18).

Monohydroxylated and dihydroxylated dibenzofuran derivatives were metabolized very rapidly by cells of *T. mucoides* SBUG 801, leading to the formation of a derivative of hydroxymuconic acid with a benzofuran substructure. Cleavage of the dihydroxylated ring presumably utilizes a mechanism similar to that described for the degradation of diphenyl ether by *Trichosporon* sp. strain SBUG 752 (18). In both species a third hydroxyl group must be introduced into dihydroxylated intermediates before *ortho* cleavage of the aromatic structure can take place. In contrast to *T. mucoides* (coenzyme Q-10), strain SBUG 752 belongs to the group of coenzyme Q-9-containing *Trichosporon* species.

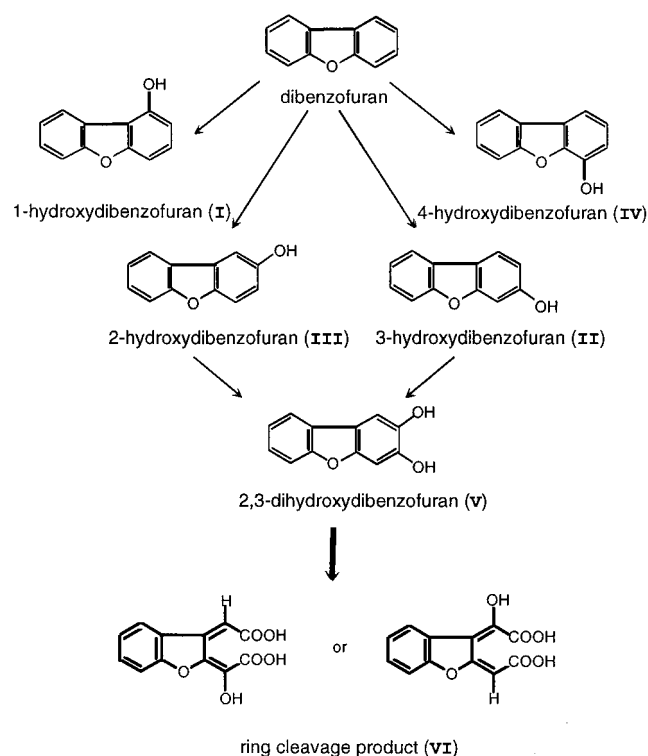


FIG. 6. Proposed pathway for the first steps of dibenzofuran degradation by *T. mucoides* SBUG 801.

This is the first report of a fungus capable of cleaving the aromatic structure of dibenzofuran. The results together with those for strain SBUG 752 show that *Trichosporon* strains not only degrade monoaromatic compounds but also can degrade biaryl ether substrates. Further studies, particularly with chlorinated dibenzofurans, will be required to determine if these yeasts can effectively degrade halogenated environmental pollutants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants 0319519 A0 and 1460638 R9 from the Bundesministerium für Bildung und Forschung.

We thank R. Kunze for help with obtaining and interpreting the rDNA/rRNA sequence data and M. Kindermann and S. Siegert for recording NMR data.

REFERENCES

1. Ballerstedt, H., A. Kraus, and U. Lechner. 1997. Reductive dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and its products by anaerobic mixed cultures from Saale river sediment. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1749–1753.
2. Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 1983. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
3. Cerniglia, C. E., R. L. Hebert, P. J. Szanislo, and D. T. Gibson. 1978. Fungal transformation of naphthalene. *Arch. Microbiol.* **117**:135–143.
4. Cerniglia, C. E., J. C. Morgan, and D. T. Gibson. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. *Biochem. J.* **180**:175–185.
5. De Boer, T. D., and H. J. Backer. 1956. Diazomethane, p. 14–16. In N. J. Leonard (ed.), *Organic synthesis*, vol. 36. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
6. Dodge, R. H., C. E. Cerniglia, and D. T. Gibson. 1979. Fungal metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* **178**:223–230.
7. Fortnagel, P., H. Harms, R.-M. Wittich, W. Francke, S. Krohn, and H. Meyer. 1989. Cleavage of dibenzofuran and dibenzo-*p*-dioxin ring systems by a *Pseudomonas* bacterium. *Naturwissenschaften* **76**:222–223.
8. Gaal, A., and H. Y. Neujahr. 1979. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.* **137**:13–21.
9. Gucho, E., C. P. Kurtzman, and S. W. Peterson. 1989. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**:230–236.
10. Gucho, E., M. T. Smith, G. S. de Hoog, G. Billon-Grand, R. Christen, and W. H. Batenburg-van der Vegte. 1992. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Leeuwenhoek* **61**:289–316.
11. Hammer, E., and F. Schauer. 1997. Fungal hydroxylation of dibenzofuran. *Mycol. Res.* **101**:433–436.
12. Hofmann, K. H., and F. Schauer. 1988. Utilization of phenol by hydrocarbon assimilating yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* **54**:179–188.
13. Klecka, G. M., and D. T. Gibson. 1980. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin and chlorinated dibenzo-*p*-dioxins by *Beijerinckia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:228–236.
14. Kreisel, H., and F. Schauer. 1987. *Methoden des mykologischen Laboratoriums*, p. 38. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
15. Middelhoven, W. J. 1993. Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. *Antonie Leeuwenhoek* **63**:125–144.
16. Monna, L., T. Omori, and T. Kodama. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auricularis* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:285–289.
17. Neujahr, H. Y., and A. Gaal. 1973. Phenolhydroxylase from yeast: purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* **35**:386–400.
18. Schauer, F., K. Henning, H. Pscheidt, R. M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes, V. Sinnwell, and W. Francke. 1995. Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporon beigelii* SBUG 752. *Biodegradation* **6**:173–180.
19. Smith, R. V., P. J. Davis, A. M. Clark, and S. Glover-Milton. 1980. Hydroxylations of biphenyl by fungi. *J. Appl. Bacteriol.* **49**:65–73.
20. Strubel, V., H. G. Rast, W. Fietz, H.-J. Knackmuss, and K.-H. Engesser. 1989. Enrichment of dibenzofuran utilizing bacteria with high co-metabolic potential toward dibenzodioxin and other anellated aromatics. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:233–238.
21. van der Walt, J. P. 1970. Criteria and methods used in classification, p. 34–113. In J. Lodder (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
22. Wilkes, H. 1993. *Untersuchungen zur Aufklärung von Stoffwechselwegen beim mikrobiellen Abbau von Diarylethern*. Ph.D. thesis. University of Hamburg, Germany.
23. Wilkes, H., W. Francke, H. Harms, S. Schmidt, and P. Fortnagel. 1992. Mechanistic investigations on microbial degradation of diaryl ethers. *Naturwissenschaften* **79**:269–271.
24. Wilkes, H., R. M. Wittich, K. N. Timmis, P. Fortnagel, and W. Francke. 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:367–371.

Nachdruck der Publikation

Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products

Elke Hammer, Dirk Krowas, Annett Schäfer, Michael Specht, Wittko Francke, Frieder Schauer

Appl. Environ. Microbiol. **1998**, 64(6), 2215–2219

mit Genehmigung der American Society for Microbiology.

5.5 Cometabolischer Dibenzofuran-Abbau durch *Ralstonia* sp.

Cometabolic Degradation of Dibenzofuran by Biphenyl-Cultivated *Ralstonia* sp. Strain SBUG 290

Dörte Becher, Michael Specht, Elke Hammer, Wittko Francke, Frieder Schauer
Appl. Environ. Microbiol. **2000**, 66(10), 4528–4531

Untersuchungen des bakteriellen Abbaus von Dibenzofuran zeigen fast ausschließlich eine Ringspaltung in direkter Nachbarschaft zur Etherbrücke (4, 4a) Dibenzofurans. Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass *Ralstonia* sp. (strain SBUG 290) in der Lage ist Dibenzofuran mittels meta-Spaltung (Spaltung der C-C-Brücke (1 - 9b) zwischen den Phenylringen) zu metabolisieren.

Der Bakterienstamm SBUG 290 wurde aus kompostierter Erde gewonnen und auf Nährböden mit 4-Chlorbiphenyl als Substrat gezüchtet. Für die Untersuchungen des cometabolischen Abbaus von Dibenzofuran wurde das Bakterium zunächst mit Biphenyl als Substrat vermehrt und Dibenzofuran als Feststoff zugesetzt. Die Verfolgung des Abbaus durch HPLC erbrachte neben dem Auftreten der 4 isomeren Hydroxydibenzofurane drei weiterführende Metaboliten. Extraktion dieser Metabolite erfolgte bei verschiedenen pH-Werten. Zwei Metabolite erwiesen sich bezüglich der angewandten Extraktionsversuche als instabil und konnten nicht isoliert werden.

Der aus saurer Lösung extrahierte Metabolit wurde nach Aufreinigung MS, GC/MS- und NMR-Untersuchungen unterzogen. Das durch Direkteinlass erhaltene Massenspektrum zeigte ein Molekülion bei $m/z = 232$, entsprechend einer möglichen Summenformel $C_{12}H_8O_5$. Signifikante Fragmentierungen deuteten auf einen Verlust von $COOH$ ($m/z = 187$) und weiteren Verlust zweier CO -Einheiten ($m/z = 159$ bzw. 131) hin. Nach Methylierung erbrachte die hochauflösende GC/MS-Analyse eine Summenformel von $C_{14}H_{12}O_5$, einer zweifachen Methylierung entsprechend. Ebenso konnte der Metabolit zweifach silyliert werden (Abbildung 5.13).

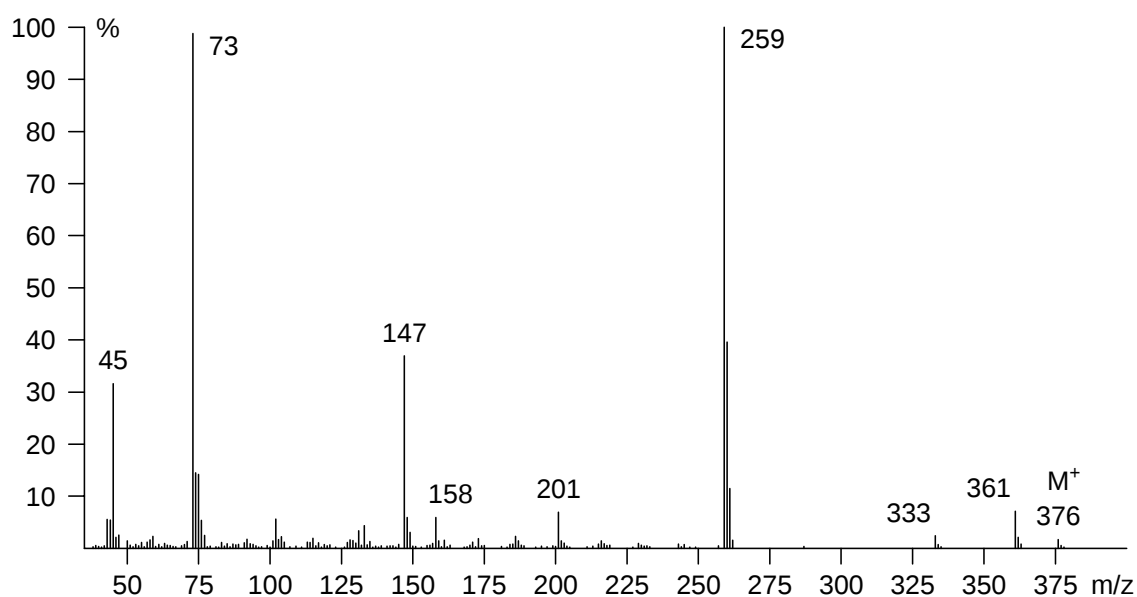
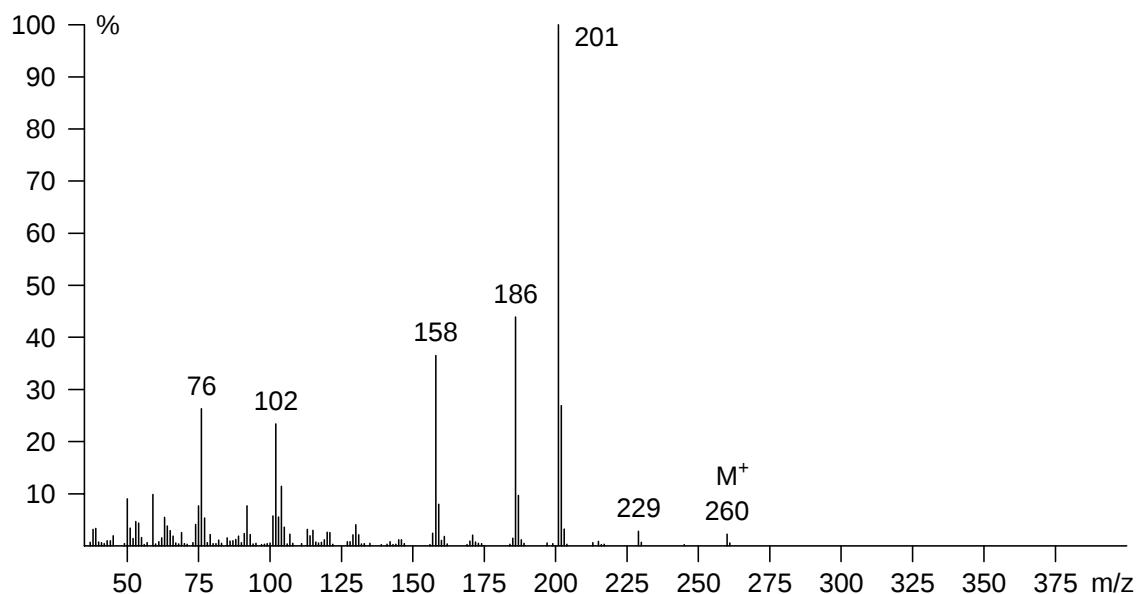


Abb. 5.13 Massenspektren des methylierten (oben) und silylierten (unten) Metaboliten aus Dibenzofuran Abbau mit *Ralstonia sp.*

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte neben den aromatischen Protonen nur zwei weitere diffuse Signale von Methylen-Protonen, ungeeignet für die zur Strukturzuordnung nötigen 2D-NMR-Experimente. Die Methylierung des Extrakts lieferte nicht die benötigten Mengen, da sich der Metabolit während der Derivatisierung zersetzte. Eine geeignete Probe konnte durch sequentielle Silylierung kleinster Mengen der Verbindung mit Hilfe von BSTFA:TMCS (99:1) und Vereinigung der Produkte erhalten werden.

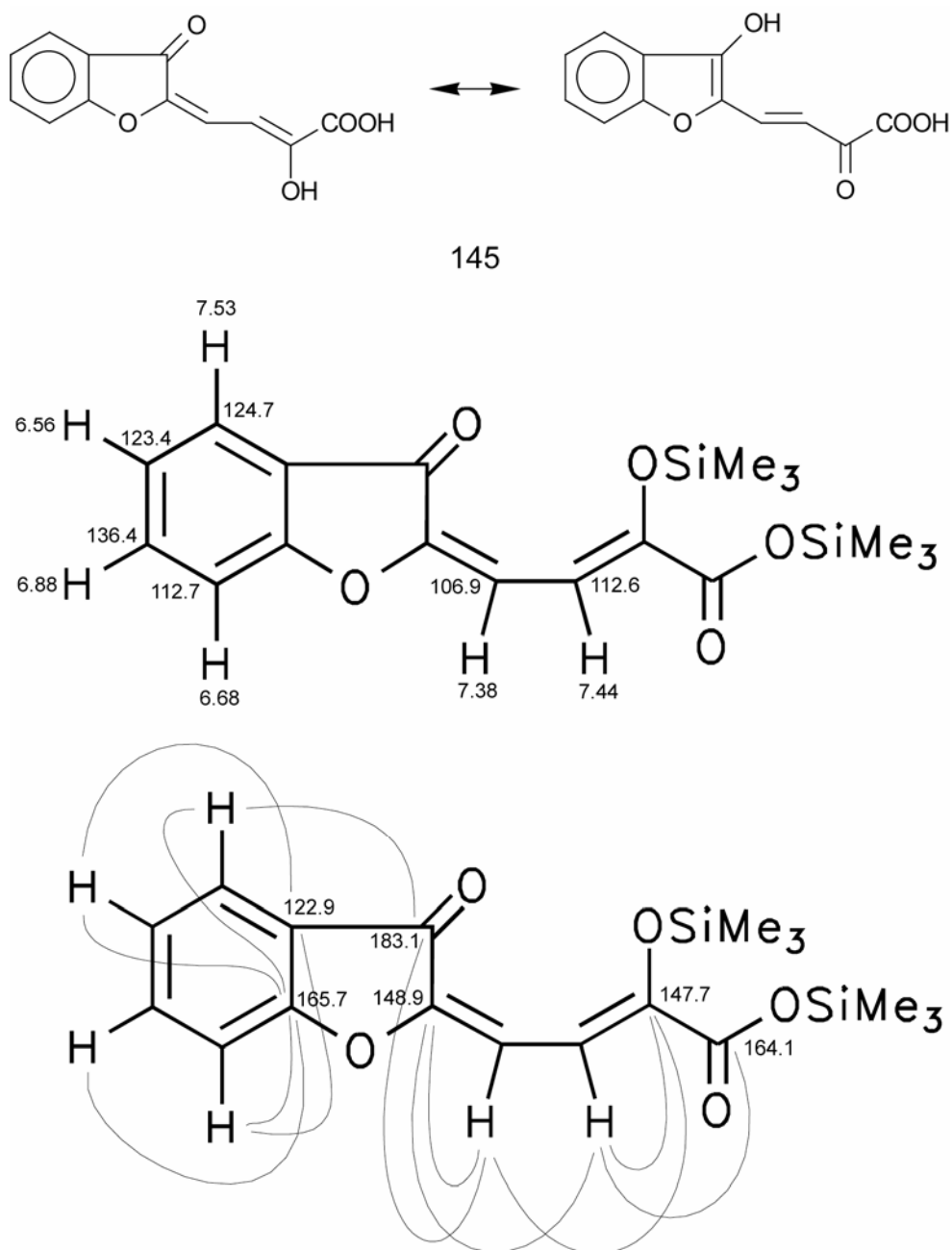


Abb. 5.14 NMR-Signalzuordnung und Kopplungen von 2-Hydroxy-4-(3'-oxy-3'H-benzofuran-2'-yliden)-2-butensäure **145**, zweifach silyliert

Die durch zweidimensionale NMR-Experimente (HMBC, HMQC, NOESY) erhaltenen Zuordnungen und Kopplungen entsprechen der Struktur 2-Hydroxy-4-(3'-oxy-3'H-benzofuran-2'-yliden)-2-butensäure **145** (Abbildung 5.14).

Die Bildung dieses Metaboliten zeigt eine meta-Spaltung des intermediär entstehenden 1,2-Dihydroxydibenzofurans. Zur Überprüfung dieses initialen Schritts wurde 1,2-Dihydroxydibenzofuran **150** aus 2,4-Di-*tert*-butylphenol **146** synthetisiert (siehe Abbildung 5.15) [133].

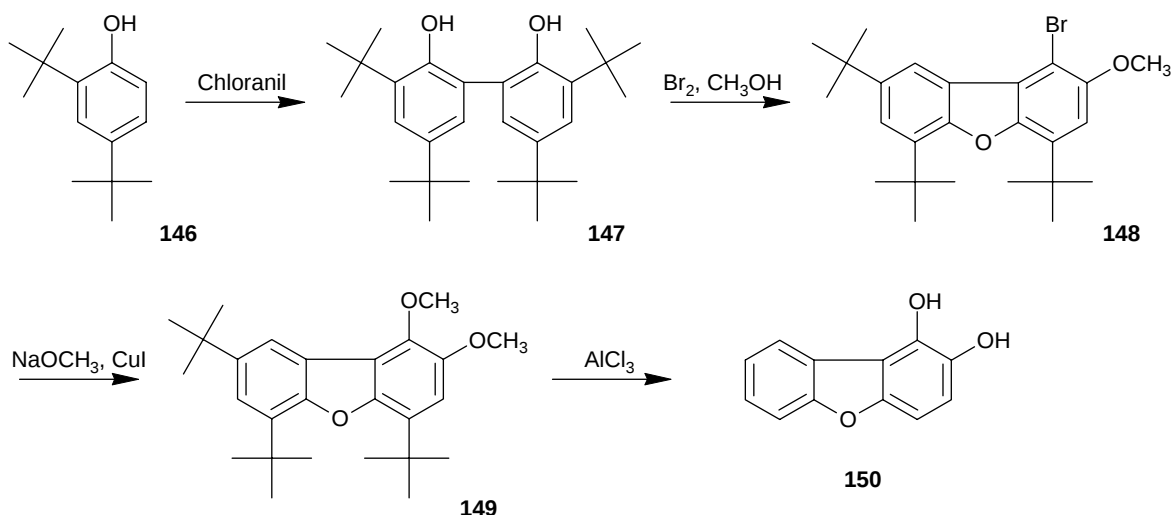


Abb. 5.15 Synthese von 1,2-Dihydroxydibenzofuran **150**

Um die synthetisch nur schwer zugängliche *ortho*-Substitution der Hydroxygruppen in Position 1 und 2 zu erreichen, wurde ein Syntheseweg über den vorübergehenden Schutz von Positionen des aromatischen Ringes durch *tert*-Butylgruppen gewählt. Hierzu wurde zunächst 2,4-Di-*tert*-butylphenol **146** mit Hilfe von Chloranil dimerisiert. Die Bromierung des Kupplungsproduktes **147** in Methanol erbrachte Ringschluss unter Verlust einer *tert*-Butylgruppe und gleichzeitiger Einführung einer Methoxygruppe (**148**). Brom addiert dabei zunächst in *para*-Position zur Hydroxygruppe unter Ausbildung einer chinoiden Struktur. Nach Substitution des Broms durch Methanol erfolgt Ringschluss unter Eliminierung der verbliebenen Hydroxygruppe und einer *tert*-Butylgruppe (siehe Abb. 5.16). Durch den Bromüberschuss wird das intermediär entstehende *tert*-Butyl-substituierte Dibenzofuran nun in 1-Stellung bromiert. Nach Methyletherbildung (**149**) aus dem Arylhalogenid **148** durch Williamson-Synthese und Etherspaltung mit Aluminiumchlorid erhält man das Produkt **150**.

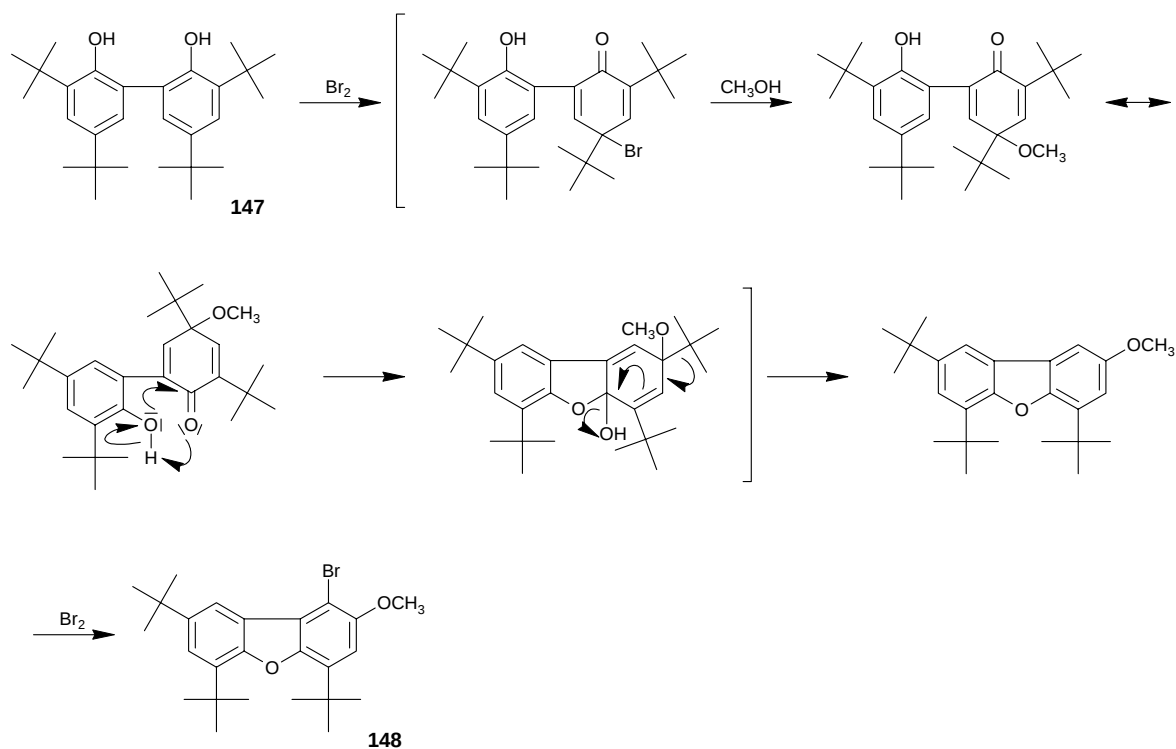


Abb. 5.16 Mechanismus der Bildung von **148** aus **147** unter Ringschluss

Einsatz des 1,2-Dihydroxydibenzofurans als Substrat führte zu **145**. *Ralstonia sp.* ist in der Lage 1,2-Dihydroxydibenzofuran ohne vorheriges Wachstum mit Biphenyl zu metabolisieren. Die durch meta-Spaltung des Dibenzofurans entstehende 2-Hydroxy-4-(3'-oxy-3'H-benzofuran-2'-ylyden)-2-butensäure **145** wird durch *Ralstonia sp.* weiter vollständig mineralisiert.

Nachdruck der Publikation

Cometabolic Degradation of Dibenzofuran by Biphenyl-Cultivated *Ralstonia sp.* Strain SBUG 290

Dörte Becher, Michael Specht, Elke Hammer, Wittko Francke, Frieder Schauer

Appl. Environ. Microbiol. **2000**, 66(10), 4528–4531

mit Genehmigung der American Society for Microbiology.

Cometabolic Degradation of Dibenzofuran by Biphenyl-Cultivated *Ralstonia* sp. Strain SBUG 290†

DÖRTE BECHER,^{1*} MICHAEL SPECHT,² ELKE HAMMER,¹ WITTKO FRANCKE,²
AND FRIEDER SCHAUER¹

*Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, D-17487 Greifswald,¹
and Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, D-20146 Hamburg,² Germany*

Received 18 February 2000/Accepted 13 July 2000

Cells of the gram-negative bacterium *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 grown in the presence of biphenyl are able to cooxidize dibenzofuran which has been 1,2-hydroxylated. Meta cleavage of the 1,2-dihydroxydibenzofuran between carbon atoms 1 and 9b produced 2-hydroxy-4-(3'-oxo-3'-H-benzofuran-2'-yliden)but-2-enoic acid, which was degraded completely via salicylic acid. The presence of these intermediates indicates a degradation mechanism for dibenzofuran via lateral dioxygenation by *Ralstonia* sp. strain SBUG 290.

The search for microorganisms able to grow with dibenzofuran, a model compound for highly toxic environmental pollutants like polychlorinated dibenzofurans, as a sole source of carbon and energy has led to the isolation of several bacterial strains belonging to the genera *Sphingomonas*, *Brevibacterium* (*Terrabacter*), and *Staphylococcus* (4, 6, 7, 12, 16, 20). Degradation of dibenzofuran starts with an oxygenolytic attack at the angular position 4 and 4a adjacent to the ether bridge, resulting in the formation of 2,2',3-trihydroxybiphenyl. This intermediate, in turn, is transformed by meta cleavage to a 2-hydroxyphenyl hexadienoic acid derivative and salicylic acid (18). There are also reports of cometabolic activities and unspecific cooxidation of dibenzofuran derivatives by biphenyl- or naphthalene-degrading bacteria. Aromatic ring fission of such hydroxylated compounds was assumed (2, 5) but was demonstrated in only one case (17).

This paper describes the formation and identification of a ring fission product and further metabolites during cometabolic degradation of dibenzofuran by the biphenyl-utilizing bacterium *Ralstonia* sp. strain SBUG 290, which indicate an alternative degradation pathway.

The bacterial strain SBUG 290 was isolated from compost soil by enrichment cultures with 4-chlorobiphenyl as a growth substrate. It was assigned to the genus *Ralstonia* on the basis of physiological data (9). Additionally, strain SBUG 290 was analyzed for 16S rRNA sequences by E. Stackebrandt and co-workers (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) and was suggested to be closely related to *Ralstonia eutropha*. However, DNA-DNA hybridization experiments demonstrated a similarity of only 34% with *Ralstonia eutropha* DSM 531^T. Therefore, this strain represents a new species of the genus *Ralstonia*. For incubations with dibenzofuran, cells were grown with biphenyl (10) up to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of about 2, harvested by centrifugation (30 min, 20,000 × g), washed with sodium phosphate buffer (0.067 M, pH 7.0), and resuspended in mineral salts medium to obtain an OD₆₀₀ of 5.0. The for-

mation of metabolites from dibenzofuran, added to the medium as solid matter (1.49 mM), was determined by analyzing the aqueous culture supernatant with high-performance liquid chromatography (HPLC) according to the method of Hammer et al. (8). For the determination of dibenzofuran consumption, whole cultures were removed and frozen at -20°C. At the end of the incubation, all flasks were thawed and shaken for 5 min with 2 ml of trichloromethane. One-microliter samples of the trichloromethane phase were directly analyzed by gas chromatography (GC) (8). Controls were carried out with heat-killed cells and with cells not exposed to dibenzofuran. The data are reported as mean values for two separate experiments with replicate batch cultures.

Metabolites were isolated from 500-ml flasks containing 100 ml of the biphenyl-grown cell suspension and 0.02% (1.2 mM) dibenzofuran by extraction of the centrifuged supernatant with ethyl acetate at pHs of 7 and 2 (8). The purification of metabolite I was carried out by washing the residue of the acidic extract several times with small amounts of methanol because the metabolite showed only limited solubility in solvents less polar than water. Before GC-mass spectrometry (GC-MS) analyses (8), the acid-extractable compounds were derivatized by methylation (3) in a microapparatus (Aldrich, Steinheim, Germany) or by silylation with *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and -trimethylchlorosilane (Silyl 991; Macherey-Nagel, Düren, Germany). Direct-insertion mass spectra were recorded on an HP5989A MS engine (Hewlett-Packard, Bad Homburg, Germany). The ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were carried out on a DRX 500 instrument (Bruker, Karlsruhe, Germany) in deuterated methanol or benzene solution. Dibenzofuran was purchased from Aldrich. 1,2-Dihydroxydibenzofuran was prepared according to the method of Tashiro et al. (18).

Ralstonia sp. strain SBUG 290 was able to use the aromatic compounds biphenyl and 4-chlorobiphenyl as well as salicylic acid, benzoic acid, and phenol for growth, whereas some conventional substrates, like glucose, were not metabolized. *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 growing in mineral salts medium consumed about 0.122 mmol of biphenyl liter⁻¹ h⁻¹, reaching an OD₆₀₀ of 3 within 48 h. Apart from small amounts of benzoic acid, no other metabolites accumulated. Dibenzofuran did not support growth but was metabolized rapidly by biphenyl-grown cells at a rate of up to 0.0029 mmol liter⁻¹ h⁻¹ (Fig. 1). No induction of dibenzofuran-oxidizing enzymes was observed with nonaromatic growth substrates, like nutrient broth.

* Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, F.-L.-Jahn-Str. 15, D-17487 Greifswald, Germany. Phone: 49-3834-864235. Fax: 49-3834-864202. E-mail: dbecher@biologie.uni-greifswald.de.

† Dedicated to Günter Grube and his contribution to science and technology.

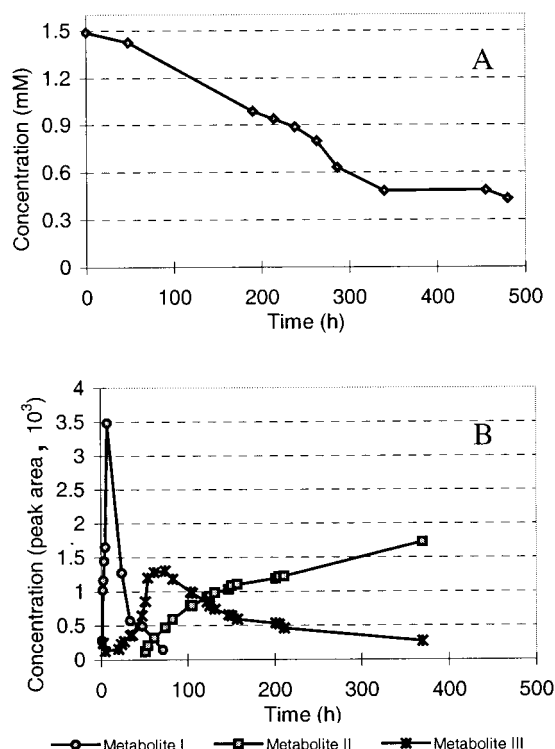


FIG. 1. Decrease of dibenzofuran concentration (A) and formation of the major metabolites, I, II, and III, (B) during incubation with biphenyl-grown cells of *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 ($OD_{600} = 5.0$). In control experiments with heat-killed cells, no decrease of substrate concentration in the culture medium occurred (data not shown).

The consumption of dibenzofuran was accompanied by a change of color in the medium to bright orange, a change in the absorption maximum of the culture fluid at 462 nm, and the formation of at least 11 metabolites detected by HPLC, with retention times (RT) of 4 to 12 min (dibenzofuran RT = 13.9 min). Metabolite I, with an RT of 8.7 min, accumulated first and at high concentrations (Fig. 1). At least 10% of the dibenzofuran added was excreted into the culture medium as metabolite I for a short period before being transformed completely. Within that time, two other major metabolites, named II and III (RT = 4.3 and 6.5 min, respectively), accumulated over an incubation period of more than 10 days. Furthermore, all four monohydroxylated dibenzofurans were found in the incubation medium. These other dibenzofurans were identified by HPLC and GC-MS and may possibly be formed from the initially produced *cis*-1,2- and *cis*-3,4-dihydrodiols, as described for the formation of 9-fluorenol from fluorene by Resnick and Gibson (15). Additionally, salicylic acid was identified by HPLC and GC-MS analyses of the ethyl acetate extract. After more than 30 days, none of these metabolites was detectable.

The kinetics of formation and the concentration of metabolite I correlated with the orange coloration of the medium, although no absorption maximum at 462 nm in the UV spectrum was observed under the HPLC conditions (pH 3) used. However, purified metabolite I dissolved in phosphate buffer showed a pH-dependent shift (pH 3→pH 7) in the absorption maximum from 400 to 462 nm. This shift indicates a keto-enol tautomerism of a meta-cleavage product, similar to that which is well known from the biphenyl meta-cleavage degradation pathway (1, 12).

The formation of yellow degradation products during co-

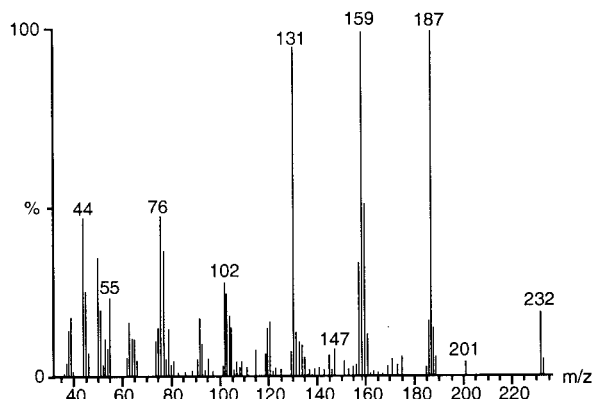


FIG. 2. Mass spectrum of purified dibenzofuran metabolite I. Diagnostic signals are present at m/z 232 (M^+), m/z 187 ($M^+ - COOH$), m/z 159 ($M^+ - COOH - CO$), m/z 131 ($M^+ - COOH - 2 CO$), and m/z 76 ($C_6H_4^+$).

metabolic degradation of dibenzofuran was described previously by Cerniglia et al. (2) for the naphthalene- and biphenyl-degrading *Beijerinckia* sp. strain B8/36. This strain oxidizes dibenzofuran to 2,3-dihydroxy-2,3-dihydrodibenzofuran and 1,2-dihydroxy-1,2-dihydrodibenzofuran, which are converted to 2,3-dihydroxydibenzofuran and 1,2-dihydroxydibenzofuran. Cometabolic ring fission was also assumed, based on the yellow coloration of the medium during dibenzofuran degradation by glucose-grown cells of *Pseudomonas* sp. strain HL7b, but neither a description of the mechanism nor the structure of the product was given (5).

For structural identification of metabolite I, a mass spectrum (Fig. 2) was recorded by direct insertion, because no signal was obtainable by GC-MS analysis. The mass spectrum revealed a molecular weight of 232, which is in accordance with the molecular formula of $C_{12}H_8O_5$. The fragmentation to m/z 187 ($M^+ - 45$) indicates the loss of a carboxyl group, and m/z 76 indicates the presence of an aromatic ring. After methylation of this compound, two derivatives were obtained with nearly identical mass spectra but different retention times (25.2 and 25.5 min) in GC-MS analysis. The investigation of the derivatives by high-resolution MS revealed a molecular weight of 260.06808 (260.06847 was calculated for the molecular formula of $C_{14}H_{12}O_5$). This finding indicates that in addition to the carboxyl group a hydroxyl group is present in the molecule. Preparative separation of these two derivatives was not possible.

The 1H NMR spectrum of the unmethylated metabolite I (Fig. 3) showed a very diffuse resonance of the methylene protons, indicating a labile molecule forming isomers and most likely showing keto-enol tautomerism. To suppress isomerization and to obtain interpretable NMR spectra, derivatization of the enol structure was performed. Methylation yielded a mixture not suitable for investigation but silylation was achieved without by-products. For exact structure elucidation, two-dimensional NMR experiments were carried out for the determination of 1H - 1H connectivity and direct as well as long-range 1H - ^{13}C connectivity of the silylated metabolite. On the basis of these experiments, all C and H atoms were unambiguously assigned due to chemical shifts, long-range couplings, and coupling constants (Table 1). Thus, the structure of metabolite I was determined to be 2-hydroxy-4-(3'-oxo-3'-H-benzofuran-2'-yliden)but-2-enoic acid (HOBB). To explore the origin of HOBB, the possible ring cleavage substrate 1,2-dihydroxydibenzofuran was added to biphenyl-grown cells. The

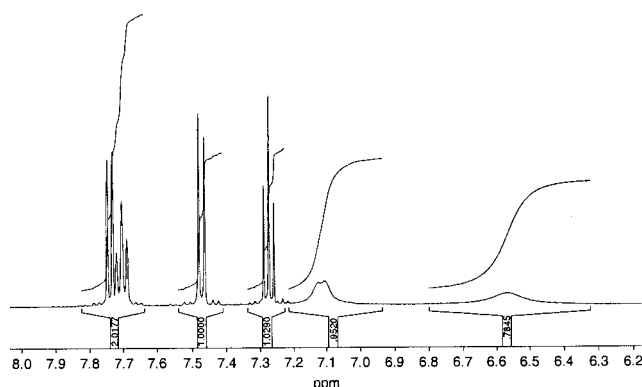


FIG. 3. ^1H NMR spectrum of metabolite I in CD_3OD with dimethyl sulfoxide as the internal standard. The two doublets ($\delta = 7.74$ and 7.47 ppm) and two triplets ($\delta = 7.27$ and 7.70 ppm) show the proton signals of the aromatic ring. The diffuse resonances at δ of 7.12 and 6.56 ppm belong to the methylene protons of the cleaved ring.

typical coloration of the culture supernatant was observed within 2 min and was accompanied by the formation of HOBB. In these incubation assays metabolites II and III were also observed. HOBB was degraded completely within 24 h, but no metabolite accumulation was detectable in the aqueous supernatant by HPLC. Because metabolites II and III (which were unstable during the purification procedure and therefore could not be further characterized) were not observed during degradation of HOBB, a second transformation pathway for dibenzofuran can be assumed. The formation of salicylic acid from both substrates was proven by GC-MS analysis of the organic extracts. Further investigations showed that *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 is able to cleave 1,2-dihydroxydibenzofuran to produce HOBB after growth on nutrient broth alone and does not require induction by biphenyl.

A similar attempt to characterize a yellow ring fission product formed from dibenzofuran during cooxidation was carried out by Selifonov et al. for naphthalene-grown *Pseudomonas* strains (17). Because of the instability of the pure ring cleavage product, the authors used the methylated compound for separation and structural characterization by GC-MS and NMR. The substance was shown to be the methyl ester of one of the two possible primary products formed upon meta cleavage of 1,2-dihydroxydibenzofuran between carbon atoms 1 and 9b (Fig. 4). By comparing the mass spectra of the methylated compounds produced, we deduced that the same ring cleavage

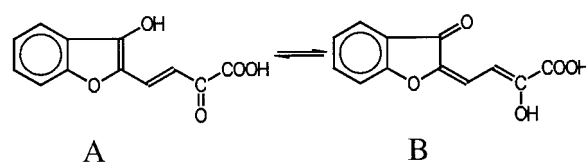


FIG. 4. Structures of the two possible primary products formed upon meta cleavage of 1,2-dihydroxydibenzofuran between carbon atoms 1 and 9b. (A) Structure of the methyl ester, proven by Selifonov et al. (17). (B) Metabolite I, HOBB.

mechanism is utilized by *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 and the *Pseudomonas* strains. In *Pseudomonas*, further degradation of the ring fission product was not observed because the hydrolase encoded by the *nahE* gene of the *nah* operon was not able to cleave pyruvate from this molecule (13). In contrast, *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 was able to degrade HOBB to salicylic acid. Considering that salicylic acid can be used as a growth substrate, it remains unclear why *Ralstonia* sp. strain SBUG 290 is not able to use dibenzofuran as a growth substrate. Cometabolic degradation of chlorinated dibenzofuran by biphenyl-utilizing *Burkholderia* (previously *Alcaligenes*) sp. strain JB1 was reported by Parsons et al. (14). The identification of 3-chloro-2',3,3'-trihydroxybiphenyl and 5-chlorosalicylic acid (13) shows that *Burkholderia* sp. strain JB1 degrades 2-chlorodibenzofuran by the same pathway as described for bacteria able to use dibenzofuran as the sole source of carbon and energy. Until now it was assumed that only bacteria using dibenzofuran as the sole source for carbon and energy are able to completely degrade dibenzofuran (21). Our work shows that a complete degradation of dibenzofuran via lateral dioxygenation and meta cleavage of the aromatic structure (Fig. 5) is also possible during cometabolic processes.

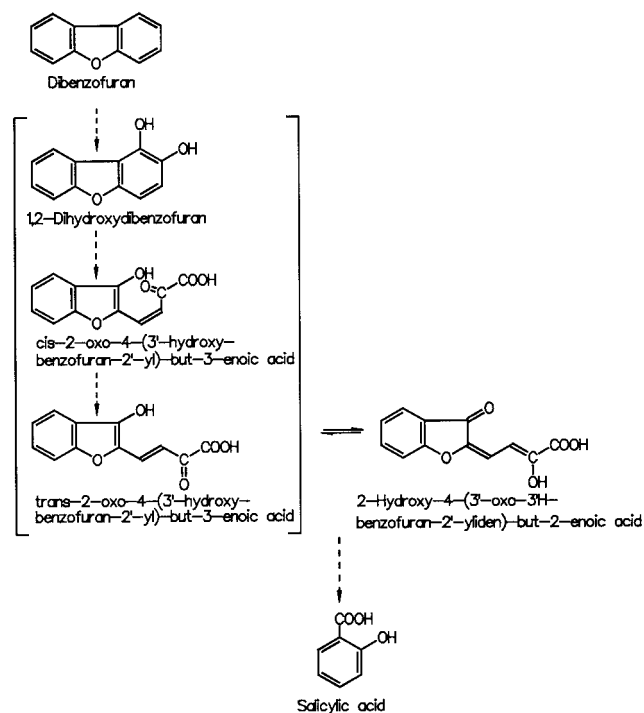


FIG. 5. Proposed pathway of dibenzofuran degradation by *Ralstonia* sp. strain SBUG 290.

TABLE 1. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) results with the silylated metabolite C_6D_6

δ (ppm)	Proton assignment	J (Hz)	δ (ppm)	Atom assignment
6.56	5'-H, dd	$^3J_{4',5'} = 7.3$; $^4J_{4',6'} = 8.5$	106.9	C-4
6.68	7'-H, d	$^3J_{6',7'} = 8.5$	112.6	C-3
6.88	6'-H, dd	$^3J_{6',7'} = 8.5$; $^4J_{4',6'} = 8.5$	112.7	C-7'
7.38	4-H, d	$^3J_{3,4} = 12.2$	122.9	C-3'a
7.44	3-H, d	$^3J_{3,4} = 12.2$	123.4	C-5'
7.53	4'-H, d	$^3J_{4',5'} = 7.3$	124.7	C-4'
			136.4	C-6'
			147.7	C-2
			148.9	C-2'
			164.1	C-1
			165.7	C-7'a
			183.1	C-3'

This study was supported by grant no. 1450638 R9 from the Bundesministerium für Forschung und Technologie and by the Grube-Land-und Umwelttechnik GmbH, Brake, Germany.

We thank R. Thede, Institute of Physical Chemistry, University of Greifswald, for analysis of mass spectra after direct insertion; J. Deck, National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, Ark., for recording of ^1H NMR spectra; and E. Stackebrandt and J. Burghard (DSMZ) for performing rRNA analyses and DNA reassociation experiments. For editorial help, we thank R. Jack.

REFERENCES

1. Catelani, D., and A. Colombi. 1974. Metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* **143**:431–434.
2. Cerniglia, C. E., J. C. Morgan, and D. T. Gibson. 1979. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. *Biochem. J.* **180**:175–185.
3. De Boer, T. D., and H. J. Backer. 1956. Diazomethane, p. 14–16. In N. J. Leonard (ed.), *Organic synthesis*, vol. 36. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
4. Engesser, K. H., V. Strubel, K. Christoglou, P. Fischer, and H. G. Rast. 1989. Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds: 1,10-dihydrodiol-1,10-dihydroxyfluoren-9-one, a novel arene dihydrodiol, as evidence for angular dioxygenation of dibenzofuran. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**:205–210.
5. Foght, J. M., and D. W. S. Westlake. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* **34**:1135–1141.
6. Fortnagel, P., H. Harms, R.-M. Wittich, W. Francke, S. Krohn, and H. Meyer. 1989. Cleavage of dibenzofuran and dibenzodioxin ring systems by a *Pseudomonas* bacterium. *Naturwissenschaften* **76**:222–223.
7. Fortnagel, P., H. Harms, R.-M. Wittich, S. Krohn, H. Meyer, V. Sinnwell, H. Wilkes, and W. Francke. 1990. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1148–1156.
8. Hammer, E., D. Krowas, A. Schäfer, M. Specht, W. Francke, and F. Schauer. 1998. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2215–2219.
9. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
10. Hundt, K., M. Wagner, D. Becher, E. Hammer, and F. Schauer. 1998. Effect of selected environmental factors on degradation and mineralization of biaryl compounds by the bacterium *Ralstonia pickettii* in soil and compost. *Chemosphere* **36**:2321–2335.
11. Lunt, D., and C. Evans. 1970. The microbial metabolism of biphenyl. *Biochem. J.* **118**:54–55.
12. Monna, L., T. Omori, and T. Kodama. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auricularis* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:285–289.
13. Parsons, J. R., J. A. de Bruijne, and A. R. Weiland. 1998. Biodegradation pathway of 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin and 2-chlorodibenzofuran in the biphenyl-utilizing strain JB1. *Chemosphere* **37**:1915–1922.
14. Parsons, J. R., C. Ratsak, and C. Siekerman. 1990. Biodegradation of chlorinated dibenzofurans by an *Alcaligenes* strain, p. 377–380. In O. Hutzinger and H. Fiedler (ed.), *Dioxin '90, organohalogen compounds 1*, EPRI seminar. ECO-Infoma Press, Bayreuth, Germany.
15. Resnick, S. M., and D. T. Gibson. 1996. Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4073–4080.
16. Schmid, A., B. Rothe, J. Altenbuchner, W. Ludwig, and K.-H. Engesser. 1997. Characterization of three distinct extradiol dioxygenases involved in mineralization of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DPO360. *J. Bacteriol.* **179**:53–62.
17. Selifonov, S. A., A. V. Slepkin, V. M. Adanin, M. Y. Nefedova, and I. I. Starovoitov. 1991. Oxidation of dibenzofuran by *Pseudomonas* strains harbouring plasmids of naphthalene degradation. *Mikrobiologiya* **60**:67–71.
18. Tashiro, M., H. Yoshiya, and G. Fukata. 1982. Bromination of 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-*tert*-butylbiphenyl and preparation of hydroxydibenzofurans. *J. Org. Chem.* **47**:4425–4429.
19. Wilkes, H., W. Francke, R.-M. Wittich, H. Harms, S. Schmidt, and P. Fortnagel. 1992. Mechanistic investigations on microbial degradation of diaryl ethers. *Naturwissenschaften* **79**:269–271.
20. Wilkes, H., R.-M. Wittich, K. M. Timmis, P. Fortnagel, and W. Francke. 1996. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:367–371.
21. Wittich, R.-M. 1998. Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:489–499.

5.6 Enzymatische Synthese von Imidazol-Derivaten mit Hilfe von *Trametes versicolor*

Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*

Annett Schäfer, Michael Specht, Annemarie Hetzheim, Wittko Francke und Frieder Schauer

Tetrahedron **2001**, 7693-7699

Wie in den Kapiteln 5.1-5.5 gezeigt werden konnte, sind Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze in der Lage auch chemisch stabile Strukturen zu metabolisieren. Solche Transformationen können nicht nur zur Zerstörung eines Schadstoffes durch mikrobiellen Abbau eingesetzt werden, sondern auch zur Synthese von Verbindungen durch gezieltes Ausnutzen beobachteter Metabolismus-Vorgänge. Laccase ist ein extrazelluläres Enzym aus Weißfäule-Pilzen, das in der Lage ist, Lignin zu transformieren [134, 135]. Die Eigenschaft, Elektronenübertragungen auf ein breites Spektrum von Substanzen zu katalysieren, wird in einer Vielzahl industrieller Applikationen bereits ausgenutzt, wie bei der mikrobiologischen Sanierung von Böden und Wasser und der Entwicklung umweltfreundlicher Prozesse in der Papier- und Holzindustrie [136].

Die bei Umsetzungen mit Laccase oder den Zellen von Weißfäulepilzen auftretenden Transformationen können auch neue Wege zur Darstellung nur schwer oder nicht synthetisierbarer Verbindungen erschließen. Die hier beschriebenen Untersuchungen an *Trametes versicolor* sollten Möglichkeiten klären, neue substituierte Imidazole oder Oligomerisierungsprodukte für pharmazeutische Zwecke durch enzymatische Umsetzung von N-(2-Alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamiden erhalten zu können.

Aus Umsetzungen von N-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamid **151** mit *Trametes versicolor* wurden neun Produkte erhalten, von denen sieben durch Chromatographie an Kieselgel isoliert werden konnten. Vier Produkte konnten durch Vergleich spektroskopischer Daten (HPLC/UV, GC/MS) als Mandelsäure, 2-Oxophenylelessigsäure, Benzylalkohol und Benzoesäure bestimmt werden. Die

Trennung der übrigen Metabolite erfolgte durch HPLC. Die ^1H -NMR-Spektren zweier Produkte wiesen auf enge strukturelle Verwandtschaft mit dem eingesetzten Substrat hin. Weiterführende NMR- und MS-Untersuchungen erlaubten die Identifizierung der Substanzen als N-[5-formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]acetamid **152** und 4-phenyl-2-(propylamino)imidazol **153** (Abbildung 5.17).

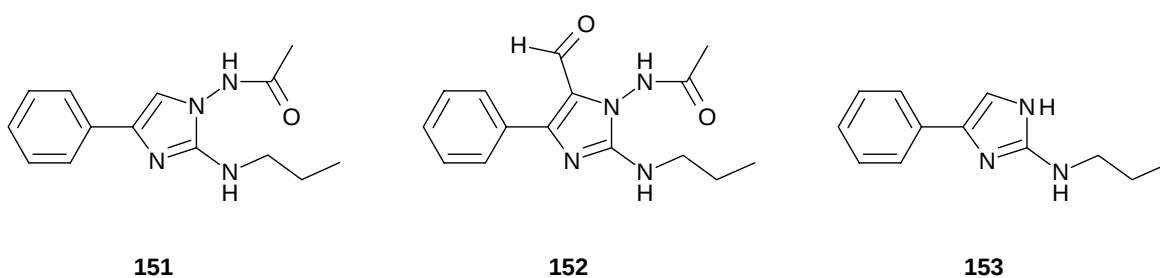


Abb. 5.17 N-[4-Phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamid **151** (Substrat) und zwei identifizierte Metaboliten: N-[5-Formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]acetamid **152** und 4-Phenyl-2-(propylamino)imidazol **153**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren eines weiteren Metaboliten zeigten mehrere Systeme von Resonanzsignalen, die das Vorhandensein zweier Phenyl-, einer Methylen-, einer Propyl- und einer Acetylaminogruppe im Molekül zeigten. Weitere NMR-Studien mit zweidimensionalen Experimenten (HMBC, HMQC, NOESY) führten zur Bestimmung der Struktur als 2-{{2-{{2-Acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino]carbonyl-amino}-2-phenylvinyl}}-4-propylsemicarbazid **154** (Abbildung 5.18).

Die aus den Umsätzen des Substrates mit Zellen von *Trametes versicolor* nicht extrahierbaren beiden übrigen Metabolite konnten aus Inkubationsexperimenten mit Präparationen von Laccase in ausreichender Menge erhalten werden. Das Gemisch beider Substanzen wurde mittels GC/MS untersucht (Abbildung 5.19). Die Massenspektren führten, zusammen mit Überlegungen zu Laccase-Umsetzungen, zur Strukturbeschreibung der Substanzen als N-(3-Hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid **155** und N-(5-Oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid **156**.

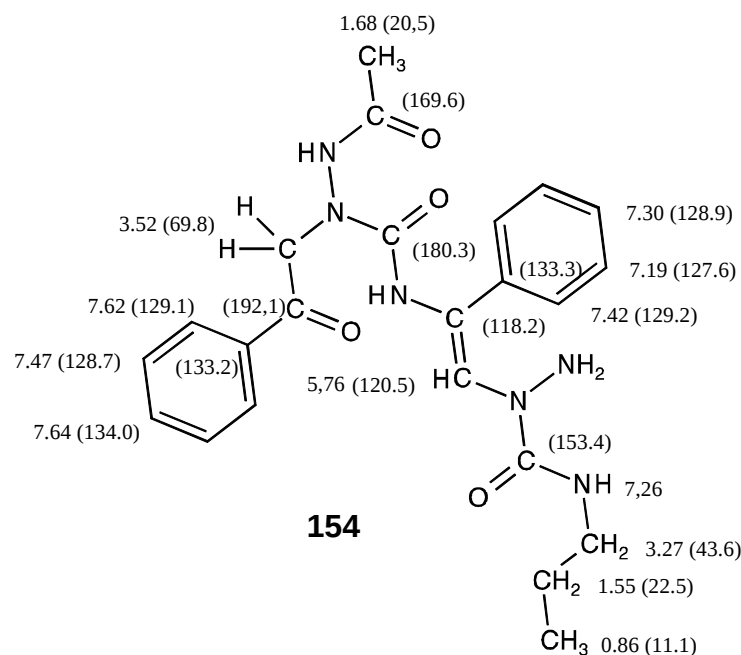


Abb. 5.18 2-{{2-{{2-Acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino]carbonyl-amino}-2-phenylvinyl}}-4-propylsemicarbazid **154** und Zuordnung der NMR-Signale

Mit der hier gezeigten Umsetzung von N-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamid **151** zu substituierten Imidazolen und einem neuen Kupplungsprodukt durch Zellen und Laccase von *Trametes versicolor* konnte eine geeignete Route zur Synthese neuer Strukturen mit möglichem pharmakologischen Potential aufgezeigt werden.

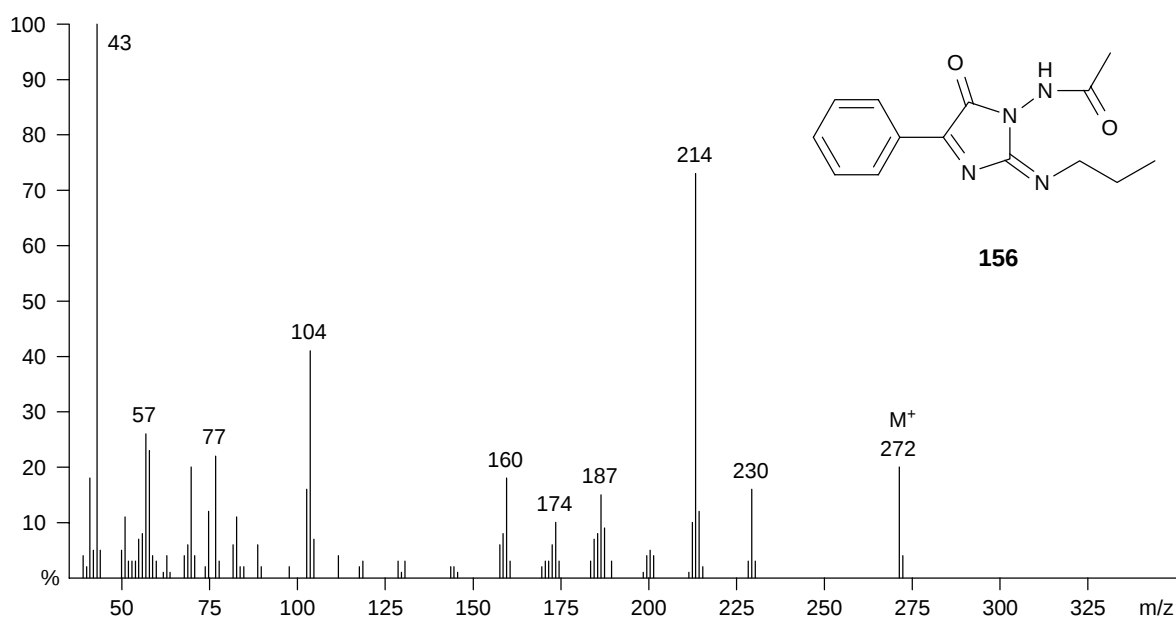
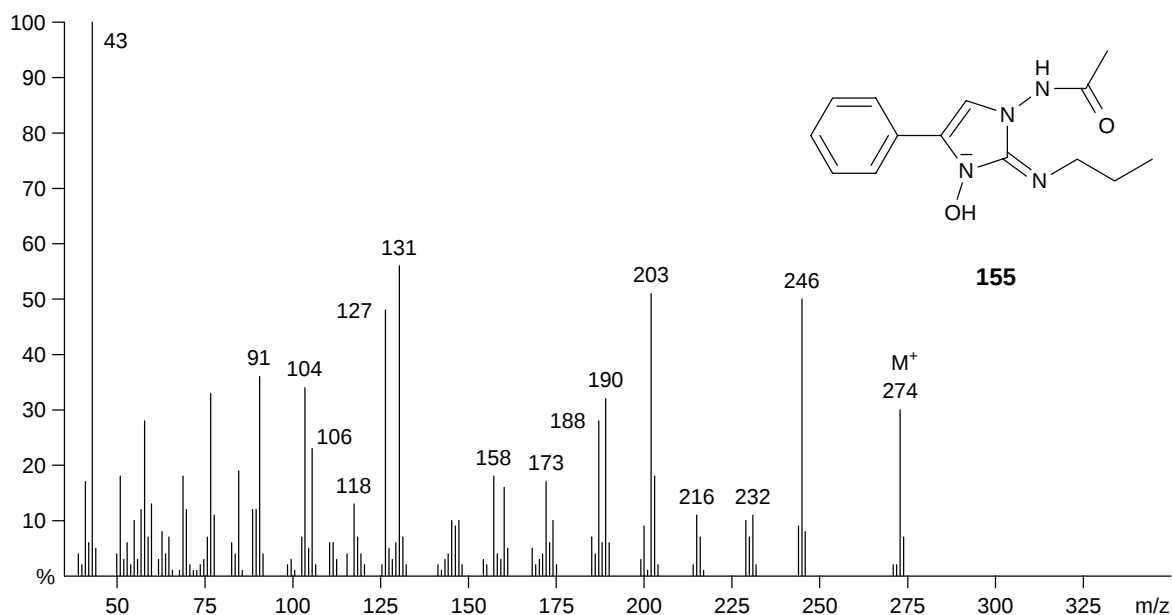


Abb. 5.19 Massenspektren von N-(3-Hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid **155** und N-(5-Oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamid **156**

Nachdruck der Publikation

Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*

Annett Schäfer, Michael Specht, Annemarie Hetzheim, Wittko Francke und Frieder Schauer

Tetrahedron **2001**, 57, 7693-7699

mit Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*

Annett Schäfer,^{a,*} Michael Specht,^b Annemarie Hetzheim,^c Wittko Francke^b and Frieder Schauer^a

^aInstitut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, F.-L.-Jahn-Straße 15, D-17489 Greifswald, Germany

^bInstitut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg, Germany

^cInstitut für Chemie und Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Soldmannstraße 16, D-17487 Greifswald, Germany

Received 7 May 2001; accepted 19 July 2001

Abstract—Feeding *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides to cells of *Trametes versicolor* yielded two types of aromatic metabolites besides degradation products: (1) Novel heteroaromatic compounds, such as: *N*-[5-formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide, 4-phenyl-2-(propylamino)imidazole, *N*-(3-hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide, and *N*-(5-oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide; (2) Novel compounds arising from coupling of two ring-opened molecules of the substrate. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Laccase, an extracellular enzyme from white rot fungi, has been implicated in lignin biodegradation, although the enzyme causes both depolymerization¹ and polymerization of lignin.^{2,3} In addition, several white rot fungi, such as *Trametes versicolor*, transform pesticides and other anthropogenic pollutants through the action of their laccase.⁴ Additionally, this enzyme is able to polymerize various halogen, alkyl, and alkoxy anilines,^{5,6} phenols,⁷ and biaryls.⁸ Enzymatic copolymerization of pesticide-derived aromatic amines with phenolic humus monomers

such as syringic, vanillic, protocatechuic, and ferulic acid resulted in the formation of several hybrid dimers, trimers, and tetramers.⁹

Hitherto laccase has not been widely used in organic synthesis^{10,11} and little is known about the transformation of heteroaromatic compounds by *T. versicolor*.¹² The purpose of the present study was to investigate whether *T. versicolor* can transform *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides to yield novel substituted imidazoles or oligomerization products applicable for pharmacological purposes.

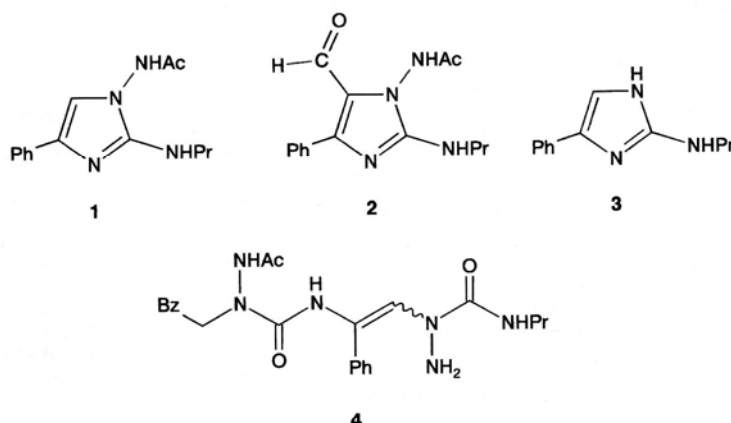


Figure 1. *N*-[4-Phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide (substrate 1) and products 2–4 formed during incubation with *T. versicolor*.

Keywords: imidazole; *Trametes versicolor*; transformation.

* Corresponding author. Tel.: +49-3834-864225; fax: +49-3834-864202; e-mail: annett-schaefer@gmx.de

0040-4020/01/\$ - see front matter © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

PII: S0040-4020(01)00751-7

Table 1. Comparison of ^1H NMR spectra of substrate **1** (*N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide) with product **2** and **3**

1		2		3		Atom and structure
δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	
–		9.40	s	–		1H, CHO
7.64	d, $^3J=7.8$	7.74	d, $^3J=7.3$	7.88	d, $^3J=6.7$	2H, H_m , C_6H_5
		7.45	m	7.46–7.31	m	3H, H_m , H_p , C_6H_5
7.29	dd, $^3J=7.8$, $^3J=7.3$					2H, H_m , C_6H_5
7.11	t, $^3J=7.3$					1H, H_p , C_6H_5
7.08	s	–		7.46–7.31		1H, imidazole
5.86	t, $^3J=5.8$	7.16	t, $^3J=5.8$			1H, NH, $\text{NH}-\text{CH}_2$
3.19	m	3.29	m	3.11	m	2H, CH_2 , CH_2-NH
1.97	s	1.99	s	–	–	3H, CH_3 , CH_3-CONH
1.58	m	1.57	m	1.54	m	2H, CH_2 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
0.91	t, $^3J=7.4$	0.88	t, $^3J=7.4$	0.91	t, $^3J=7.4$	3H, CH_3 , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}$

2. Results and discussion

2.1. Transformation of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides by *Trametes versicolor*

Several products generated from different *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides can be obtained from cultures of *T. versicolor* supplemented with these imidazole substrates.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the cell-free supernatant of cultures incubated with the substrate *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide (substrate **1**, Fig. 1) revealed at least nine products. Sufficient amounts of these products for spectral characterization were formed over an incubation period of 24 h.

Two of the nine products were mixtures, which we were unable to resolve. Four of the seven separable products were extracted by ethyl acetate and identified as mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzyl alcohol, and benzoic acid by comparison of the spectroscopic data (HPLC/UV and gas chromatography–mass spectrometry GC–MS) with those of synthetic standards.

The separation of the remaining three products was performed by HPLC. Comparison of proton–proton spin systems and couplings of the ^1H NMR spectra of two of these compounds with those of substrate **1** showed structural similarities (Table 1) and led to the later identification of product **2** as *N*-[5-formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide and product **3** as 4-phenyl-2-(propylamino)imidazole (Fig. 1). These identifications are based on the following data: mass spectral analysis of compound **2** showed a molecular mass of 286. This mass, 28 units higher than substrate **1**, and the fragmentation of $\text{M}^+ - 29$ ($\text{M}^+ - \text{CHO}$) in the mass spectrum of **2**, was attributed to an additional formyl group. This is confirmed by the presence of a proton showing a singlet at $\delta=9.40$ ppm in the ^1H NMR spectrum of **2**, and a carbon signal at the low field value of $\delta=175.0$ ppm in the ^{13}C NMR spectrum. Two-dimensional NMR experiments led to the assignment of the proton at $\delta=9.40$ ppm to the carbon at $\delta=175.0$ ppm, demonstrating the presence of an aldehyde structure. Finally, the singlet at $\delta=7.08$ ppm, present in the ^1H NMR spectrum of substrate **1** and belonging to the C-5 position of the imidazole ring, is lacking in the spectrum of product **2**. Therefore, the additional formyl group was assigned to the C-5 position in compound **2**.

Table 2. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of product **4**

^1H NMR, 4			^{13}C NMR, 4	
δ (ppm)	J (Hz)	Atom and structure	δ (ppm)	Atom and structure
7.64	t, $^3J=7.5$	1H, H_p , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$	192.1	C=O, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
7.62	d, $^3J=7.7$	1H, H_m , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$	180.3	C=O
7.47	dd, $^3J=7.5$, $^3J=7.7$	1H, H_m , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$	169.6	C=O, CH_3-CONH
7.42	d, $^3J=7.6$	1H, H_m , C_6H_5	153.4	C=O bzw. C=NH
7.30	t, $^3J=7.2$	1H, H_p , C_6H_5		$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$
7.26	t, $^3J=5.8$	1H, NH, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	134.0	C_p , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
7.19	dd, $^3J=7.6$, $^3J=7.2$	1H, H_m , C_6H_5	133.3	Cl, C_6H_5
5.76	s	1H, CH	133.2	Cl, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
3.52	s	2H, CH_2 , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$	129.2	C_m , C_6H_5
3.27	m	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	129.1	C_m , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
1.68	s	3H, CH_3 , CH_3-CONH	128.9	C_p , C_6H_5
1.55	m	2H, CH_2 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	128.7	C_m , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
		3H, CH_3 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	127.6	C_m , C_6H_5
		$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	120.5	CH
0.86	t, $^3J=7.4$	3H, CH_3 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$	118.2	C-quaternary
			69.8	CH_2 , $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$
			43.6	CH_2 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$
			22.5	CH_2 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$
			20.5	CH_3 , CH_3-CONH
			11.1	CH_3 , $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}$

The molecular mass of compound **3** (201) is 57 units less than that of substrate **1** (258) indicating the loss of the acetyl amino group. The absence of a fragment ion at m/z 43 in the mass spectrum of **3** indicates that an acetyl group is not present in this compound. Furthermore, all ^1H NMR signals of an acetyl amino group (present in the substrate) are lacking in the ^1H NMR spectrum of product **3**, leading together with the remaining resonance signals to the structure of 4-phenyl-2-(propylamino)imidazole for this product.

For compound **4**, the NMR experiments revealed several systems of resonance signals (Table 2), pointing to two different phenyl groups, divers aliphatic groups (a propylamino and a methylene group) and an acetyl amino group. Mass spectral analysis with electron impact ionization (70 eV, direct inlet- and coupled GC–MS, with and without prior derivatization) led to inconsistent mass spectra, not suitable for structure elucidation. The mass spectrum obtained by use of the FAB technique showed no molecular ion peak, but significant peaks were detected at m/z 43 (acetyl group), 77 (phenyl group) and 105 (benzoyl group). The existence of a benzoyl substructure, also shown by the detection of benzoyl formic acid in further degradation of compound **4**, demonstrates that the imidazole ring is cleaved during metabolism. This together with further NMR experiments (^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, and the two-dimensional NMR experiments HMBC, HMQC and NOESY, not shown), corroborate a structure formed by coupling of two ring-opened molecules of substrate **1**. Fig. 2 shows the proposed formation pathway of product **4**, assigned as 2-{{[2-acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino]carbonyl-amino}-2-phenylvinyl}}-4-propylsemicarbazide in accordance with all obtained spectral data. The *E,Z*-isomerism of product **4** were not analyzed.

Thus, after transformation of *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)-imidazol-1-yl]-acetamide by *T. versicolor*, seven products were identified; the well known substances mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzoic acid, and benzyl alcohol, and the, up to now, synthetically not available compounds *N*-[5-formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide **2**, 4-phenyl-2-(propylamino)imidazole **3**, and the coupling product **4**. Two additional products, assigned as **5** and **6**, were detected by HPLC/UV analysis, which were not separable by the methods used. Sufficient amounts of these compounds for characterization were obtained in the following incubation experiments with a crude preparation of laccase.

HPLC/UV analysis of the cell-free supernatant of the culture incubated with the substrate *N*-(2-hexylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamide revealed also nine products, in accordance with the metabolism outlined above. As well as in the incubation experiments with substrate **1**, mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzoic acid and benzyl alcohol were formed. Additional analogous products were *N*-(5-formyl-2-hexylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamide, 2-hexylamino-4-phenylimidazole, a coupling product like **4**, now with a hexylamino group instead of a propylamino group, and, again, two other unseparable products (data not shown).

2.2. Transformation of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides by crude preparation of laccase

In cultures supplemented with *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide, *T. versicolor* secreted extracellular laccase with activity at a level of $400 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Under these conditions, *T. versicolor* also produced manganese peroxidase with an activity of smaller amounts ($140 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$). No lignin peroxidase was detected. In order to distinguish between laccase- and manganese peroxidase-catalyzed reactions, crude preparations of the enzymes were tested for their ability to transform substrate **1**. After incubation with crude preparation of manganese peroxidase (activity $1000 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$), no decrease of substrate **1** and no products derived from it were found by HPLC/UV analysis.

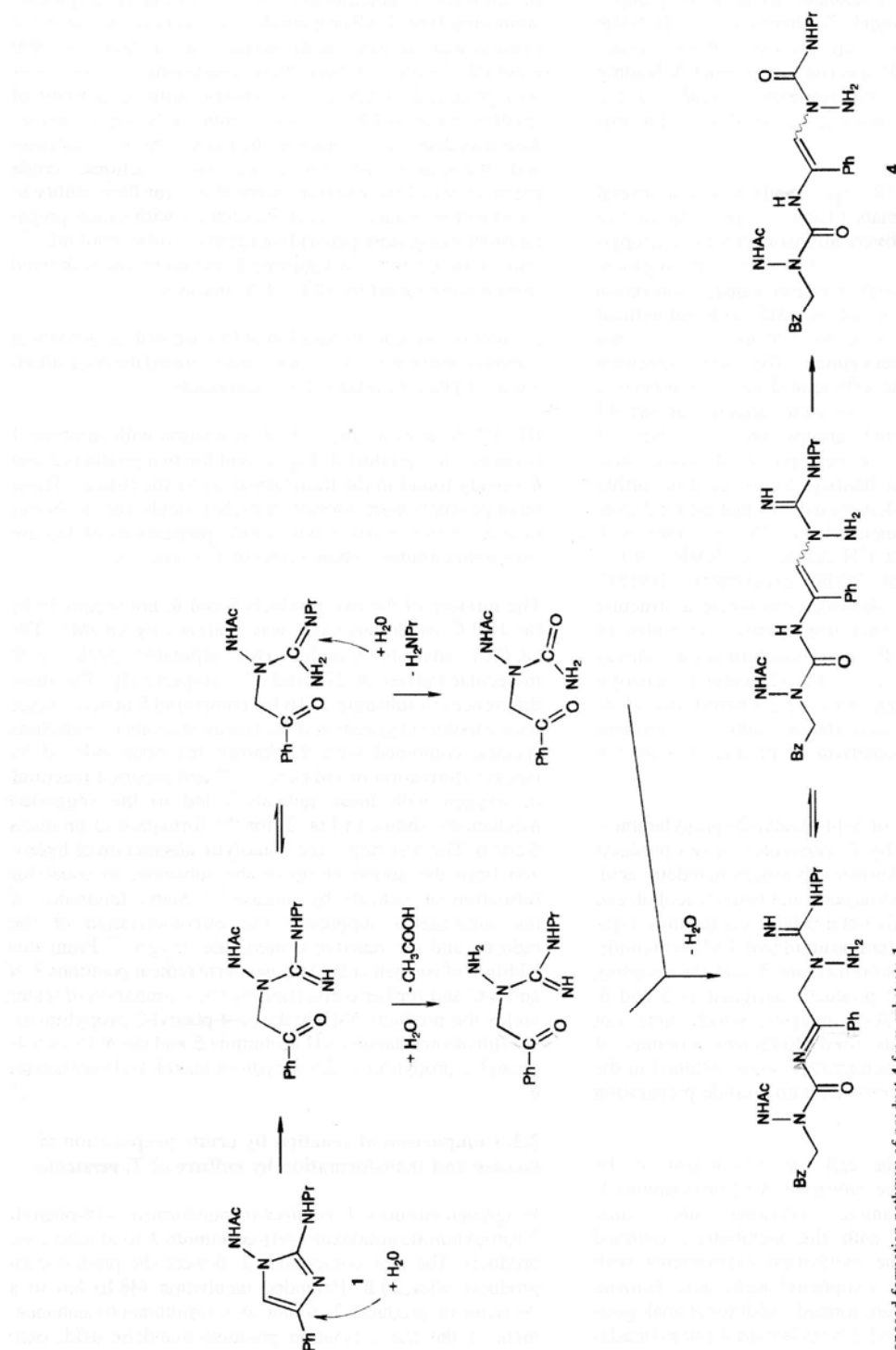
In contrast, a crude preparation of laccase with an activity at a level of $800 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ transformed the *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides.

HPLC/UV analysis after 5 h of incubation with substrate **1** revealed only product **4** (Fig. 1) and the two products **5** and **6** already found in the transformation by the fungus. These three products were formed in higher yields and in shorter time by transformation with crude preparation of laccase than with cultures (whole cells) of *T. versicolor*.

The mixture of the two products **5** and **6**, not separable by the HPLC conditions used, was analyzed by GC/MS. The GC/MS analysis revealed two separated peaks with molecular masses of 274 and 272, respectively. The mass differences to substrate **1** (16 for compound **5** in accordance with a hydroxyl group) and the fragmentations in both mass spectra, combined with the known reactions induced by laccase (formation of radicals,^{6,13–18} and reported reactions of oxygen with these radicals¹⁹) led to the suggested mechanism, shown in Fig. 3, for the formation of products **5** and **6**. The first step is the homolytic abstraction of hydrogen from the amino group of the substrate, as usual for formation of radicals by laccase.^{6,18} Steric hindrance of the substituents suppresses the oligomerization of the radicals and the reactive centers add oxygen.¹⁹ From this addition of oxygen at the two isomeric radical positions 3-N and 5-C and further conversion by the elimination of water yields the products *N*-(3-hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide **5** and the *N*-(5-oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide **6**.

2.3. Comparison of reaction by crude preparation of laccase and transformation by culture of *T. versicolor*

In agitated cultures, *T. versicolor* transformed *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide **1** to at least nine products. The new compounds **2–6** were the predominant products after 24 h. Extended incubation (48 h) led to a decrease of products **2–6** and to a simultaneous enhancement of the transformation products mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzoic acid, and benzyl alcohol. The products **4–6** were formed in higher yields and in shorter time (5 h) by transformation with a crude preparation of laccase. The other products, which derive from extended

Figure 2. Proposed formation pathway of product **4** from substrate **1**.

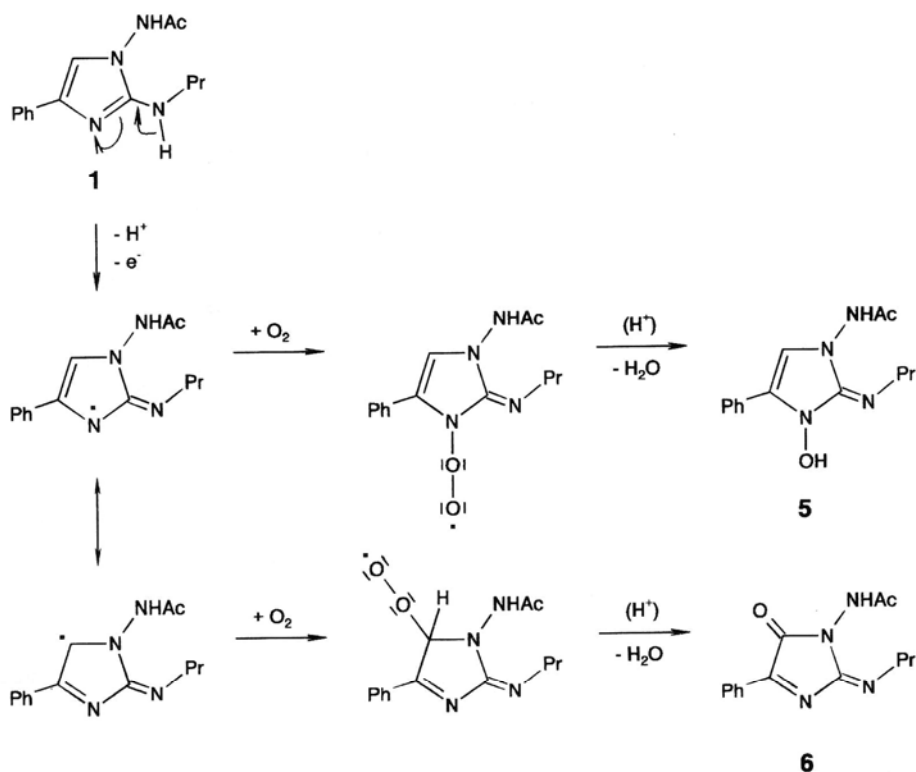


Figure 3. Proposed laccase-catalyzed formation of radicals and products 5 and 6 from substrate 1.

degradation of the metabolites, could not be detected under these conditions. After 24 h, there was no evidence for further transformation of product 4 and only a small decrease of compounds 5 and 6. These results demonstrate that the formation of compounds 4–6 are laccase-catalyzed reactions and that the extracellular enzyme laccase is not responsible for the transformation of substrate 1 to mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzoic acid, benzyl alcohol, as well as to the products 2 and 3. It is likely, that intracellular enzymes catalyze these transformations.

The transformation of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides by whole cells of *T. versicolor* and by a crude preparation of laccase to novel substituted imidazoles and a novel coupling product 2-{{2-{{2-acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino}carbonyl-amino}-2-phenylvinyl}}-4-propylsemicarbazide, provides an attractive and practicable synthetic route to a variety of new structures that could possess pharmacological activity.

3. Experimental

3.1. Fungal strain

Trametes versicolor SBUG-M 1050 was isolated from the wood of a deciduous tree in the north of Germany. The white rot fungus is deposited at the strain collection of the Department of Biology of the University of Greifswald (SBUG).

3.2. Culture media and conditions

3.2.1. Transformation of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides using whole cells of *Trametes versicolor* SBUG-M 1050. *T. versicolor* was initially cultivated on malt agar plates that were incubated for 7 days at 30°C and then maintained at 4°C. Broth cultures were prepared by inoculating a nitrogen-rich medium⁸ with two or three 1 cm² agar culture fragments. Incubation was performed under static conditions at 30°C for 7 days. A uniform inoculum was obtained by homogenization of this culture with an Ultra-Turrax homogenizer T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) at 17000 rpm. For the production of transformation products, 75 mL medium inoculated with 7.5 mL of the homogenized pre-culture was incubated with 30 mg of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamide in 300 mL Erlenmeyer flasks for 24 h. Cultures were agitated in a water bath (GFL model 1092, Burgwedel, Germany) at 30°C and 160 rpm.

3.3. Transformation of *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides using crude preparation of laccase

Crude preparation of laccase was prepared as follows: *T. versicolor* was cultivated as described with the substrate 1 substituted by 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (10 mM), a known inducer of laccase. The culture medium was filtered through a glass fiber filter in a Buchner funnel to separate the medium from whole cells. The cell-free culture medium was incubated with Q-Sepharose for 1 h and the adsorbed

enzymes were extracted from the Q-Sepharose with 20 mM histidine buffer (pH 6.3). This enzyme extract was then concentrated by ultrafiltration (Centriprep, 10 kDa, Amicon GmbH, Witten, Germany) and desalted with a Sephadex G-25 Superfine column (Pharmacia, Freiburg, Germany).

The crude preparation of laccase (activity $800 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$) was diluted 1:4 with 20 mM sodium acetate buffer, pH 5. 6 mg *N*-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamide was added to 6 mL of this solution, and the reaction mixture was incubated for 5 h at 30°C with agitation at 100 rpm.

3.4. Analytical HPLC

For routine analysis, culture samples were centrifuged to remove cells and analyzed by a HPLC system (Hewlett-Packard GmbH, Bad Homburg, Germany) consisting of an HP 1050 Series Pump, and HP 1040 M Series I Diode-Array-Detector, and an HP HPLC Chem Station. An endcapped, $5\text{-}\mu\text{m}$, LiChroCart 125-4 RP 18 column (Merck, Darmstadt, Germany) was used at a flow rate of 1 mL/min. A solvent system consisting of methanol (eluent A) and phosphate buffer pH 4.8 (eluent B), starting from an initial ratio of 20% A and 80% B and reaching 100% methanol within 14 min, was used.

3.5. Synthesis

N-(2-alkylamino-4-phenylimidazol-1-yl)-acetamides were prepared according to literature procedures.²⁰

3.6. Isolation: general procedure for isolation of transformation products

An RP18 silicagel column (polypropylene 3 mL, 200 mg absorbent material, Baker, Gross-Gerau, Germany) was charged with 10 mL cell-free culture media. The substrate and several products were eluted together with 1 mL of methanol.

The aqueous filtrate was extracted three times with an equal volume of ethyl acetate, first at pH 6 and then at pH 2. The unified ethyl acetate phases, which contained the products mandelic acid, oxophenyl acetic acid, benzoic acid, and benzyl alcohol, were dried over anhydrous sodium sulfate and then evaporated with a vacuum rotator at 40°C . All samples obtained were redissolved in 1 mL methanol.

The separation of products **2–6** from the methanolic fraction was performed on a HPLC module system (Merck, Darmstadt, Germany) equipped with a Model L 6200A Intelligent Pump, a Rheodyne 7161 injection valve with a $20\text{-}\mu\text{L}$ loop, a Model L-4250 absorbance detector operating at 220 nm. High purity of products was achieved on an endcapped, $5\text{-}\mu\text{m}$, LiChroCart 125-4 RP 18 column (Merck, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 1 mL/min. For sufficient separation the solvent system, consisting of methanol (eluent A) and phosphate buffer pH 4.8 (eluent B) in a ratio of 45% A and 55% B, was held constant for 5 min, then changed to a ratio of 50% A and 50% B within 30 s and held constant for another 4.5 min. Then the ratio was changed within 30 s to 60% A and 40% B, held for

2.5 min and finally changed again within 30 s to 100% A for additional 2 min. The products **2–4** were obtained in high purity, compounds **5** and **6** as an inseparable mixture.

3.7. Characterization

Analysis of purified products by gas chromatography/mass spectrometry was carried out on a gas chromatograph GC 8000 linked to a mass selective detector MD 800 (Fisons Instruments, Mainz, Germany) operating at 70 eV and fitted with a 30-m BPX5 ms column (0.21 mm; $0.25\text{ }\mu\text{m}$ film, SGE, Weiterstadt, Germany). Other mass spectral determinations were made by electron impact analysis at 70 eV with sample introduction via a direct insertion probe. Molecular weights were confirmed by fast atom bombardment (+FAB) analysis on a M-40 mass spectrometer (AMD Intectra) using 3-nitrobenzyl alcohol as a matrix.

The ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker (Karlsruhe, Germany) ARX 300 instrument at 300 MHz or DRX 500 at 500 MHz in $\text{DMSO-}d_6$. Tetramethylsilane was used as an internal standard.

The four products separated by ethyl acetate extraction were identified as mandelic acid, oxophenylacetic acid, benzoic acid, and benzyl alcohol by comparison of the HPLC/UV and GC–MS data with those of synthetic standards.

3.7.1. *N*-[5-Formyl-4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide **2.** This compound was received as a transformation product of *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide by *T. versicolor*. Isolation from culture medium was achieved by the use of RP18-silicagel column. Separation was carried out as described before: yield 4 mg (13%). 300 MHz ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 9.40 (s, 1H, CHO), 7.74 (d, $^3J=7.3$ Hz, 2H, H_o , C_6H_5), 7.45 (m, 3H, H_m , H_p , C_6H_5), 7.16 (t, $^3J=5.8$ Hz, 1H, NH, NH-CH_2), 3.29 (m, 2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NH}$), 1.99 (s, 3H, CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 1.57 (m, 2H, CH_2 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.88 (t, $^3J=7.4$ Hz, 3H, CH_3 , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$): 175.0 (C=O, CHO), 169.3 (C=O, NH-COCH_3), 152.9, 151.1 (C-4, C-2, imidazole), 132.7 (C-1, C_6H_5), 128.9 (C_p , C_6H_5), 128.5 (C_o , C_6H_5), 128.4 (C_m , C_6H_5), 122.1 (C-5, imidazole), 43.4 (CH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 22.5 (CH_2 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 20.7 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 11.1 (CH_3 , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}$); MS (GC/MS): $\text{M}^+=286$, 257 (M^+-29 , COH), 243 (M^+-43 , COCH_3), 228 (M^+-58 , HNCOCCH_3), 200 (M^+-86 , $\text{HNCOCCH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$), 186, 158, 131, 104, 103, 77, 43

3.7.2. 4-Phenyl-2-(propylamino)imidazole **3.** This compound was found as a transformation product of *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide by *T. versicolor*. Isolation from culture medium was carried out by the use of RP18-silicagel column and preparative HPLC as described before: yield 4 mg (13%). 300 MHz ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.88 (d, $^3J=6.7$ Hz, 2H, H_o , C_6H_5), 7.46–7.31 (m, 3H, H_m , H_p , C_6H_5), 1H, imidazole), 3.11 (m, 2H, CH_2 , $\text{CH}_2\text{-NH}$), 1.54 (m, 2H, CH_2 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.91 (t, $^3J=7.4$ Hz, 3H, CH_3 , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}$); MS (GC/MS): $\text{M}^+=210$, 173 (M^+-28 , C_2H_4), 160, 104, 103, 77.

3.7.3. 2-[[2-[2-Acetyl-1-(benzoylmethyl)hydrazino]carboxyl-amino]-2-phenylvinyl]-4-propylsemicarbazide 4. This compound was detected after transformation of *N*-[4-phenyl-2-(propylamino)imidazol-1-yl]-acetamide by whole cells of *T. versicolor* and by crude preparation of laccase. For structure elucidation, compound **4** was produced in reaction mixture with crude preparation of laccase, because of the shorter reaction time and a higher accumulation of the product. Isolation from the reaction mixture was carried out by use of a RP18-silicagel column and the product was purified with HPLC as described before: yield 2.8 mg (47%). 500 MHz ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.64 (t, $^3J=7.5$ Hz, 1H, H_p , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 7.62 (d, $^3J=7.7$ Hz, 1H, H_o , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 7.47 (dd, $^3J=7.5$ Hz, $^3J=7.7$ Hz, 1H, H_m , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 7.42 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H_o , C_6H_5), 7.30 (t, $^3J=7.2$ Hz, 1H, H_p , C_6H_5), 7.26 (t, $^3J=5.8$ Hz, 1H, NH, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 7.19 (dd, $^3J=7.6$ Hz, $^3J=7.2$ Hz, 1H, H_m , C_6H_5), 5.76 (s, 1H, CH), 3.52 (s, 2H, CH_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 3.27 (m, 2H, CH_2 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 1.68 (s, 3H, CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 1.55 (m, 2H, CH_2 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 0.86 (t, $^3J=7.4$ Hz, 3H, CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 192.1 (C=O, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 180.3 (C=O), 169.6 (C=O, $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 153.4 (C=O bzw. C=NH, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 134.0 (C_p , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 133.3 (C_l , C_6H_5), 133.2 (C_l , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 129.2 (C_o , C_6H_5), 129.1 (C_o , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 128.9 (C_p , C_6H_5), 128.7 (C_m , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 127.6 (C_m , C_6H_5), 120.5 (CH), 118.2 (C-quaternary), 69.8 (CH_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CH}_2\text{-N}$), 43.6 (CH_2 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 22.5 (CH_2 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$), 20.5 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 11.1 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C}$); MS (FAB): 105 ($\text{H}_5\text{C}_6\text{CO}$), 77, 43.

3.7.4. *N*-(3-Hydroxy-4-phenyl-2-propylimino-2,3-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide 5 and *N*-(5-oxo-4-phenyl-2-propylimino-2,5-dihydroimidazol-1-yl)-acetamide 6. These products were initially detected by HPLC/UV in culture medium of whole cells of *T. versicolor* and in the reaction mixture using the crude preparation of laccase. The products formed by transformation with the crude preparation of laccase were used for spectral analysis, because of the shorter reaction time and the higher yield of products. Isolation from the reaction mixture was carried out by the use of RP18-silicagel column and the products were received as mixture by preparative HPLC as described before: yield 3.4 mg (57%).

MS (GC/MS compound **5**): $\text{M}^+=274$, 246 (M^+-28 , C_2H_4) 232 (M^+-42 , H_2CCO), 216 (M^+-58 , HNCOCH_3), 204 (M^+-70 , $\text{H}_2\text{CCO/C}_2\text{H}_4$), 203 (M^+-71 , $\text{COCH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$), 190 (M^+-84 , $\text{H}_2\text{CCO/C}_3\text{H}_6$), 188 (M^+-86 , $\text{HNCOCH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$), 173, 158, 131, 127, 106, 104, 91, 77, 43.

MS (GC/MS compound **6**): $\text{M}^+=272$, 230 (M^+-42 , H_2CCO), 214 (M^+-58 , HNCOCH_3), 201 (M^+-71 , $\text{COCH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$), 187 (M^+-85 , $\text{COCH}_3/\text{C}_3\text{H}_6$), 174, 160, 104, 103, 77, 43.

Acknowledgements

We thank Ute Sack for providing the crude preparation of

manganese peroxidase, M. Kindermann, S. Siegert, B. Witt for performing NMR spectra, and R. Jack for help in preparing the manuscript.

References

1. Yaropolov, A. I.; Skorobogat'ko, O. V.; Vartanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *49*, 257–280.
2. Kawai, S.; Umezawa, T.; Higuchi, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *262*, 99–110.
3. Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Reid, I. D.; Lanthier, P.; Yaguchi, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1876–1880.
4. Collins, P. J.; Koterman, M. J. J.; Field, J. A.; Dobson, A. D. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 4563–4567.
5. Hoff, T.; Liu, S. Y.; Bollag, J. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49*, 1040–1045.
6. Simmons, K. E.; Minard, R. D.; Bollag, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *21*, 999–1003.
7. Leonowicz, A.; Edgehill, R. U.; Bollag, J. M. *Arch. Microbiol.* **1984**, *137*, 89–96.
8. Jonas, U.; Hammer, E.; Schauer, F.; Bollag, J. M. *Bio-degradation* **1998**, *8*, 321–328.
9. Bollag, J. M.; Minard, R. D.; Liu, S. Y. *Environ. Sci. Technol.* **1983**, *17*, 72–80.
10. Potthast, A.; Rosenau, T.; Chen, C. L.; Gratzl, J. S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4320–4321.
11. Agematu, H.; Tsuchida, T.; Kominato, K.; Shibamoto, N.; Yoshioka, T.; Nishida, H.; Okamoto, R. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 141–148.
12. Heinfling, A.; Bergbauer, M.; Szewzyk, U. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 261–266.
13. Bollag, J. M. Enzymes Catalyzing Oxidative Coupling Reactions of Pollutants. *Metal Ions in Biological Systems*; Sigel, H., Sigel, A., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1992; Vol. 28, pp. 205–217.
14. Bollag, J. M.; Myers, C.; Pal, S.; Huang, P. M. The Role of Abiotic and Biotic Catalysts in the Transformation of Phenolic Compounds. In *Environmental Impacts of Soil Component Interactions*; Huang, P. M., Berthelin, J., Bollag, J. M., McGill, W. B., Page, A. L., Eds.; Lewis Publishers: Chelsea, MI, 1995; pp. 297–308.
15. Tatsumi, K.; Freyer, A.; Minard, R. D.; Bollag, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 210–215.
16. Youn, H. D.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *132*, 183–188.
17. Youn, H. D.; Kim, K. J.; Maeng, J. S.; Han, Y. H.; Jeong, I. B.; Jeong, G.; Kang, S. O.; Hah, Y. C. *Microbiology* **1995**, *141*, 393–398.
18. Dec, J.; Bollag, J. M. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 657–663.
19. Kawai, S.; Umezawa, T.; Shimada, M.; Higuchi, T. *FEBS Lett.* **1988**, *236*, 309–311.
20. Hetzheim, A.; Peters, O.; Beyer, H. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3418–3426.

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse des Non-Target Screening verdeutlichen die Wichtigkeit einer regelmäßigen Beobachtung des Odersystems in Bezug auf Markersubstanzen und eingetragene synthetische organische Substanzen. Begleitend zum Aufbau eines nötigen Monitoring-Systems sollten zügig Maßnahmen zu Vermeidung und Verringerung anthropogener Einträge getroffen werden.

Das Odersystem zeigt zwei beachtenswerte Regionen, in denen spezielle und allgemein in Umweltkompartimenten bekannte anthropogene Substanzen in teilweise stark erhöhten Mengen aufzufinden sind. Dies sind der Nebenfluss Strzegomka und die Oder bei Brzeg Dolny. Die Strzegomka ist stark mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen PAK belastet und trägt einen nicht unerheblichen Teil zur hohen PAK-Fracht der gesamten Oder bei. In der Strzegomka und bei Brzeg Dolny findet sich eine Vielzahl synthetischer Substanzen aus verschiedenen industriellen Produktionsschienen. Besonders zu beachten ist die Belastung der Oder in diesen Bereichen mit Benzothiazolen, die als Vulkanisierungsbeschleuniger bekannt sind. Pestizide und PCB werden vereinzelt in geringen Mengen gefunden und stellen keinen herausragenden Risikofaktor dar.

Die Untersuchungen zeigen, dass geeignete anthropogene Markersubstanzen wertvolle Hinweise auf Art und Situation einer Belastung geben und einer Identifizierung und Beschreibung von Emissionsquellen dienen können. In den Odersedimenten waren u.a. Fäkalsteroid, Phenylalkane, Alkylphenole, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, chlorierte Verbindungen wie Triclosan, sowie synthetische Duftstoffe (Moschusersatzstoffe) geeignete Marker und hilfreiche Werkzeuge zur Interpretation der gewonnenen Untersuchungsdaten. Die kommunalen Marker zeigen hierbei eine deutliche Korrelation mit der Siedlungsdichte des jeweiligen Einzugsgebietes. Kommunale Abwässer und Einträge aus der Verbrennung von Kohle und Mineralölprodukten durch Industrie, Verkehr und Haushalte stellen die herausragenden Quellen der Oderbelastung dar. Hier sind geeignete Maßnahmen wie die Verbesserung der Sammlung und Klärung von Abwässern im Einzugsgebiet und eine übergreifende gesetzliche Einschränkung der Emission durch Verbrennung dringend nötig.

Zusätzlich wurde in einem ausgetragenen Sediment ein bisher nicht bekannter Metabolit des Endosulfans identifiziert (121). Weitere Untersuchungen zur umweltchemischen Relevanz dieser Substanz scheinen sinnvoll.

Eine interessante Verbindung aus einem anderen Flusssystem wurde mit der Strukturaufklärung einer bis dahin unbekannten Substanz gefunden, die in der Elbe und im Grundwasser der Elbmarsch auftrat. 2-(2-Acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamid (**130**) ist ein mögliches Abbauprodukt von 4-Dimethylaminoantipyrin (**132**) und wird aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit leicht mit dem Grundwasser transportiert.

Darüber hinaus konnten in Metabolismusstudien an Biphenyl, Dibenzofuran und Imidazol-Derivaten 53 Metabolite (32 unterschiedliche Substanzen) durch MS- und GC/MS-Untersuchungen sowie verschiedene ein- und zweidimensionale NMR-Experimente identifiziert werden. Die Strukturen von sieben dieser Metabolite konnten durch Synthese zusätzlich abgesichert und die Substanzen als Referenz erhalten werden. Hierbei ließen sich Erkenntnisse über initiale Metabolisierungsschritte an Aromaten durch Oxygenierung/Hydroxylierung vertiefen und neue Erkenntnisse über Abbauewege von Biphenyl und Dibenzofuran in den einzelnen Organismen gewinnen.

Öffnung der aromatischen Systeme erfolgte bei allen untersuchten Spezies durch mehrfache Hydroxylierung mit anschließender *ortho*- (Pilze/Hefen) oder *meta*-Spaltung (*Ralstonia sp.*). Eine Vielzahl von mono-, di- und trihydroxylierten Biphenylen bzw. Dibenzofuranen konnte als Zwischen-, Neben- oder Endprodukt der jeweiligen Inkubationsexperimente identifiziert werden (siehe Abbildung 6.1).

Die in den Experimenten mit *Debaryomyces vanrijae*, *Trichosporon mucoides* und *Paecilomyces lilacinus* gefundenen Pyroncarbonsäuren (**133**, **127**, **142**, **143**) repräsentieren einen neuen Strukturtyp von Metaboliten des mikrobiellen Abbaus von Biphenyl. Für *Trichosporon mucoides* konnte mit der Identifizierung des Endproduktes auch erstmals für Pilze die Metabolisierung von Dibenzofuran unter Spaltung eines Phenylrings beschrieben werden. Der Abbau von Dibenzofuran durch das Bakterium *Ralstonia sp.* zeigte eine ungewöhnliche Öffnung des Moleküls (1-9b) im Gegensatz zur sonst beobachteten Spaltung der Etherbindung des Furanringes (4-4a). Das Ringspaltungsprodukt (**145**) konnte durch aufwendige Derivatisierungs- und NMR-Versuche charakterisiert werden.

Die Untersuchungen des Abbaus substituierter Imidazole mit Zellen oder Laccase von *Trametes versicolor* zeigten die Eignung mikrobieller Methoden zur Synthese interessanter und anderweitig schwer zugänglicher Verbindungen. Die Strukturaufklärung der Produkte erbrachte zwei neue substituierte Imidazole und ein Dimerisierungsprodukt aus der Ringöffnung des eingesetzten Substrats.

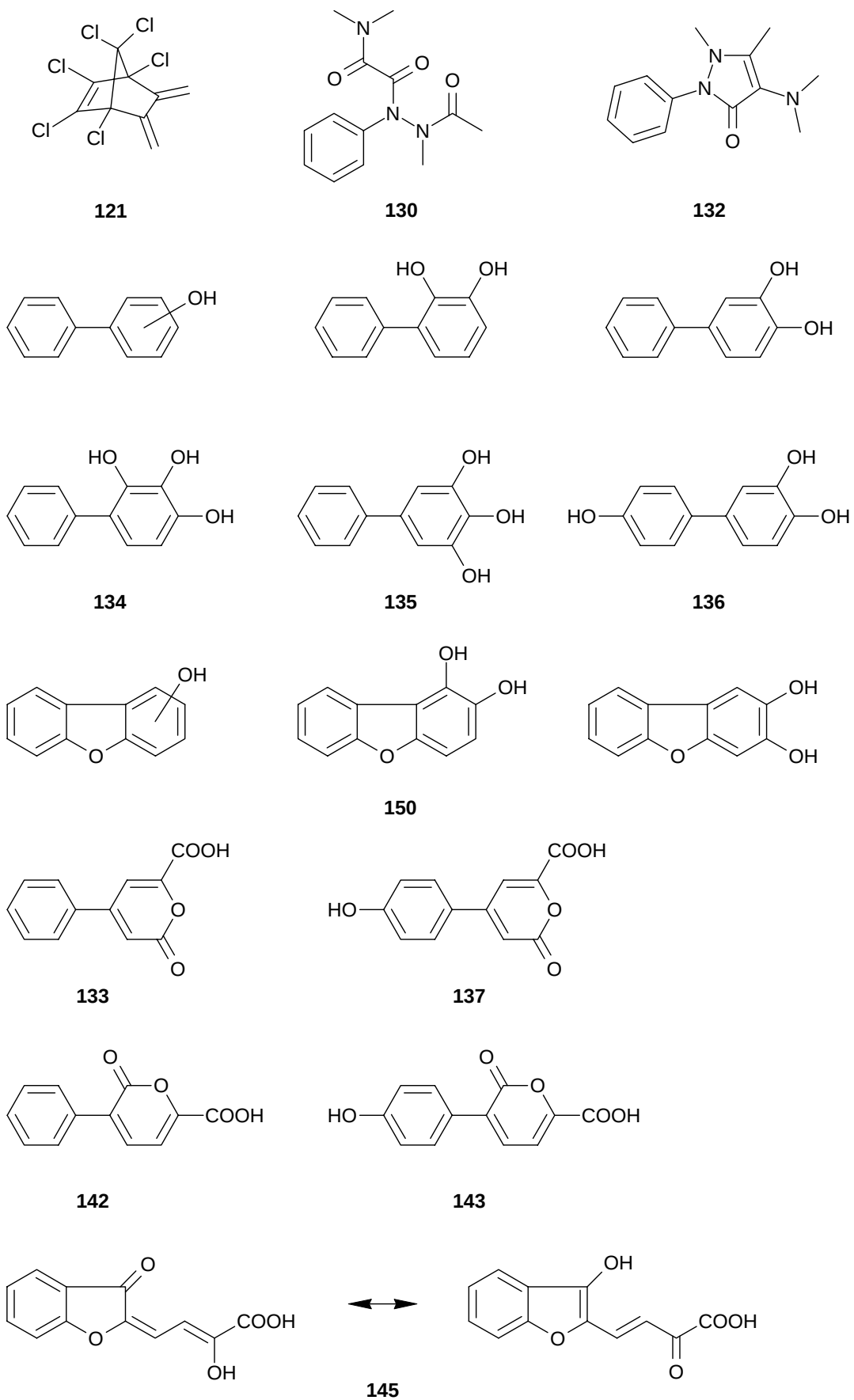


Abb. 6.1 Strukturen identifizierter Verbindungen

6.1 Summary

Results of an extensive non-target-screening along the Odra river and some confluents underline the importance of a routine monitoring related to marker substances represented by organic pollutants and show the urgent need of suitable measurements to minimize or prevent anthropogenic immissions to the Odra river system.

Especially two regions along the Odra river show contamination with anthropogenic substances either known as widely distributed in the environment or of local origin, partially in very high concentrations. These regions of interest are the catchment area of the tributary Strzegomka and near the town of Brzeg Dolny. The Strzegomka is highly polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons PAH and, therefore, contributes a large part to the load of PAH in the entire Odra system. A plethora of synthetic compounds from different industrial processes was detected here. Of high concern is the occurrence of benzothiazoles, commonly used as vulcanization accelerators, in these parts of the Odra. Pesticides and PCB were found sporadically in low amounts and seem not to be a prominent risk factor.

In these investigations, marker substances were used for detecting contamination, helping to identify and describe emission sources and interpret the research data. Suitable markers were faecal steroids, phenylalkanes, alkylphenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated compounds as Triclosan, as well as synthetic fragrances. The marker substances for municipal waste show a strong correlation with the density of population in the area. Municipal sewage and immissions from burning coal and other fuels (industry, traffic and households) are main sources of the anthropogenic load of the Odra.

Furthermore, in a river sediment flushed out on a nearby field during the extreme flood a hitherto unknown metabolite of Endosulfane was identified (**121**). The environmental relevance of this substance has to be examined closer. Also, the structure of an interesting compound found in the river Elbe and close groundwater reservoirs, could be elucidated: 2-(2-acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazino)-N,N-dimethyl-2-oxoacetamide (**130**) is highly soluble in water and therefore easily distributed through water systems. It seems to be a metabolite of 4-dimethyl-aminoantipyrine (**132**).

In addition, comprehensive studies on the metabolism of biphenyl, dibenzofuran and imidazole derivatives in microorganisms were subject of this thesis. 53 metabolites (32 different substances) were identified by using of MS- and GC/MS-, as well as one and two dimensional NMR experiments. Seven metabolites were synthesized to verify proposed structures and used as reference substances. The results provide additional insights into the initial steps of the metabolism of aromatic compounds through oxygenation and hydroxylation and show new results in the degradation of biphenyl and dibenzofuran of the selected organisms. In all examined species ring fission occurs through multiple hydroxylation steps followed by *ortho*- (Fungi/Yeasts) or *meta*- cleavage (*Ralstonia sp.*). A multitude of mono-, di- or tri- hydroxybiphenyls and dibenzofurans were identified as intermediates, side or end products (see Figure 6.1).

The pyrone carboxylic acids identified in the experiments with *Debaryomyces vanriijiae*, *Trichosporon mucoides* and *Paecilomyces lilacinus* represent a new type of structure for metabolites of the microbial degradation of biphenyl (**133**, **137**, **142**, **143**). Studies on *Trichosporon mucoides* resulted in the first description of the metabolic degradation of an aromatic structure for dibenzofuran by fungi. Furthermore, the fission of dibenzofuran by the bacteria *Ralstonia sp.* showed an unusual, new cleavage of the benzene ring at position 1-9b in contrast to the otherwise observed fission of the furane structure (4-4a). The ring fission product (**145**) was characterized by extensive work using derivatization reactions and NMR-experiments.

The degradation of substituted imidazoles with cells and laccase from *Trametes versicolor* showed the applicability of microbial methods to synthesise substances of interest and compounds that are otherwise difficult to obtain. Structural characterization revealed two new substituted imidazoles and a dimeric product through ring fission of the substrate.

7 Literatur

- [1] B.J. Alloway und D.C. Ayres, *Schadstoffe in der Umwelt*, **1996**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- [2] K. Hansmann, *Bundes-Immisionsschutzgesetz und ergänzende Vorschriften*, **1992**, Nomos Verlag, Baden-Baden
- [3] Umweltbundesamt, *Daten zur Umwelt*, **1992**, E. Schmidt Verlag, Berlin
- [4] R. Koch, *Umweltchemikalien: physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz und Richtwerte, Umweltverhalten*, **1995**, VCH, Weinheim
- [5] R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano und G. Matz, *Treatment of Contaminated Soil - Fundamentals Analysis Applications*, **2001**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- [6] R.M. Atlas, *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*, Microbiol. Rev. **1981**, 45(1), 180-209
- [7] D.T. Gibson, *Microbial Degradation of Organic Compounds*, **1984**, Marcel Dekker, New York
- [8] T. Leisinger, *Bioremediation: Superbakterien und natürliche Attenuation*, in *Terratech - Sonderdruck Bioremediation*, **1997**, Vereinigte Fachverlage, Mainz
- [9] D.H. Pieper und K.N. Timmis, *Vom Xenobiotikum zum Antibiotikum: Ein grundlegendes ökotoxologisches Problem beim Abbau von Chloraromaten und dessen Lösung durch genetisches Design*, **1996**, GBF, Braunschweig
- [10] V. Koß, *Umweltchemie: Eine Einführung für Studium und Praxis*, **1997**, Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- [11] F. Pocchiari, A. Di Domenico und V. Silano, *Environmental Impact of the Accidental Release of Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) at Seveso (Italy)*, in *Accidental Exposure to Dioxins*, F. Coulston und F. Pocchiari, Editoren, **1983**, Academic Press, New York
- [12] R.-M. Wittich, *Biodegradation of dioxins and furans*, ed. R.-M. Wittich, **1998**, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- [13] Diverse, *Oder Auen Atlas*, , **2000**, WWF-Auen-Institut

- [14] Diverse, *Sofortprogramm der Internationalen Kommission zum Schutz der Oder gegen Verunreinigungen 1997-2002, Arbeitsgruppe 1*, in IKSO, **1999**, Wrocław
- [15] C. Diercke, *Weltatlas*, **1970**, Westermann, Braunschweig
- [16] M. Mürlebach, *Oberflächenabfluss Januar - Dezember 1999 (Ems, Elbe, Rhein, Weser, Oder)*, **1999**, BFG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz
- [17] J.C. Chojnacki, *Description of Ecosystem of the Lower Odra and the Odra Estuary*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 257-267
- [18] D. Meier, *Die Oder - Festschrift zum 250 jährigen Bestehen des Wasser und Schiffsamtes in Eberswalde*, **1997**, Wasser und Schiffsamt Eberswalde
- [19] D. Kujajewski, *Vergleichende Untersuchungen zu den Ursachen und Auswirkungen des Saalehochwassers im April 1994 und des Oderhochwassers im Juli/August 1997*, Examensarbeit, **1999**, Universität Halle Wittenberg
- [20] A. Schmidt, *Morphological Investigations in the River Odra*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 268-273
- [21] T. Fuchs und J. Rapp, *Zwei außergewöhnlich starke Regenepisoden als Ursache des Oderhochwassers im Juli 1997*, **1997**, DWD Deutscher Wetterdienst
- [22] S. Herath, *Oder River Floods 1997*, INCEDE Newsletter **1998**, 7(1)
- [23] E. Niemirycz, *The Pollution Load from the River Odra in Comparison to That in Other Polish Rivers in 1988-1997*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 286-291
- [24] A. Müller und M. Wessels, *The Flood in the Odra River 1997 - Impact of Suspended Solids on Water Quality*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 316-320
- [25] H. Damke, K.-H. Henning, J. Lehmann, J. Kasbohm und T. Puff, *Phase Composition of Flood Sediments of the German-Polish Odra River Immediately after the Flood Event in 1997*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 357-363
- [26] Statistik-Austria, *Statistisches Jahrbuch Österreichs 2001*, **2000**, Statistik Austria, Wien

- [27] M. Prostasowicki, E. Niedzwiecki, W. Cierieszko, A. Perkowska und E. Meller, *The Comparison of Sediment Contamination in the Area of Estuary and the Lower Course of the Odra before and After the Flood of Summer 1997*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 338-342
- [28] R. Taylor, T. Bogacka, E. Niemirycz, A. Zelechowa, M. Balcereska, E. Korzec, Z. Makowski, R. Geglarski, J. Rybinski, I. Zebrowska, *Chlororganische Pestizide und PCB in Oberflächenwasser und Schwebstoffen von Flüssen in Polen*, in *Schadstoffatlas Osteuropa*, E. Heinisch, A. Kettrup und S. Wenzel-Klein, Editoren, **1994**, Ecomed Verlag, Landsberg/Lech
- [29] C. Meyer, *Screening, Identifizierung und enantioselektive Analytik organischer Substanzen in Oberflächengewässern*, Dissertation, Universität Hamburg, **2001**
- [30] D. Dannenberger und A. Lerz, *Occurrence and Transport of Organic Microcontaminants in Sediments of the Odra River Estuarine System*, Acta Hydrochim. Hydrobiol. **1999**, 27(5), 303-307
- [31] A. Müller und M. Wessels, in: *The International Odra Project, 2. Interim Report, Annual report*, **1998**
- [32] N. Heinzl, *Screening, Identifizierung und quantitative Analytik organischer Substanzen in aquatischen Kompartimenten*, Dissertation, Universität Hamburg, **2006**
- [33] J.J. Langendfield, S.B. Hawthorne, D.J. Miller und P. J., *Effects of Temperature and Pressure on Supercritical Fluid Extraction Efficiencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls*, Anal. Chem. **1993**, 65, 338-344
- [34] L.J. Mulcahey, C.L. Rankin und M.E.P. McNally, *SFE*, in *Advances in Chromatography*, P.R. Brown und E. Grushka, Editoren, **1994**, Marcel Dekker Inc., New York
- [35] A. Kreisselmeier und H.-W. Dürbeck, *Determination of alkylphenols and linear alkylbenzene sulfonates in sediments applying accelerated solvent extraction (ASE)*, Fresenius J. Anal. Chem. **1996**, 354, 921-924
- [36] Y. Yang, S. Bowadt, S.B. Hawthorne und D.J. Miller, *Subcritical water extraction of polychlorinated biphenyls from soil and sediment*, Anal. Chem. **1995**, 67, 4571-4576

- [37] N. Paaso, J. Peuravuori und K. Pihlaja, *Extraction efficiency of chloroethenes from contaminated dry cleaner's sludge with three different methods*, Waste Management **2000**, 20, 69-74
- [38] I. Silgoner, R. Krska, E. Lombas, O. Gans, E. Rosenberg und M. Grasserbauer, *Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from sediments and its application to contaminated sediment samples*, Fresenius J. Anal. Chem. **1998**, 362, 120-124
- [39] US EPA, *Test Methods for Evaluating Solid Waste (SW-846) - Ultrasonic Extraction (Method 3550B)*, **1996**, United States Environmental Protection Agency - Office of Solid Waste, Washington DC
- [40] A.M. Cicero, E. Pietrantonio, G. Romanelli und A. Di Muccio, *Comparison of Soxhlet, Shaking, and Microwave Assisted Extraction Techniques for Determination of PCB Congeners in a Marine Sediment*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. **2000**, 65, 307-313
- [41] T.H. Dao, T.L. Lavy und J. Dragun, *Rationale of the Solvent Selection for Soil Extraction of Pesticide Residues*, Residue Rev. **1983**, 87, 91-104
- [42] J.R. Dean und G. Xiong, *Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique*, Trends in Analytical Chemistry **2000**, 19(9), 553-564
- [43] S.B. Hawthorne, C.B. Grabanski, E. Martin und D.J. Miller, *Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix*, Journal of Chromatography A **2000**, 892(1-2), 421-433
- [44] M. Mannila, J. Koistinen und T. Vartiainen, *Comparison of SFE with Soxhlet and Ultrasonic Extractions for the Determination of PCDD/PCDF in Soil Samples*, Organohalogen Compounds **1999**, 40, 197-200
- [45] A.E. Smith und L.J. Milward, *Comparison of Solvent Systems for the Extraction of Diclofop Acid, Picloram, Simazine and Triallate from Weathered Field Soils*, J. Agric. Food Chem. **1983**, 31, 633-637
- [46] E. Vázquez Blanco, P. López Mahia, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodríguez und E. Fernández Fernández, *Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method*, Fresenius J. Anal. Chem. **2000**, 366, 283-288

- [47] J. Schwarzbauer, *Screening, Identifizierung und quantitative Analyse organischer Substanzen in Sediment und Schwebstoff des Elbesystems*, Dissertation, Universität Hamburg, **1997**
- [48] J. Vogelsang, K. Kypke-Hutter, R. Malisch, P. Binnemann und W. Dietz, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1986**, 182, 471-474
- [49] FuHH, *Gewässergütebericht Hamburg 1999*, in *Hamburger Umweltberichte 59/2000*, **2000**, Umweltbehörde Amt für Umweltschutz - Umweltuntersuchungen - Abt. Wasseruntersuchungen, Hamburg
- [50] K. Beyermann, *Organische Spurenanalyse*, Analytische Chemie für die Praxis, ed. H. Hulpke, H. Hartkamp und G. Tölg, **1982**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [51] H. Steinhart, T. Käcker, S. Meyer und G. Biernoth, *Chemical Analysis of Contaminated Soils - How much Analytical Work Do we Need?*, in *Treatment of Contaminated Soil*, R. Stegmann, Editor, **2001**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- [52] W. Specht und M. Tillkes, *Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie*, 5. Mitteilung, *Z. Anal. Chem.* **1985**, 322, 443--455
- [53] W. Specht, S. Pelz und W. Gilsbach, *Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography - 6. Communication: Replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 353, 183-190
- [54] H.-P. Thier und H. Frehse, *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Analytische Chemie für die Praxis, ed. H. Hulpke, H. Hartkamp und G. Tölg, **1986**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [55] G.A. Eiceman, H.H. Hill und J. Gardea-Torresday, *Gas Chromatography*, *Anal. Chem.* **2000**, 72(12), 137-144
- [56] H.H. Hill und D.G. McMinn, *Detectors for Capillary Chromatography*, Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, ed. H.H. Hill und D.G. McMinn, Vol. 121, **1992**, John Wiley & Sons, New York

- [57] M. Dressler, *Selective Gas Chromatographic Detectors*, **1986**, Elsevier Science Ltd, New York
- [58] Sadtler Research Laboratories, *The Sadtler Standard Gas Chromatography Retention Index Library*, **1986**, Bio-Rad Laboratories, Sadtler Division, 3316 Spring Garden Street, Philadelphia PA 19104-2596 U.S.A., Philadelphia
- [59] R.A. de Zeeuw, J.P. Franke, H.H. Maurer und K. Pflieger, *Gas Chromatographic Retention Indices of Toxicologically Relevant Substances*, 3 ed, ed. D.F. (DFG), **1992**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- [60] F.R. Gonzalezaa und A.M. Nardilloa, *Retention index in temperature-programmed gas chromatography*, *J. Chromatography* **1999**, 842(1-2), 29-49
- [61] K. Pflieger, H.H. Maurer und A. Weber, *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites*, 2nd ed, **1992**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- [62] F.W. McLafferty und F. Turecek , *Interpretation von Massenspektren*, 4th ed., **1995**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [63] MS Datenbank: MassLib 8.5 C (1997), Max Planck Institut f. Kohleforschung, Mülheim (including NIST/EPA/NIH Mass Spectral Data Base, US Dept. of Commerce; Wiley Registry of Mass Spectral Data, John Wiley & Sons Inc.; Chemical Concepts Mass Spectral Data Base, Chemical Concepts GmbH)
- [64] F.W. McLafferty und D.B. Stauffer, *Important Peak Index of the Registry of Mass Spectral Data*, **1991**, Wiley-Interscience, New York
- [65] F.W. McLafferty und D.B. Stauffer, *The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data*, **1989**, Wiley-Interscience, New York
- [66] M. Link, *Identifizierung polycyclischer aromatischer Verbindungen in Sedimenten und Ölen*, Dissertation, Universität Hamburg, **1997**
- [67] A. Hollerbach, *Grundlagen der organischen Geochemie*, **1985**, Springer Verlag, Berlin
- [68] H. Umweltbundesamt, *Umweltsituation in der Region der Odermündung*, **1993**, Umweltbundesamt, Berlin

- [69] M. Feilbach, *Entwurf eines Integrierten Küstenzonenmanagementplans für die Odermündung*, **2004**, Institut für Geographie, Universität Greifswald
- [70] R. Renner, *European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate*, Sci. Technol. **1997**, 7, 316A-320A
- [71] P.H. Brunner, W. Giger, Ch. Schaffner, *4-Nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants*, Science **1984**, 225, 623-625
- [72] K. Yoshimura, *Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants*, J. Am. Oil Chemists Soc. **1986**, 63, 1590-1596
- [73] A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray und C. Sonnenschein, *p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene*, Environ. Health Perspect. **1991**, 92, 167-173
- [74] Bundesgesetzblatt, *Anhang IV Herstellungs- und Verwendungsverbote*, GefStoffV **2004**
- [75] A.M. Warhurst, *An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols*, in *Friends of Earth*, London N1 7JQ, **1995**
- [76] T.F. Wheeler, J.R. Heim, M.R. LaTorre und A.B. Janes, *Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS*, J. Chromatogr. Sci. **1997**, 35(January), 19-30
- [77] M. Specht, *Eigene Messung*
- [78] H. Maki, M. Fujita und Y. Fujiwara, *Identification of Final Biodegradation Product of Nonylphenol Ethoxylate (NPE) by River Microbial Consortia*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. **1996**, 57, 881-887
- [79] M.A. Manzano, J.A. Perales, D. Sales und J.M. Quiroga, *Effect of Concentration on the Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate in River Water*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. **1998**, 61, 489-496
- [80] M. Ahel, F.E. Scully, J. Hoigné und W. Giger, *Photochemical Degradation of Nonylphenol and Nonylphenol Polyethoxylates in Natural Waters*, Chemosphere **1994**, 28, 1361-1368
- [81] M. Ahel, W. Giger und M. Koch, *Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment – I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment.*, Water Res. **1994**, 28, 1131-1142

- [82] D.T. Bennie, S.C. A., H.B. Lee und M.R. J., *Alkylphenol Polyethoxylate Metabolites in Canadian Sewage Treatment Plant Waste Streams*, Water Quality Research Journal of Canada **1998**, 33(2), 231-252
- [83] T.P. Knepper, D. Barcelo, H.F. Schröder, P. de Voogt, A. Gomez-Para, F. Ventura, A. Moreno und J. Blasco, *Priority Surfactants and their toxic Metabolites in Waste Effluent Discharges: an integrated Study (PRISTINE)*, in Annual Congress GDCh Surfactant Chemistry, **1999**, Würzburg
- [84] P. Hohenblum, R. Sattelberger und S. Scharf, *Abwasser- und Klärschlammuntersuchungen in der Pilotkläranlage Entsorgungsbetriebe Simmering (EbS) - Zusammenfassung*, **2000**, Umweltbundesamt Österreich, Wien
- [85] E.J. Routledge und J.P. Sumpter, *Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated with Estrogenic Activity*, J. Biol. Chem. **1997**, 272(6), 3280-3288
- [86] P.T. Harrison, H. P. und C.D. Humfrey, *Preproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?*, Sci. Total Environ. **1997**, 205(2-3), 97-106
- [87] R.E. Chapin und R.A. Sloane, *Reproductive Assessment by Continuous Breeding: Evolving Study Design and Summaries of Ninety Studies*, Environ. Health Perspect. **1997**, 105(1), 199-395
- [88] K. Kinnberg, B. Korsgaard, P. Njerregaard und A. Jespersen, *Effects of nonylphenol and 17(beta)-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus**, J. Exp. Biol. **2000**, 203(2), 171-181
- [89] M. Gangl, R. Sattelberger, S. Scharf und N. Kreuzinger, *Hormonell wirksame Substanzen in Klärschlämmen*, **2001**, Umweltbundesamt Österreich, Wien
- [90] R. Lewis, *Sax's dangerous properties of industrial materials*, 8ed. ed, ed. N. Sax, **1994**, Van Nostrand, New York
- [91] R.D. Swisher, *Surfactant Biodegradation*, 2nd Ed. ed, **1987**, Marcel Dekker, New York
- [92] HERA, *Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products - Linear Alkylbenzenesulfonate, LAS*, , **2002**, Human and Environmental Risk Assessments on ingredients of household cleaning products, Brüssel

- [93] OECD, *SIDS Initial Assessment Report: BENZENE, C10-C16 ALKYL DERIVATIVES*, , **1995**, OECD, Williamsburg
- [94] ARGE Elbe, *Synthetische Moschus-Duftstoffe in der Elbe*, **2000**, Wassergütestelle Elbe, Hamburg
- [95] F. Balk und R.A. Ford, *Environmental Risk Assessment for the Polycyclic Musks AHTN and HHCB in the EU. Part I. Fate and exposure assessment.*, Toxicology Letters **1999**, 111, 57-79.
- [96] OSPAR, *OSPAR Background Document on Musk Xylene and other Musks*, **2000**, OSPAR Comission for the protection of the marine environment of the north east atlantic, London
- [97] R. Gatermann, *Verteilung, Anreicherung und Transformation nitroaromatischer und polycyclischer Moschusduftstoffe sowie weiterer N- und P- haltiger Problemstoffe in der Umwelt*, Dissertation, **1998**, Universität Hamburg, Hamburg
- [98] H.-D. Eschke, H.-J. Dibowski und J. Traud, *Nachweis und Quantifizierung von polycyclischen Moschus-Duftstoffen mittels ion-trap GC/MS in Humanfett und Muttermilch*, Deut. Lebensm. Rundsch. **1995**, 12, 375-379
- [99] G. Ohloff, *Riechstoffe und Geruchssinn. Die molekulare Welt der Düfte*, **1990**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- [100] F. Balk und R.A. Ford, *Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB. II. Effect assessment and risk characterisation*, Toxicology Letters **1999**, 111(1-2), 81-94
- [101] T. Kupper, J.-D. Berset, R. Etter-Holzer und J. Tarradellas, *Verhalten von polyzyklischen Moschus-Verbindungen während der Abwasserreinigung (I)*, **2003**, ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE
- [102] Umweltbundesamt, *Ermittlung der Quellen für die prioritären Stoffe nach Artikel 16 der Wasserrahmenrichtlinie und Abschätzung ihrer Eintragsmengen in die Gewässer in Deutschland - Kurzfassung -*, **2002**, Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Karlsruhe

- [103] C.-E. Boström, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernström, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannug, M. Törnqvist, K. Victorin, and R. Westerholm, *Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air*, Swedish Environmental Protection Agency, **2002**, Stockholm
- [104] M. Kästner, B. Mahro und R. Wienberg, *Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe*, **1994**, Economica Verlag, Bonn
- [105] ATSDR, *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, **1995**, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta
- [106] *Ambient Air Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Position Paper*, **2001**, European Communities - Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Luxembourg
- [107] J.M. Neff, *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, **1979**, Applied Science Publishers Ltd., London
- [108] ICON, *Pollutants in urban waste water and sewage sludge*, **2001**, European Commission - Directorate-General Environment, London
- [109] UMEG, Environmental Inventories and Product Safety, *Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural Use*, **2001**, European Commission Joint Research Centre - Institute for Environment and Sustainability Soil and Waste Unit, Luxembourg
- [110] NTP, *10th Report on Carcinogens*, **2002**, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program
- [111] R.A. Faust, *Toxicity Summary for Benzo[a]pyrene*, , **1994**, OAK Ridge Reservation Environmental Restoration Program, Oak Ridge
- [112] Umweltbehörde Hamburg, *Berichte über die Untersuchung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in hamburgischen Gewässern - Hamburger Umweltberichte 42/93*, **1993**, Umweltbehörde Hamburg
- [113] IOP, *Die Belastung der Oder - Ergebnisse des Internationalen Oderprojekts (IOP)*, Ergebnisbericht, **2002**, Universität Hamburg
- [114] W.F. Rogge, L.M. Hildemann, M.A. Mazurek und G.R. Cass, *Sources of Fine Organic Aerosol. 8. Boilers Burning No. 2 Distillate Fuel Oil*, Environ. Sci. Technol. **1997**, 31, 2731-2737

- [115] S. Meyer, *Mikrobieller Abbau typischer Teeröl-PAK und Hetero-PAK (N,S,O) in einem Modellbodenhorizont*, Dissertation, Universität Hamburg, **1999**
- [116] S. Franke, *Gaschromatographische und Massenspektrometrische Analyse organischer Substanzen in Elb-, Spülfeld- und Grundwasser*, Dissertation, Universität Hamburg, **1990**
- [117] S. Franke, S. Hildebrand und W. Francke, *The occurrence of chlorinated bis-(propyl)ethers in the Elbe river and tributaries*, Naturwissenschaften **1995**, 82, 80-83
- [118] Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, *Dioxinähnliche PCB in der Umwelt - Quelle, Verbleib, Exposition und gesundheitliche Bewertung*, **2003**, Augsburg
- [119] H. Marquardt und S.G. Schäfer, *Lehrbuch der Toxikologie*, **1994**, Wissenschaftsverlag Mannheim, Mannheim
- [120] L.B.M. Ellis, B.K. Hou, W. Kang und L. P.Wackett, *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database:post-genomic data mining*, Nucleic Acids Res. **2003**, 31(1), 262-265
- [121] US EPA, *Ambient Water Quality Criteria for Hexachlorocyclohexane*, **1980**, United States Environmental Protection Agency, Washington
- [122] L.M. McMurtry, M. Oethinger und S.B. Levy, *Over-expression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters **1998**, 166(2), 305–309.
- [123] Beilstein Crossfire, *Chemical Facts Database*, Elsevier MDL, Amsterdam/London
- [124] H.-J. Duchstein, G. Ruch-Zaske, G. Holzmann, E. Wollenberg und H. Weber, *Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit 4-Amino-3-pyrazolin-5-onen*, Arch. Pharm. **1988**, 321, 25-27
- [125] B. Marciniak, *Photochemical Decomposition of Phenazone Derivatives - Part 5: Isolation and Identification of Decomposition Products in Aqueous Solution*, Pharmazie **1985**, 40, 30-33

- [126] J.C. Wessel, *Erstmaliger Nachweis von Oxalsäurederivaten bei der Biotransformation von Metamizol im bebrüteten Hühnerei und beim Menschen*, Dissertation, Universität Düsseldorf, **2004**
- [127] K. Reddersen, T. Heberer und U. Dunnbier, *Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water.*, Chemosphere **2002**, 49(6), 539-44.
- [128] H. Kessler, *Nachweis gehinderter Rotationen und Inversionen durch NMR-Spektroskopie*, Angew. Chem. **1970**, 82(6), 237-253
- [129] R.V. Smith, J.P. Rosazza, *Microbial Models of mammalian Metabolism*, Arch. Biochem. Biophys. **1974**, 161, 551-558
- [130] M. Rey, E. Dunkelblum, R. Allain und A.S. Dreiding, *Synthese von 2-Pyronen aus α,β -ungesättigten Säurechloriden und tertiären Aminen*, Helv. Chim. Acta **1970**, 53(8), 2159-2175
- [131]: J.M. Bruce und F.K. Sutcliffe, *Synthetic and Oxidative Studies in the Polyhydroxydiphenyl Series Part I*, J. Chem. Soc. **1955**, 4435-4440
 S. Andersson, *An Improvement of the Aluminium Iodide Method for Ether Cleavage: Catalysis by Quaternary Ammonium Iodides*, Synthesis **1985**, April, 437-439
 L. Horner und K.-H. Weber, *Darstellungen und Eigenschaften weiterer Chinone des Biphenyls*, Chem. Ber. **1967**, 100, 2842-2853
 H. Musso und H. Pietsch, *Zur Struktur von 3,3'-Dihydroxy-Diphenochinonen*, Chem. Ber. **1967**, 100, 2854-2869
 H. Erdtman, G. Eriksson, T. Norin und S. Forsen, *Aucuparin and Methoxyaucuparin, Two Phenolic Biphenyl Derivatives from the Heartwood of Sorbus aucuparia (L.)*, Acta Chem. Scand. **1963**, 17, 1151-1156
- [132] H. Javaheripour, D.C. Neckers, *Solid Phase and solution photochemistry of coumalate esters*, J. Org. Chem. **1977**, 42, 1844-1851
- [133]. M. Tashiro, H. Yoshiya und G. Fukata, *Selective Preparation. 37. Bromination of 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-tert-butylbiphenyl and Preparation of Hydroxydibenzofurans*, J. Org. Chem. **1982**, 47, 4425-4429
 M. Tashiro, H. Yoshiya und G. Fukata, *A convenient Preparation of 2-Hydroxydibenzofuran from 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-tert-butylbiphenyl in two Steps*, Heterocycles **1980**, 14(12), 1955-1958

- [134] E. Srebotnik, K. E. Hammel, *Degradation of nonphenolic lignin by the laccase: 1-hydroxybenzotriazole system*, J. Biotechnol. **2000**, 81, 179–188
- [135] I.D. Reid, *Fate of Residual Lignin during Delignification of Kraft Pulp by Trametes versicolor*, Appl. Environ. Microbiol. **1998**, 64(6), 2117-2125
- [136] A.M. Mayer, R.C. Staples., *Laccase: new functions for an old enzyme.*, Phytochemistry **2002** 60(6), 551-65.

Anhang A

Tabellen von in Odersedimenten identifizierten Verbindungen

Folgende Tabellen (3.9-3.12) zeigen in Odersedimenten nachgewiesene organische Verbindungen. Die Substanzen sind zusammengefasst in Gruppen entsprechend ihres Kontextes in der Umwelt oder ihrer Struktur. Eine Sortierung innerhalb der Gruppe erfolgte weitgehend nach der Retentionszeit unter den angewandten gaschromatographischen Bedingungen. Die Bewertung der Mengen erfolgte aufgrund des Vergleiches mit internen Standards. Hierbei bedeuten o: keine gesicherte Identifizierung, +: in Spuren nachweisbar, ++ - ++++: geringe bis sehr hohe Konzentration; n.v. bedeutet, dass für diese Substanzen die entsprechende Probe nicht verfügbar oder für die Auswertung ungeeignet war.

Tabelle 3.9: Probenkampagne 1997

Tabelle 3.10: weitere Probenkampagnen

Tabelle 3.11: Vergleich 1997-1999

Tabelle 3.12: ausgetragene Sedimente 1997

Tabelle 3.9**Verbindung**

	F1 1997	F2 1997	F3 1997	N1 1997	F4 1997	F4U 1997	F4F 1997	N2 1997	F5 1997	F5F 1997	F6 1997	F7 1997	F7U 1997	F7F 1997	F8 1997	F8U 1997
Aliph. Kohlenwasserstoffe																
<i>n</i> -Decan bis <i>n</i> -Tetatriacontan	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++
Aliph. Aldehyde und Ketone																
<i>n</i> -Octanal bis <i>n</i> -Dotriacontanal	0	0	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++	+++	++	+++
<i>n</i> -Octan-2-on bis <i>n</i> -Octacosan-2-on	0	0	+	+	++	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	++
Carbonsäuren																
<i>n</i> -Decan- bis <i>n</i> -Dotriacontansäure	+	+++	++	++	+++	++	+	++	++	++	++	++	++	+++	++	++
Palmitoleinsäure	0	+	+	0	++	++	+	0	+++	++	+	+	+	+++	++	0
Ölsäure	0	++	+	+	++	++	+	+	+++	+++	++	++	+	++	++	++
Linolsäure	0	++	0	0	++	+	+	+	++	++	+	+	+	++	++	++
Linolensäure	0	0	0	0	+	0	0	0	+	++	+	+	+	++	+	+
<i>iso</i> -Pentadecansäure	0	++	+	+	+++	++	+	0	+++	++	++	+	++	++	++	++
<i>anteiso</i> -Pentadecansäure	0	++	+	+	+++	++	+	0	+++	++	++	+	++	++	++	++
<i>iso</i> -Hexadecansäure	0	+	0	+	+	+	+	0	++	++	+	+	+	++	+	0
<i>anteiso</i> -Hexadecansäure	0	++	0	+	++	0	0	0	+	+	+	0	+	++	0	0
<i>iso</i> -Heptadecansäure	0	++	0	+	++	++	+	+	++	++	+	+	+	++	++	0
<i>anteiso</i> -Heptadecansäure	0	+	0	0	0	0	0	0	+	++	0	0	0	0	+	0
<i>iso</i> -Octadecansäure	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>anteiso</i> -Octadecansäure	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>iso</i> -Nonadecansäure	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0
<i>anteiso</i> -Nonadecansäure	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0
<i>iso</i> -Eicosansäure	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0
<i>anteiso</i> -Eicosansäure	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0
<i>iso</i> -Heneicosansäure	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0
<i>anteiso</i> -Heneicosansäure	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0
Terpenoide																
Pristan	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+++	+	+	++	0
Phytan	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0
Phytan	+	++	++	+	++	++	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	0
Phytadien	0	0	++	++	0	0	0	0	+	+	+	++	+	+	+	0
Abietinsäure	0	+	n.v.	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	0	++	0
Dehydroabietinsäure	0	++	n.v.	+	++	++	++	++	++	+	++	+	++	0	+++	++
Tetrahydroabietinsäure	0	+	n.v.	+	++	++	+	+	++	+	+	+	+	0	++	0
Dehydroabietin	0	+	++	++	++	++	++	0	++	++	++	++	++	0	+	++
Tetrahydroreten	0	+	++	++	+	++	+	0	++	++	+	++	++	+	+	+
Reten	0	+	++	++	+	+	+	0	++	++	+	++	++	+	+	+
Dehydroabietan	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	++
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on	0	++	+	+	++	+	+	0	0	+++	++	++	+	+	++	++

Tabelle 3.9

Verbindung

	F1	F2	F3	N1	F4	F4U	F4F	N2	F5	F5F	F6	F7	F7U	F7F	F8	F8U
	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Squalen	0	+++	+++	+	+++	++	0	++	++	++	++	+++	+	+	++	0
Cholesterin	0	0	n.v.	++	+++	+++	+++	0	+	+++	+++	++	++	+++	+++	0
5 α H-Cholestan-3 β -ol	0	0	n.v.	++	++	++	++	0	0	+	+	++	+	+	+++	0
5 β H-Cholestan-3 β -ol	0	0	n.v.	+++	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	++	+	+	+	0
5 α H-Cholestanon	0	0	++	+	++	++	++	0	0	+	+	++	+	+	0	0
5 β H-Cholestanon	0	0	++	+++	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	++	+	+	+	0
5 α H-Ergostan-3 β -ol	0	0	n.v.	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	++	0
5 β H-Ergostan-3 β -ol	0	0	n.v.	+	+++	++	+	0	0	+++	++	+	+	+	+	0
5 α H-Ergostanon	0	0	++	+	++	++	++	0	0	++	++	+	+	+	0	0
5 β H-Ergostanon	0	0	++	++	++	++	++	0	0	++	++	+	+	+	0	0
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	0	0	n.v.	+	+++	++	++	0	0	++	++	++	+	+	+++	0
5 α H-Stigmastanon	0	0	++	++	++	+	+	0	0	+	+	++	++	++	+	0
5 β H-Stigmastanon	0	0	++	++	++	++	++	0	0	++	++	++	+	+	0	0
Stigmasten-3 β -ol	0	0	n.v.	+++	+++	+++	++	0	+	+++	+++	++	+++	+++	++	0

Alkylbenzole

Xylol	0	+	++	+	+	0	0	++	++	++	++	+	0	0	+	+
Ethylbenzol	0	+	++	+	+	0	0	+	++	++	+	+	0	0	+	+
Propylbenzol	0	+	+	+	+	0	0	+	++	++	+	+	+	0	+	+
Ethylmethylbenzol	0	+	+	+	+	0	0	+	++	++	+	+	+	+	+	+
Trimethylbenzole	0	++	++	+	++	+	+	+	+++	++	++	+	++	+	+	+
Diethylbenzole	0	+	+	+	+	0	0	+	++	++	+	+	+	+	++	0
Methylpropylbenzole	0	+	++	0	+	0	0	+	++	++	+	+	+	+	+	0
Ethylidimethylbenzole	0	+	+	+	++	+	0	+	++	++	+	+	+	+	+	0
Tetramethylbenzole	0	+	+	+	+	0	0	+	++	++	+	+	+	0	+	0
C5-Benzole	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0
C6-Benzole	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Phenylalkane

2-,3-,4-,5-Phenyldecane	0	++	++	++	++	+	+	0	+++	+	+++	++	+	0	++	+
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	0	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+++	+++	++	0	+++	++
2-,3-,4-,5-,6-Phenylidodecane	0	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+	+++	+++	++	0	+++	++
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	0	++	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	++	+++	++	0	++	++
4-,5-,6-Phenyltetradecane	0	+	+	0	+	0	0	0	++	+	+	+	+	0	+	0

Alkylphenoethoxylylate / Metabolite

p-Octylphenole	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
p-Nonylphenole	+	++	+++	0	++	+	++	++	++	+	++	+	+	+	++	+
p-Nonylphenoethoxylylate	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
p-Nonylphenoethoxylylcarbonsäuren	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0

Tabelle 3.9

Verbindung

F1	F2	F3	N1	F4	F4U	F4F	N2	F5	F5F	F6	F7	F7U	F7F	F8	F8U
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997

Polycyclische aromatische KW

Naphthalin	+	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+	+++	+
Methylnaphthaline	0	++	++	++	+++	++	++++	++++	++++	+++	++	+++	+	+++	++
C2-Naphthaline	0	++	+	+	+++	++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	++	++
C3-Naphthaline	0	+	+	+	++	+	+++	+++	+++	+++	++	++	0	++	+
C4-Naphthaline	0	+	+	+	+	0	++	+++	+++	++	+	+	0	++	+

Acenaphthen	0	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+	+++
Acenaphthylen	0	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	++
Indan	0	+	+	0	+	0	+	++	++	++	+	0	0	+	0
Methylindane	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Dimethylindane	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Trimethylindane	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Tetramethylindane	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Fluoren	0	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Phenanthren	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
C2-Phenanthrene	0	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	0
C4-Phenanthrene	0	+	+	+	0	0	+	++	++	+	+	+	+	+	0
Anthracen	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Fluoranthen	+	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyren	+	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzfluoren	0	++	++	++	+	0	+	++	++	+	+	+	+	+	0
Methylpyrene	0	+	+	+	+	0	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Dimethylpyrene	0	0	+	+	0	0	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzo[c]phenanthren	0	+	++	++	++	+	+++	++	++	++	+++	++	++	++	+++
Benz[a]anthracen	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzofluoranthene	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzofluoranthene	0	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzofluoranthene	0	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzofluoranthene	0	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dibenzanthracen	0	+	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	++	++
Dibenzpyren	0	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	++	++

N-Heterocyclen

3-Methylindol	0	+	0	++	0	0	+++	+++	0	+	0	0	0	+	0
9H-Carbazol	++	+++	+	+++	++	++	+++	+++	+	++	++	+	0	++	++
Methylcarbazole	0	+	0	++	0	0	+++	+++	+	0	+	+	0	+	0
Benzocarbazol	0	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+	+	+	0	+	0
Benzoacridin	0	0	+	+	++	++	0	0	0	+	+	+	0	0	0

Tabelle 3.9

Verbindung

F1	F2	F3	N1	F4	F4U	F4F	N2	F5	F5F	F6	F7	F7U	F7F	F8	F8U
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
O	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
O	+	++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++
+	++	++	+++	+++	++	++	++++	+++	+++	+	++	+	+	++	++

O-Heterocyclen															
Dibenzofuran															
Methyldibenzofurane															
Benzonaphthofurane															
S-Heterocyclen															
Dibenzothiophen															
Methyldibenzothiophene															
Benzonaphthothiophen															
Methylbenzonaphthothiophen															
Dinaphthothiophen															

Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile															
1-Naphthalincarbaldehyd															
2-Naphthalincarbaldehyd															
1-Naphthalincarbonitril															
2-Naphthalincarbonitril															
Fluoren															
Fluoren															
Anthron															
Anthrachinon															
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on															
9-Phenanthren-carbaldehyd															
Methylanthrachinone															
9-Anthraccarbaldehyd															
Benzanthron															
5,12-Naphthacenchinon															

Weitere aromatische Verbindungen															
Biphenyl															
Diphenylether															
2,6-Naphthalindicarbonsäure															

Phthalate / Weichmacher															
Octyl-/Nonylphthalate															
Diisooctyladipat															
Triphenylphosphat															

Geruchsstoffe															
HHCB (Galaxolide)															
AHTN (Tonalide)															
Galaxolidon															

Tabelle 3.9**Verbindung**

	F1 1997	F2 1997	F3 1997	N1 1997	F4 1997	F4U 1997	F4F 1997	N2 1997	F5 1997	F5F 1997	F6 1997	F7 1997	F7U 1997	F7F 1997	F8 1997	F8U 1997
2-Methyl-3-(4- <i>tert</i> -butylphenyl)propanal (Lilial)	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
4-Oxoisophoron	0	0	++	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	++	0	0
Vitamine und Metabolite																
Vitamin K3 (Menadion)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamin E (α -Tocopherol)	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	++	++	0	0
Sulfide																
Diisopropyldisulfid	+++	+++	+	++	+	0	0	+	+	++	++	++	0	0	++	+
Hexylmethyldisulfid	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dipropytrisulfid	+	++	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0
Chlorierte Verbindungen																
Bis(chlorpropyl)ether	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	+	0
Bis(dichlorpropyl)ether	0	++	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	++	0
1,1,2,2-Tetrachlorethan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	0	++
Tetrachlorethylen	+	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+
Chlorbenzol	+	+	+	+	+	0	0	0	++	+	+	+	0	0	+	+
Dichlorbenzole	+	+	0	0	0	0	0	+	++	++	+	+	0	0	++	+
Dibrombenzole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichlorbenzole	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+
Hexachlorbenzol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlornaphthaline	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0
Dichlornaphthaline	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0
Dichlorbenzoesäure	0	++	++	0	+	+	+	+	++	+	0	+	+	0	++	++
C14-PCBs	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C15-PCBs	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C16-PCBs	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0
C17-PCBs	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0
C18-PCBs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C19-PCBs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10-PCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestizide und Metabolite																
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>o,p'</i> -DDE	0	0	++	++	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0
<i>p,p'</i> -DDE	0	+	++	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0
<i>o,p'</i> -DDD	0	+	++	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	0
<i>p,p'</i> -DDD	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0

Tabelle 3.9															
Verbindung															
F1	F2	F3	N1	F4	F4U	F4F	N2	F5	F5F	F6	F7	F7U	F7F	F8	F8U
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
o,p'-DDT	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0
p,p'-DDT	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0
p,p'-Dichlorbenzophenon	0	0	++	+	+	++	+	+	++	0	0	++	+++	+	++
2'-Hydroxy-2,4,4'-trichlordiphenylether (Triclosan)	0	+	+	++	0	+	++	+	+	0	0	0	0	+	0
α-HCH	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-HCH	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-HCH	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aldrin	0	0	++	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Bromophos	0	0	++	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Ethylbromophos	0	0	++	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Heptachlorepoxid	0	0	++	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Endosulfan-sulfat	0	0	++	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)-bicyclo[2.2.1]hept-2-en	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.9**Verbindung**

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Aliph. Kohlenwasserstoffe																
<i>n</i> -Decan bis <i>n</i> -Tetatriacontan	++++	++	++++	++	++++	++++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Aliph. Aldehyde und Ketone																
<i>n</i> -Octanal bis <i>n</i> -Dotriacontanal	++++	++	+++	++	+++	++++	0?	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
<i>n</i> -Octan-2-on bis <i>n</i> -Octacosan-2-on	++	+	++	0	+	0	+	+	0	+	++	++	+	+	+	+
Carbonsäuren																
<i>n</i> -Decan- bis <i>n</i> -Dotriacontansäure	++++	+++	++++	++	++++	++++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
Palmitoleinsäure	+++	+	++++	++	+++	++++	++	0	+	++	0	++	++	++	++	0
Ölsäure	+++	++	+++	++	+++	+++	++	0	++	++	0	++	++	++	++	0
Linolsäure	+++	0	++	++	++	+++	+	0	++	+	0	++	+	+	+	0
Linolensäure	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	++	+	+	+	0
<i>iso</i> -Pentadecansäure	+++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	0
<i>anteiso</i> -Pentadecansäure	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	0
<i>iso</i> -Hexadecansäure	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>anteiso</i> -Hexadecansäure	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0
<i>iso</i> -Heptadecansäure	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+	++	++	0
<i>anteiso</i> -Heptadecansäure	++	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+	++	++	0
<i>iso</i> -Octadecansäure	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	++	+	+	0	0
<i>anteiso</i> -Octadecansäure	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>iso</i> -Nonadecansäure	++	0	+	++	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0
<i>anteiso</i> -Nonadecansäure	+	0	+	++	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0
<i>iso</i> -Eicosansäure	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0
<i>anteiso</i> -Eicosansäure	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>iso</i> -Heneicosansäure	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
<i>anteiso</i> -Heneicosansäure	+	0	+	++	++	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0
Terpenoide																
Pristan	0	++	++	++	++	0	++	++	++	++	++	0	++	++	++	++
Phytan	+	++	+	++	++	0	++	++	+	++	+++	++	++	++	++	++
Phytan	0	++	+	++	++	0	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++
Phytadien	+	++	0	++	++	+++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++	++	++
Abietinsäure	+	0	0	++	++	++	+	0	++	++	0	++	++	+	+	0
Dehydroabietinsäure	++	++	+	+++	+++	+++	++	0	+++	++	0	+++	+++	++	++	0
Tetrahydroabietinsäure	+	0	0	+++	++	++	+	0	++	++	0	+++	+++	++	++	0
Dehydroabietin	++	+	++	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
Tetrahydroreten	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Reten	++	++	++	++	+++	+++	+	0	+	+	++	+	++	+	++	++
Dehydroabietan	++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on	+++	++	++	++	++	++	++	0	+	+	+++	++	+++	++	++	0

Tabelle 3.9

Verbindung

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Squalen	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cholesterin	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	++	+	++	+++	+++	+++	++
5 α H-Cholestan-3 β -ol	++	++	++	++	++	++	++	++	0	++	+	++	+++	+++	+++	+++
5 β H-Cholestan-3 β -ol	+	++	++	+	+++	+	+++	++	0	+	+	++	++	+++	++	+
5 α H-Cholestanon	0	+	++	0	0	+	++	+	0	+	++	++	++	+++	+++	+++
5 β H-Cholestanon	+	++	++	+	+	+	+++	++	0	++	++	+++	+++	+++	+++	++
5 α H-Ergostan-3 β -ol	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	++	++	+++	+++	++
5 β H-Ergostan-3 β -ol	0	+	0	+	0	0	++	+	0	+	+	+	+	+++	++	+
5 α H-Ergostanon	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	++	++	++	++	++	0
5 β H-Ergostanon	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	++	++	++	++	++	0
5 α H-Stigmastan-3 β -ol	++	++	++	++	++	+++	++	+	0	++	0	++	++	+++	++	++
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	+	+	++	+	++	++	+++	++	0	+	0	++	+	++	+	+
5 α H-Stigmastanon	+	++	++	0	++	++	++	++	0	+	++	++	+++	+++	++	0
5 β H-Stigmastanon	+	++	++	0	+	+	++	++	0	0	++	+++	+++	+++	++	0
Stigmasten-3 β -ol	++	+++	+	+	++	++	+++	+	0	+	+	+	++	++	++	++

Alkylbenzole

Xylol	+	+	0	+	+	+	++	0	0	+	+	++	0	++	++	++
Ethylbenzol	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	++	+
Propylbenzol	0	+	0	+	0	0	++	0	0	+	++	+	+	+	++	++
Ethylmethylbenzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	++	+	+	+	++	++
Trimethylbenzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	++	+	+	+	++	++
Diethylbenzole	++	+	0	+	0	0	+	0	0	+	++	++	+	+	++	+
Methylpropylbenzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	++	+
Ethylidimethylbenzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	++	+
Tetramethylbenzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	++	+
C5-Benzole	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+
C6-Benzole	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+

Phenylalkane

2-,3-,4-,5-Phenyldecane	++	+	+	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	+++	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	++	+++	+++	++	+++	+++	++
2-,3-,4-,5-,6-Phenylododecane	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	+++	+	+++	+++	+++	++	+	++	+	++	++	++	++	+++	+++	++
4-,5-,6-Phenyltetradecane	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0

Alkylphenoethoxylylate / Metabolite

p-Octylphenole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p-Nonylphenole	0	0	0	++	++	0	+	0	0	++	+	++	+	++	+	++
p-Nonylphenoethoxylylate	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
p-Nonylphenoethoxylylcarbonsäuren	+	0	0	0	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.9**Verbindung****Polycyclische aromatische KW**

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Naphthalin	+++	+	+	+++	++	+++	+	0	0	++	+++	++	++	++	+++	++
Methylnaphthaline	+++	+	++	+++	++	+++	+	0	++	++	+++	++	++	++	+++	++
C2-Naphthaline	+++	0	++	+++	++	++	+	0	++	++	++	++	++	++	+++	++
C3-Naphthaline	+++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
C4-Naphthaline	+++	0	++	+	++	++	+	0	0	++	++	++	++	++	++	++

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Acenaphthen	++++	+	++	0	+++	++	0	0	0	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Acenaphthylen	++	+	++	+	+	++	0	0	0	+	++	++	+	+	++	++
Indan	++	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	++	+
Methylindane	++	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+
Dimethylindane	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	++	+
Trimethylindane	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	++	+
Tetramethylindane	+	++	0	++	+	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+
Fluoren	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	++	++	++	++	++	+++	+++
Phenanthren	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C2-Phenanthrene	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
C4-Phenanthrene	+	++	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+	+
Anthracen	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+++	++	++	++	++	++
Fluoranthen	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyren	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzfluoren	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Methylpyrene	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Dimethylpyrene	+	+	++	+	+	++	+	+	+	++	++	++	++	++	+	++
Benzo[c]phenanthren	+++	++	+++	++	+++	+++	0	++	++	+++	++	++	+	+++	+++	+++
Benz[a]anthracen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
Benzofluoranthene	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++
Benzofluoranthene	+++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzofluoranthene	+++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzofluoranthene	+++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Dibenzanthracen	++	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	++	++	+	++	++
Dibenzpyren	++	+	++	++	++	++	0	++	++	+	+	++	++	+	+	+

N-Heterocyclen

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
3-Methylindol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0
9H-Carbazol	++	+	++	++	++	++	0	0	0	+	++	++	++	+	++	+
Methylcarbazole	+	0	+	0	+	++	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
Benzocarbazol	++	+	++	0	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzoacridin	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0

Tabelle 3.9

Verbindung

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
O-Heterocyclen																
Dibenzofuran	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++
Methyldibenzofurane	++	++	+++	++	++	++	0	++	+	++	++	++	++	++	++	++
Benzonaphthofurane	+	+	++	0	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++

S-Heterocyclen																
Dibenzothiophen	+++	+	++	+	++	++	0	0	0	+	++	++	++	++	++	++
Methyldibenzothiophene	++	+	+	+++	+	++	0	0	0	+	++	+	++	+	++	++
Benzonaphthothiophen	++	+	++	+	0	++	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Methylbenzonaphthothiophen	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
Dinaphthothiophen	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0

Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile																
1-Naphthalincarbaldehyd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Naphthalincarbaldehyd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-Naphthalincarbonitril	++	0	++	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Naphthalincarbonitril	++	++	+	+	+	++	0	0	+	0	++	++	++	+	+	0
Fluorenol	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anthron	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0
Anthrachinon	0	+	+	++	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9-Phenanthren-carbaldehyd	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0
Methylantrachinone	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	++
9-Anthraccncarbaldehyd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Benzanthron	+	+	+	++	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
5,12-Naphthacenchinon	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0

Weitere aromatische Verbindungen																
Biphenyl	+++	+	++	++	++	++	+	0	0	++	+++	++	++	++	++	++
Diphenylether	++	0	++	0	++	++	0	0	0	++	++	++	++	+	++	++
2,6-Naphthalindicarbonsäure	+	0	+	0	++	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0

Phthalate / Weichmacher																
Octyl-/Nonylphthalate	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diisooctyladipat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Triphenylphosphat	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0

Geruchsstoffe																
HHCB (Galaxolide)	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0
AHTN (Tonalide)	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0
Galaxolidon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0

Tabelle 3.9**Verbindung**

	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
2-Methyl-3-(4- <i>tert</i> -butylphenyl)propanal (Lilial)	++	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-Oxoisophoron	0	0	++	+	++	++	0	0	0	++	++	++	+	+++	0	0
Vitamine und Metabolite																
Vitamin K3 (Menadion)	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamin E (α -Tocopherol)	0	+	+	0	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	++	+	++	++	0	++	+	0	0	+++	0	+	++	+++	0	0
Sulfide																
Diisopropyldisulfid	+	+++	0	+++	0	0	++	+	++	+	++	++	++	++	+	+++
Hexylmethyldisulfid	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dipropytrisulfid	0	++	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorierte Verbindungen																
Bis(chlorpropyl)ether	0	+	+	0	++	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0
Bis(dichlorpropyl)ether	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0
1,1,2,2-Tetrachlorethan	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetrachlorethylen	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+
Chlorbenzol	+	+	0	+	0	0	0	0	++	+	++	++	+	++	++	++
Dichlorbenzole	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dibrombenzole	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	++	0	+	+	++	++
Trichlorbenzole	+	0	++	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexachlorbenzol	+	0	0	0	0	++	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+
Chlornaphthaline	++	0	0	0	0	++	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+
Dichlornaphthaline	++	+	+	0	++	+	++	+	++	++	+	++	+	+	+	+
Dichlorbenzoesäure	+	+	0	++	+	+	0	+	++	++	+	++	0	+	+	+
C14-PCBs	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C15-PCBs	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C16-PCBs	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	++	+	+	++
C17-PCBs	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+
C18-PCBs	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
C19-PCBs	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10-PCB	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestizide und Metabolite																
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)	0	++	0	0	+	+	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>o,p'</i> -DDE	+	0	++	+	++	++	0	0	0	0	++	++	++	+	+	+++
<i>p,p'</i> -DDE	+	+	++	+	++	++	+	+	+	0	++	++	++	+	+	+++
<i>o,p'</i> -DDD	+	0	+	0	++	+	0	0	0	0	++	+	++	0	0	++
<i>p,p'</i> -DDD	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	++	+	++	0	0	++

Tabelle 3.9		F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F	N3	F11	F12	F13	F14	F15	F16	H1	H2	H3
Verbindung		1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
<i>o,p'</i> -DDT		0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+
<i>p,p'</i> -DDT		0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+
<i>p,p'</i> -Dichlorbenzophenon		0	+	0	++	++	++	0	0	+	++	++	++	++	++	++	+
2'-Hydroxy-2,4,4'-trichlordiphenylether (Triclosan)		0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+
α -HCH		+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	++	++	++	0	0	+
β -HCH		0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	++	++	++	0	0	+
γ -HCH		0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	++	++	++	0	0	+
Aldrin		+	0	+	0	++	++	0	0	0	0	++	++	++	0	0	++
Bromophos		+	0	++	0	+	++	0	0	0	0	++	++	++	0	0	++
Ethylbromophos		+	0	++	0	++	++	0	0	0	0	++	++	++	0	0	++
Heptachlorepoxid		+	0	+	0	++	++	0	0	0	0	++	++	++	0	0	++
Endosulfan-sulfat		0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)-bicyclo[2.2.1]hept-2-en		0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.10

Verbindung

[illegible]

Tabelle 3.10

Verbindung

	N2-98	F5-98	F10-98	H1-98	H4-98	F2-99	N2-99	F5-99	F6-99	N3-99	H1-99	H4-99
	1998	1998	1998	1998	1998	1999	1999	1999	1999	1999	1999	1999
Squalen	+++	+++	++++	++++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Cholesterin	++	+++	++	n.v.	+	n.v.	+++	n.v.	n.v.	n.v.	+++	++
5 α H-Cholestan-3 β -ol	++	++	++	n.v.	+	n.v.	++	n.v.	n.v.	n.v.	+++	+
5 β H-Cholestan-3 β -ol	+++	+++	++	n.v.	++	n.v.	+++	n.v.	n.v.	n.v.	++	++
5 α H-Cholestanon	+++	+++	+++	n.v.	+++	+++	+	0	0	++	+++	+++
5 β H-Cholestanon	+++	+++	+++	n.v.	+++	++	++	0	0	++	+++	+++
5 α H-Ergostan-3 β -ol	+	+	0	n.v.	+	n.v.	+	n.v.	n.v.	n.v.	++	+
5 β H-Ergostan-3 β -ol	++	++	+	n.v.	+	n.v.	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	0
5 α H-Ergostanon	+	+	+	n.v.	++	++	+	0	0	+	++	+
5 β H-Ergostanon	+	+	++	n.v.	++	+	+	0	0	+	+	+
5 α H-Stigmastan-3 β -ol	+	+	+	n.v.	+	n.v.	+	n.v.	n.v.	n.v.	++	+
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	++	++	++	n.v.	0	n.v.	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	0
5 α H-Stigmastanon	++	+++	++	n.v.	+	++	+	0	0	+	++	++
5 β H-Stigmastanon	+	+	++	n.v.	+	++	+	0	0	+	++	++
Stigmastan-3 β -ol	++	++	+	n.v.	0	n.v.	++	n.v.	n.v.	n.v.	+	0
Alkylbenzole												
Xylol	0	0	0	+	0	+	++	0	+	+	0	0
Ethylbenzol	0	0	0	+	0	+	++	0	+	+	0	0
Propylbenzol	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0
Ethylmethylbenzole	+	0	0	+	0	+	+	+	+	++	+	0
Trimethylbenzole	+	0	0	+	0	++	++	0	++	+	+	0
Diethylbenzole	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0
Methylpropylbenzole	++	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0
Ethylidimethylbenzole	++	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0
Tetramethylbenzole	++	+	0	+	0	++	++	+	++	++	+	0
C5-Benzole	++	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0
C6-Benzole	++	+	0	+	0	+	+	+	+	+	++	0
Phenylalkane												
2-,3-,4-,5-Phenyldecane	+	++	++	++	0	+	+	++	+	+	+	0
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	++	+++	++++	+++	0	+++	+++	+++	+++	++	++	0
2-,3-,4-,5-,6-Phenylododecane	+++	+++	++++	+++	0	+++	+++	++++	+++	++	++	0
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	+++	++	++++	+++	0	+++	+++	++++	+++	++	++	0
4-,5-,6-Phenyltetradecane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alkylphenoethoxylylate / Metabolite												
p-Octylphenole	++	+	0	+	0	n.v.	+	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
p-Nonylphenole	+	++	+	+++	0	n.v.	0	n.v.	n.v.	n.v.	+	0
p-Nonylphenoethoxylylate	0	0	0	+	0	n.v.	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
p-Nonylphenoethoxylylatcarbonsäuren	0	0	0	+	0	n.v.	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0

Tabelle 3.10

Verbindung

	N2-98	F5-98	F10-98	H1-98	H4-98	F2-99	N2-99	F5-99	F6-99	N3-99	H1-99	H4-99
polycyclische aromatische KW												
Naphthalin	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Methylnaphthaline	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
C2-Naphthaline	+++	++	+++	++	++	++	+++	+	++	++	++	++
C3-Naphthaline	++	++	++	++	++	+++	++	+	+	+	++	++
C4-Naphthaline	++	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+
Acenaphthen	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	++
Acenaphthylen	+++	++	++	+++	++	+	++	+	+	+	++	0
Indan	++	+	0	+	+	+	++	+	++	+	+	0
Methylindane	++	+	0	+	+	+	++	+	++	+	+	0
Dimethylindane	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	++	0
Trimethylindane	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0
Tetramethylindane	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0
Fluoren	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++
Phenanthren	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	++	+++	+++
C2-Phenanthrene	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++
C4-Phenanthrene	+	++	+	++	++	+	++	++	+	+	++	++
Anthracen	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	++	+++
Fluoranthren	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyren	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++
Benzfluoren	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	+	+++	++
Methylpyrene	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++
Dimethylpyrene	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzo[c]phenanthren	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
Benzo[a]anthracen	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	++	++++	+++
Benzo[fluoranthene	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++
Benzo[e]pyren	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++
Benzo[a]pyren	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++
Dibenzanthracen	++	+	++	++	++	+	+++	++	+	+	++	+
Dibenzpyren	++	+	+	++	+	+	+++	+	+	+	+	0

N-Heterocyclen

3-Methylindol	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0
9H-Carbazol	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	++
Methylcarbazole	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0
Benzo[carbazol	++	++	+	+	++	+	++	0	+	+	+	0
Benzoacridin	++	++	++	0	+	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	+	+

Tabelle 3.10

Verbindung	N2-98 1998	F5-98 1998	F10-98 1998	H1-98 1998	H4-98 1998	F2-99 1999	N2-99 1999	F5-99 1999	F6-99 1999	N3-99 1999	H1-99 1999	H4-99 1999
O-Heterocyclen												
Dibenzofuran	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	++	+++	++
Methyldibenzofurane	++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	++	++
Benzonaphthofurane	++	++	+++	++	++	++	+	+	+	+	++	+
S-Heterocyclen												
Dibenzothiophen	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+	++	++	0
Methyldibenzothiophene	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	0
Benzonaphthothiophen	++	+++	++	+++	++	++	+	+	++	+	++	+
Methylbenzonaphthothiophen	+	+	+	+	+	n.v.	+	+	+	+	+	+
Dinaphthothiophen	+	+	0	++	0	+	+	+	+	+	0	0
Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile												
1-Naphthalincarbaldehyd	+	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
2-Naphthalincarbaldehyd	++	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
1-Naphthalincarbonitril	0	+	+	0	0	0	++	0	0	0	+	0
2-Naphthalincarbonitril	+	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+	+
Fluorenol	++	+	++	++	++	+	++	+	++	+	+	+
Anthron	+	+	0	0	+	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
Anthrachinon	++	++	++	0	++	0	++	n.v.	n.v.	n.v.	++	+
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on	++	+	++	0	++	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	++	+
9-Phenanthrencarbaldehyd	+	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
Methylanthrachinone	++	+	+	+	+	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	++	++
9-Anthracencarbaldehyd	+	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
Benzanthron	++	++	++	+	++	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	++	+
5,12-Naphthacenchinon	+	+	+	+	++	0	0	n.v.	n.v.	n.v.	0	0
Weitere aromatische Verbindungen												
Biphenyl	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	+	++	++
Diphenylether	+	++	0	++	0	+	0	+	++	0	++	0
2,6-Naphthalindicarbonsäure	++	+	+	0	0	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	+
Phthalate / Weichmacher												
Octyl-/Nonylphthalate	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	+
Dioctyladipat	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Triphenylphosphat	++	+	+	0	0	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	0
Geruchsstoffe												
HHCB (Galaxolide)	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0
AHTN (Tonalide)	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0
Galaxolidon	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0

Tabelle 3.10**Verbindung**

	N2-98	F5-98	F10-98	H1-98	H4-98	F2-99	N2-99	F5-99	F6-99	N3-99	H1-99	H4-99
	1998	1998	1998	1998	1998	1999	1999	1999	1999	1999	1999	1999
2-Methyl-3-(4-tert-butylphenyl)propanal (Lilial)	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0
4-Oxoisophoron	0	+	++	0	0	++	0	0	0	++	++	0
Vitamine und Metabolite												
Vitamin K3 (Menadion)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamin E (α -Tocopherol)	+	+	++	+	+	++	n.v.	n.v.	+	++	++	+
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	++	++	++	0	0	++	0	0	0	++	++	++
Sulfide												
Diisopropyldisulfid	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0
Hexylmethyldisulfid	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0
Dipropytrisulfid	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0
Chlorierte Verbindungen												
Bis(chlorpropyl)ether	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0	++	0
Bis(dichlorpropyl)ether	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,1,2,2-Tetrachlorethan	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	0	0
Tetrachlorethylen	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0
Chlorbenzol	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Dichlorbenzole	+	+	+	+	0	+	++	+	++	+	+	0
Dibrombenzole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichlorbenzole	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Hexachlorbenzol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlornaphthaline	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Dichlornaphthaline	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Dichlorbenzoesäure	+	+	+	++	+	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	++
C14-PCBs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C15-PCBs	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0
C16-PCBs	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0
C17-PCBs	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0
C18-PCBs	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C19-PCBs	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10-PCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestizide und Metabolite												
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>o,p'</i> -DDE	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>p,p'</i> -DDE	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
<i>o,p'</i> -DDD	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0
<i>p,p'</i> -DDD	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0

Tabelle 3.10												
Verbindung	N2-98	F5-98	F10-98	H1-98	H4-98	F2-99	N2-99	F5-99	F6-99	N3-99	H1-99	H4-99
	1998	1998	1998	1998	1998	1999	1999	1999	1999	1999	1999	1999
<i>o,p'</i> -DDT	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0
<i>p,p'</i> -DDT	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0
<i>p,p'</i> -Dichlorbenzophenon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2'-Hydroxy-2,4,4'-trichloridphenylether (Triclosan)	++	+	+	+	0	0	+	n.v.	n.v.	n.v.	+	+
α -HCH	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0
β -HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ -HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aldrin	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
Bromophos	0	0	0	++	0	0	+	0	0	+	0	0
Ethylbromophos	0	+	0	++	0	0	+	0	0	+	0	0
Heptachlorepoxid	0	0	0	++	0	0	+	0	0	0	0	0
Endosulfan-sulfat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)-bicyclo[2,2,1]hept-2-en	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.11**Verbindung**

F2 1997	F2-99 1999	N2 1997	N2-98 1998	N2-99 1999	F5 1997	F5-98 1998	F5-99 1999	F6 1997	F6-99 1999	F10 1997	F10-98 1998
------------	---------------	------------	---------------	---------------	------------	---------------	---------------	------------	---------------	-------------	----------------

Aliph. Kohlenwasserstoffe*n*-Decan bis *n*-Tetracontan

++	+++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++++
----	-----	----	-----	----	----	----	----	----	----	----	------

Aliph. Aldehyde und Ketone*n*-Octanal bis *n*-Dotriacontanal*n*-Octan-2-on bis *n*-Octacosan-2-on

0	++	++	++	+	++	++	+	++	+	++	++
0	+	0	+	+	+	+	+	+	++	0	+

Carbonsäuren*n*-Decan- bis *n*-Dotriacontansäure

Palmitoleinsäure

Ölsäure

Linolsäure

Linolensäure

iso-Pentadecansäure*anteiso*-Pentadecansäure*iso*-Hexadecansäure*anteiso*-Hexadecansäure*iso*-Heptadecansäure*anteiso*-Heptadecansäure*iso*-Octadecansäure*anteiso*-Octadecansäure*iso*-Nonadecansäure*anteiso*-Nonadecansäure*iso*-Eicosansäure*anteiso*-Eicosansäure*iso*-Heneicosansäure*anteiso*-Heneicosansäure

+++	n.v.	++	++	++	++	+++	n.v.	++	n.v.	++	+++
+	n.v.	0	+	+	++	++	n.v.	+	n.v.	++	++
++	n.v.	+	++	++	+++	++	n.v.	++	n.v.	++	++
++	n.v.	+	+	++	++	+	n.v.	+	n.v.	++	+
0	n.v.	0	+	+	+	+	n.v.	+	n.v.	+	+
++	n.v.	0	++	++	+++	+++	n.v.	++	n.v.	++	++
++	n.v.	0	++	+	++	++	n.v.	+	n.v.	+	+
++	n.v.	0	+	+	+	+	n.v.	+	n.v.	0	0
++	n.v.	+	0	+	++	+	n.v.	+	n.v.	0	+
+	n.v.	+	0	+	++	+	n.v.	+	n.v.	++	+
+	n.v.	+	0	+	++	+	n.v.	+	n.v.	++	+
+	n.v.	+	+	+	++	+	n.v.	+	n.v.	+	+
+	n.v.	+	+	+	++	+	n.v.	+	n.v.	0	0
+	n.v.	0	+	+	++	+	n.v.	+	n.v.	+	+
+	n.v.	0	+	+	+	+	n.v.	+	n.v.	++	+

Terpenoide

Pristan

Phyten

Phytan

Phytadien

Abietinsäure

Dehydroabietinsäure

Tetrahydroabietinsäure

Dehydroabietin

Tetrahydroreten

Reten

Dehydroabietan

6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on

++	+++	++	0	+++	++	+++	++	+	+++	++	++
0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	++	++
++	+	+	0	+	+++	+	0	++	+	++	++
0	+	0	0	++	+	++	+	+	++	++	+
+	n.v.	+	0	+	+	++	n.v.	+	n.v.	++	+
++	n.v.	++	+	++	++	+++	n.v.	++	n.v.	+++	++
+	n.v.	+	+	++	++	++	n.v.	+	n.v.	+++	+
+	++	0	0	+	+	++	+	+	+	++	+++
+	++	0	0	+	++	+++	+	++	++	++	+++
+	++	0	0	+	++	+	+	+	+	++	+++
+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	++	+++
++	++	0	++	++	0	+	++	++	++	++	++

Tabelle 3.11

Verbindung

	F2	F2-99	N2	N2-98	N2-99	F5	F5-98	F5-99	F6	F6-99	F10	F10-98
	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999	1997	1999	1997	1998
Squalen	+++	++	++	+++	++	++	++++	+++	++	+++	++	++++
Cholesterin	0	n.v.	0	++	+++	+	+++	n.v.	+++	n.v.	+++	++
5 α H-Cholestan-3 β -ol	0	n.v.	0	++	++	0	++	n.v.	+	n.v.	++	++
5 β H-Cholestan-3 β -ol	0	n.v.	0	+++	+++	0	+++	n.v.	+++	n.v.	+	++
5 α H-Cholestanon	0	+++	0	++	+	0	++	0	+	0	0	+++
5 β H-Cholestanon	0	++	0	+++	++	0	+++	0	++	0	+	+++
5 α H-Ergostan-3 β -ol	0	n.v.	0	+	+	0	+	n.v.	+	n.v.	+	0
5 β H-Ergostan-3 β -ol	0	n.v.	0	+++	+	0	+++	n.v.	+	n.v.	+	+
5 α H-Ergostanon	0	++	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+
5 β H-Ergostanon	0	+	0	+	+	0	+	0	++	0	0	++
5 α H-Stigmastan-3 β -ol	0	n.v.	0	+	+	0	+	n.v.	+	n.v.	++	+
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	0	n.v.	0	++	+	0	++	n.v.	++	n.v.	+	++
5 α H-Stigmastanon	0	++	0	++	+	0	+++	0	+	0	0	+++
5 β H-Stigmastanon	0	++	0	+	+	0	+	0	++	0	0	++
Stigmasten-3 β -ol	0	n.v.	0	++	++	+	++	n.v.	+++	n.v.	+	+
Alkylbenzole												
Xylole	+	+	++	0	++	++	0	0	++	+	+	0
Ethylbenzol	+	+	+	0	++	++	0	0	+	+	+	0
Propylbenzol	+	+	+	+	+	++	0	+	+	+	+	0
Ethylmethylbenzole	+	+	+	+	+	++	0	+	+	+	+	0
Trimethylbenzole	++	++	+	+	++	+++	0	0	++	++	+	0
Diethylbenzole	+	+	+	+	+	++	+	0	+	+	+	0
Methylpropylbenzole	+	+	+	++	+	++	+	0	+	+	+	0
Ethylidimethylbenzole	+	+	+	++	+	++	+	0	+	+	+	0
Tetramethylbenzole	+	++	+	++	++	++	+	+	+	++	+	0
C5-Benzole	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	0
C6-Benzole	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	0
Phenylalkane												
2-,3-,4-,5-Phenyldecane	++	+	0	+	+	+++	++	++	+++	+	++	++
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	+++	+++	+	++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2-,3-,4-,5-,6-Phenylododecane	+++	+++	+	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	++	+++	+	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
4-,5-,6-Phenyltetradecane	+	0	0	0	0	++	0	0	+	0	+	0
Alkylphenoethoxylylate / Metabolite												
p-Octylphenole	0	n.v.	0	++	+	0	+	n.v.	0	n.v.	0	0
p-Nonylphenole	++	n.v.	++	+	0	++	++	n.v.	++	n.v.	++	+
p-Nonylphenoethoxylylate	+	n.v.	0	0	0	+	0	n.v.	0	n.v.	0	0
p-Nonylphenoethoxylylatcarbonsäuren	0	n.v.	0	0	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0

Tabelle 3.11

Verbindung

	F2	F2-99	N2	N2-98	N2-99	F5	F5-98	F5-99	F6	F6-99	F10	F10-98
	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999	1997	1999	1997	1998
Polycyclische aromatische KW												
Naphthalin	+++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Methylnaphthaline	++	++	++++	+++	+++	++++	+++	++	+++	++	+++	+++
C2-Naphthaline	++	++	++++	+++	+++	++++	++	+	+++	++	+++	+++
C3-Naphthaline	+	+++	+++	++	++	+++	++	+	+++	+	++	++
C4-Naphthaline	+	++	+++	++	++	+++	+	+	++	+	+	+
Acenaphthen	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	+	+++	0	++
Acenaphthylen	++	+	++	+++	++	++	++	+	+	+	+	++
Indan	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	+	0
Methylindane	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	+	0
Dimethylindane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Trimethylindane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Tetramethylindane	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	++	0
Fluoren	++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
Phenanthren	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
C2-Phenanthrene	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
C4-Phenanthrene	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+
Anthracen	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++
Fluoranthren	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyren	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzfluoren	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
Methylpyrene	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	++
Dimethylpyrene	0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
Benzo[c]phenanthren	+	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+++
Benzo[a]anthracen	++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[fluoranthene	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[e]pyren	++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
Benzo[a]pyren	++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
Dibenzanthracen	+	+	+++	++	+++	++	+	++	++	+	+	++
Dibenzpyren	++	+	++	++	+++	++	+	+	++	+	++	+
N-Heterocyclen												
3-Methylindol	+	0	+++	+	+	+++	+	0	+	0	0	0
9H-Carbazol	+++	+	++++	++	++	+++	++	+	++	+	++	++
Methylcarbazole	+	0	+++	0	+	++	0	0	0	0	0	+
Benzo[carbazol	++	+	++	++	++	++	++	0	+	+	0	+
Benzoacridin	0	0	0	++	0	0	++	n.v.	+	n.v.	0	++

Tabelle 3.11

Verbindung

	F2 1997	F2-99 1999	N2 1997	N2-98 1998	N2-99 1999	F5 1997	F5-98 1998	F5-99 1999	F6 1997	F6-99 1999	F10 1997	F10-98 1998
O-Heterocyclen												
Dibenzofuran	+++	++	++++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Methyldibenzofurane	+	++	+++	++	+	+++	+++	+	++	+	++	+++
Benzonaphthofurane	++	++	++++	++	+	+++	++	+	+	+	0	+++
S-Heterocyclen												
Dibenzothiophen	+	+++	+++	++	+	+++	++	+	++	+	+	++
Methyldibenzothiophene	+	+	++	+	+	++	+	+	+++	+	+++	+
Benzonaphthothiophen	0	++	+++	++	+	++	+++	+	+	++	+	++
Methylbenzonaphthothiophen	0	n.v.	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dinaphthothiophen	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	0
Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile												
1-Naphthalincarbaldehyd	0	0	0	+	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0
2-Naphthalincarbaldehyd	0	0	0	++	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0
1-Naphthalincarbonitril	0	0	0	0	++	0	+	0	0	0	0	+
2-Naphthalincarbonitril	+++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	+	++
Fluorenol	0	0	++	+	+	++	+	n.v.	+	n.v.	+	0
Anthron	0	0	+	++	++	++	++	n.v.	+	n.v.	+	++
Anthrachinon	0	0	0	++	++	0	+	n.v.	+	n.v.	++	++
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on	0	0	0	+	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0
9-Phenanthren-carbaldehyd	0	0	+	++	+	+	+	n.v.	0	n.v.	0	+
Methylanthrachinone	0	0	0	+	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0
9-Anthracen-carbaldehyd	0	0	0	+	0	0	0	n.v.	0	n.v.	0	0
Benzanthron	0	0	+++	++	+	++	++	n.v.	+	n.v.	++	++
5,12-Naphthacenchinon	0	0	++	+	0	+	+	n.v.	+	n.v.	+	+
Weitere aromatische Verbindungen												
Biphenyl	+++	++	++++	+++	+++	++++	+++	++	+++	++	++	++
Diphenylether	0	+	0	+	0	++	++	+	+	++	0	0
2,6-Naphthalindicarbonsäure	0	0	0	++	+	0	+	n.v.	+	n.v.	0	+
Phthalate / Weichmacher												
Octyl-/Nonylphthalate	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Diethyladipat	+++	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Triphenylphosphat	+	0	0	++	+	+	+	n.v.	+	n.v.	+	+
Geruchsstoffe												
HHCB (Galaxolide)	++	+	0	+	+	+	+	+	++	+	+	+
AHTN (Tonalide)	++	+	0	+	+	+	+	+	++	+	+	+
Galaxolidon	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.11**Verbindung**

	F2 1997	F2-99 1999	N2 1997	N2-98 1998	N2-99 1999	F5 1997	F5-98 1998	F5-99 1999	F6 1997	F6-99 1999	F10 1997	F10-98 1998
2-Methyl-3-(4- <i>tert</i> -butylphenyl)propanal (Lilial)	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+
4-Oxoisophoron	0	++	0	0	0	0	+	0	0	0	+	++
Vitamine und Metabolite												
Vitamin K3 (Menadion)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vitamin E (α -Tocopherol)	0	++	0	+	n.v.	+	+	n.v.	+	+	0	++
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0	++	0	++	0	0	++	0	0	0	++	++
Sulfide												
Diisopropyldisulfid	+++	0	+	0	0	+	0	+	++	+	+++	0
Hexylmethyldisulfid	+	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0
Dipropyltrisulfid	++	0	0	0	0	0	0	+	+	+	++	0
Chlorierte Verbindungen												
Bis(chlorpropyl)ether	0	0	0	0	0	++	+	+	0	+	0	0
Bis(dichlorpropyl)ether	++	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0	0
1,1,2,2-Tetrachlorethan	0	0	0	0	++	0	0	++	0	++	0	0
Tetrachlorethylen	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0
Chlorbenzol	+	+	0	0	+	++	0	+	+	+	+	0
Dichlorbenzole	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+
Dibrombenzole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichlorbenzole	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0
Hexachlorbenzol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlornaphthaline	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0
Dichlornaphthaline	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0
Dichlorbenzoesäure	++	0	+	+	+	++	+	n.v.	0	n.v.	++	+
C14-PCBs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C15-PCBs	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
C16-PCBs	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0
C17-PCBs	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0
C18-PCBs	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
C19-PCBs	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
C10-PCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestizide und Metabolite												
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>o,p'</i> -DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>p,p'</i> -DDE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>o,p'</i> -DDD	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0
<i>p,p'</i> -DDD	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.11		F2	F2-99	N2	N2-98	N2-99	F5	F5-98	F5-99	F6	F6-99	F10	F10-98
Verbindung		1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999	1997	1999	1997	1998
<i>o,p'</i> -DDT		+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>p,p'</i> -DDT		+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0
<i>p,p'</i> -Dichlorbenzophenon		0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	++	0
2-Hydroxy-2,4,4'-trichlordiphenylether (Triclosan)		+	0	++	++	+	+	+	n.v.	0	n.v.	+	+
α -HCH		0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
β -HCH		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ -HCH		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aldrin		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bromophos		0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Ethylbromophos		0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0
Heptachlorepoxid		0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
Endosulfan-sulfat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)-bicyclo[2.2.1]hept-2-en		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.11										
Verbindung	N3		N3-99		H1	H1-98	H1-99	H3	H4-98	H4-99
	1997	1999	1999	1997	1997	1998	1999	1997	1998	1999
Aliph. Kohlenwasserstoffe										
<i>n</i> -Decan bis <i>n</i> -Tetracontan	++		+++	+++		++	++++	+++	+++	+++
Aliph. Aldehyde und Ketone										
<i>n</i> -Octanal bis <i>n</i> -Dotriacontanal	0	+	+	++++		+++	+++	++	++	++
<i>n</i> -Octan-2-on bis <i>n</i> -Octacosan-2-on	+	+	+	+		++	++	+	+	+
Carbonsäuren										
<i>n</i> -Decan- bis <i>n</i> -Dotriacontansäure	+++	n.v.		+++		++	+++	++	++	+++
Palmitoleinsäure	++	n.v.		++		+	++	0	+	++
Ölsäure	++	n.v.		++		+	++	0	+	+++
Linolsäure	+	n.v.		+		+	+	0	0	++
Linolensäure	+	n.v.		+		0	0	0	0	++
<i>iso</i> -Pentadecansäure	++	n.v.		++		+	++	0	++	++
<i>anteiso</i> -Pentadecansäure	++	n.v.		++		+	++	0	++	++
<i>iso</i> -Hexadecansäure	+	n.v.		+		+	+	0	+	+
<i>anteiso</i> -Hexadecansäure	0	n.v.		0		+	0	0	0	0
<i>iso</i> -Heptadecansäure	++	n.v.		++		0	+	0	+	++
<i>anteiso</i> -Heptadecansäure	++	n.v.		++		0	+	0	+	++
<i>iso</i> -Octadecansäure	+	n.v.		+		+	0	0	0	0
<i>anteiso</i> -Octadecansäure	0	n.v.		0		+	0	0	0	0
<i>iso</i> -Nonadecansäure	+	n.v.		+		0	0	0	0	+
<i>anteiso</i> -Nonadecansäure	0	n.v.		+		0	0	0	0	+
<i>iso</i> -Eicosansäure	+	n.v.		+		0	0	0	0	+
<i>anteiso</i> -Eicosansäure	0	n.v.		0		+	0	0	0	0
<i>iso</i> -Heneicosansäure	+	n.v.		+		+	0	0	0	+
<i>anteiso</i> -Heneicosansäure	+	n.v.		+		+	0	0	0	+
Terpenoide										
Pristan	++	+++		++		++	++	++	0	++
Phytan	++	++		++		+	++	++	0	++
Phytan	++	++		++		+	+	++	0	+
Phytadien	++	+++		++		++	0	++	0	0
Abietinsäure	+	n.v.		+		+	+	0	+++	+
Dehydroabietinsäure	++	n.v.		++		++	++	0	++++	++
Tetrahydroabietinsäure	+	n.v.		++		++	+	0	0	+
Dehydroabietin	++	++		+++		+	++	++	+++	++
Tetrahydroreten	++	+++		+++		++	++	++	++	++
Reten	+	++		+		+	++	++	++++	+++
Dehydroabietan	+	++		++		+	+	++	+++	++
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on	++	++		++		++	+++	0	++	++

Tabelle 3.11

Verbindung	N3		N3-99		H1	H1-98	H1-99	H3	H4-98	H4-99
	1997	1999	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999
Squalen	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Cholesterin	+++	n.v.	+++	n.v.	+++	n.v.	+++	++	+	++
5 α H-Cholestan-3 β -ol	++	n.v.	+++	n.v.	+++	n.v.	+++	+++	+	+
5 β H-Cholestan-3 β -ol	++++	n.v.	+++	n.v.	+++	n.v.	++	+	++	++
5 α H-Cholestanon	++	++	+++	++	+++	n.v.	+++	+++	++	+++
5 β H-Cholestanon	+++	++	+++	++	+++	n.v.	+++	++	++	+++
5 α H-Ergostan-3 β -ol	+	n.v.	+++	n.v.	+++	n.v.	++	++	+	+
5 β H-Ergostan-3 β -ol	++	n.v.	++	n.v.	++	n.v.	+	+	+	0
5 α H-Ergostanon	+	+	++	+	++	n.v.	++	0	++	+
5 β H-Ergostanon	+	+	++	+	++	n.v.	+	0	++	+
5 α H-Stigmastan-3 β -ol	++	n.v.	+++	n.v.	+++	n.v.	++	++	+	+
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	+++	n.v.	++	n.v.	++	n.v.	+	+	0	0
5 α H-Stigmastanon	++	+	+++	+	+++	n.v.	++	0	+	++
5 β H-Stigmastanon	++	+	+++	+	+++	n.v.	++	0	+	++
Stigmasten-3 β -ol	+++	n.v.	++	+	++	n.v.	+	++	0	0

Alkylbenzole

Xylol	++	+	++	+	++	+	0	++	0	0
Ethylbenzol	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0
Propylbenzol	++	+	+	+	+	+	+	++	0	0
Ethylmethylbenzole	+	++	+	+	+	+	+	++	0	0
Trimethylbenzole	+	+	+	+	+	+	+	++	0	0
Diethylbenzole	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Methylpropylbenzole	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Ethylidimethylbenzole	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Tetramethylbenzole	+	++	+	+	+	+	+	+	0	0
C5-Benzole	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0
C6-Benzole	0	+	0	+	+	+	++	+	0	0

Phenylalkane

2-,3-,4-,5-Phenyldecane	++	+	++	+	++	++	+	+	0	0
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	0
2-,3-,4-,5-,6-Phenylododecane	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	0
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	0
4-,5-,6-Phenyltetradecane	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0

Alkylphenoethoxylylate / Metabolite

p-Octylphenole	0	n.v.	0	+	+	+	0	0	0	0
p-Nonylphenole	+	n.v.	++	+++	+++	+++	+	++	0	0
p-Nonylphenoethoxylylate	0	n.v.	0	+	+	+	0	0	0	0
p-Nonylphenoethoxylylatcarbonsäuren	0	n.v.	0	+	+	+	0	0	0	0

Tabelle 3.11										
Verbindung	N3		N3-99		H1	H1-98	H1-99	H3	H4-98	H4-99
	1997	1999	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999
Polycyclische aromatische KW										
Naphthalin	+	+++	++	++	++	+++	++	++	++	++
Methylnaphthaline	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
C2-Naphthaline	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
C3-Naphthaline	+	+	++	++	++	++	+	++	++	+
C4-Naphthaline	+	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++
Acenaphthen	0	+	+	+	+	+++	++	++	++	0
Acenaphthylen	0	+	+	+	+	++	++	++	++	0
Indan	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0
Methylindane	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Dimethylindane	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Trimethylindane	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Tetramethylindane	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Fluoren	+	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	++
Phenanthren	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C2-Phenanthrene	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
C4-Phenanthrene	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Anthracen	+	+	++	++	++	+++	++	++	++	+++
Fluoranthren	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pyren	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzfluoren	+	+	++	++	++	+++	++	++	++	++
Methylpyrene	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++
Dimethylpyrene	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzo[c]phenanthren	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[a]anthracen	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[fluoranthene	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[e]pyren	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
Benzo[a]pyren	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
Dibenzanthracen	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+
Dibenzpyren	0	+	+	+	+	++	+	+	+	0
N-Heterocyclen										
3-Methylindol	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0
9H-Carbazol	0	+	+	+	+	++	+	+	++	++
Methylcarbazole	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0
Benzo[carbazol	+	+	+	+	+	+	+	+	++	0
Benzoacridin	0	n.v.	0	0	0	0	+	0	+	+

Tabelle 3.11										
Verbindung	N3		N3-99		H1	H1-98	H1-99	H3	H4-98	H4-99
	1997	1999	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999
O-Heterocyclen										
Dibenzofuran	+	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++
Methyldibenzofurane	0	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Benzonaphthofurane	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+
S-Heterocyclen										
Dibenzothiophen	0	++	++	++	++	+++	++	++	+++	0
Methyldibenzothiophene	0	+	+	++	+	++	+	++	++	0
Benzonaphthothiophen	+	+	++	++	++	+++	++	++	++	+
Methylbenzonaphthothiophen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dinaphthothiophen	0	+	0	++	0	++	0	0	0	0
Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile										
1-Naphthalincarbaldehyd	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Naphthalincarbaldehyd	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	0	0
1-Naphthalincarbonitril	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Naphthalincarbonitril	0	0	0	+	0	+	+	0	0	0
Fluorenol	0	+	+	++	+	++	+	0	++	+
Anthron	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	+	0
Anthrachinon	+	n.v.	+	0	+	0	++	0	++	+
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on	+	n.v.	+	0	0	0	+	0	++	+
9-Phenanthren-carbaldehyd	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	0	0
Methylanthrachinone	+	n.v.	+	+	+	+	++	++	+	++
9-Anthracen-carbaldehyd	0	n.v.	0	0	0	0	0	0	0	0
Benzanthron	+	n.v.	+	+	+	+	++	+	++	+
5,12-Naphthacenchinon	0	n.v.	0	+	+	+	0	0	++	0
Weitere aromatische Verbindungen										
Biphenyl	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Diphenylether	0	0	+	++	++	++	++	++	0	0
2,6-Naphthalindicarbonsäure	0	n.v.	0	0	0	0	+	0	0	+
Phthalate / Weichmacher										
Octyl-/Nonylphthalate	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+
Dioctyladipat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triphenylphosphat	0	n.v.	0	0	0	0	+	0	0	0
Geruchsstoffe										
HHCB (Galaxolide)	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0
AHTN (Tonalide)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galaxolidon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.11										
Verbindung	N3		N3-99		H1	H1-98	H1-99	H3	H4-98	H4-99
	1997	1999	1997	1999	1997	1998	1999	1997	1998	1999
2-Methyl-3-(4-tert-butylphenyl)propanal (Lilial)										
4-Oxoisophoron	0	+	0	++	0	0	0	0	0	0
	0	++	+++				++			0
Vitamine und Metabolite										
Vitamin K3 (Menadion)	0	0	0			0	0	0	0	0
Vitamin E (α -Tocopherol)	++	++	+		+	+	++	+	+	+
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	+	++	+++			0	++	0	0	++
Sulfide										
Diisopropyldisulfid	++	0	++		+		0	+++	0	0
Hexylmethyldisulfid	0	0	0		+	+	0	0	0	0
Dipropyltrisulfid	0	0	0		+	+	0	0	0	0
Chlorierte Verbindungen										
Bis(chlorpropyl)ether	0	0	+		+		++	0	0	0
Bis(dichlorpropyl)ether	0	+	0		0	0	0	0	0	0
1,1,2,2-Tetrachlorethan	0	0	+		+	+	0	+	0	0
Tetrachlorethylen	0	+	+		+	+	0	+	0	0
Chlorbenzol	0	+	++				+	++	0	0
Dichlorbenzole	0	0	0		0	0	0	0	0	0
Dibrombenzole	0	+	+		+	+	0	++	0	0
Trichlorbenzole	0	0	0		0	0	0	0	0	0
Hexachlorbenzol	0	0	0		+	+	0	+	0	0
Chlornaphthaline	0	0	+		+	+	0	+	0	0
Dichlornaphthaline	0	0	+		+	+	0	+	0	0
Dichlorbenzoesäure	++	n.v.	+		++	+	+	+	+	++
C14-PCBs	0	0	0		0	0	0	0	0	0
C15-PCBs	+	+	0		+	+	0	+	0	0
C16-PCBs	+	+	+		+	+	0	++	0	0
C17-PCBs	+	+	+		+	+	0	+	0	0
C18-PCBs	0	0	0		0	0	0	+	0	0
C19-PCBs	0	0	0		0	0	0	0	0	0
C10-PCB	0	0	0		0	0	0	0	0	0
Pestizide und Metabolite										
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)	0	0	0		0	+	0	0	0	0
o,p'-DDE	0	0	+		+		0	+++	0	0
p,p'-DDE	+	+	+		+	+	0	+++	0	0
o,p'-DDD	0	+	0		+	+	0	++	0	0
p,p'-DDD	0	+	0		+	+	0	++	0	0

Tabelle 3.11								
Verbindung	N3 1997	N3-99 1999	H1 1997	H1-98 1998	H1-99 1999	H3 1997	H4-98 1998	H4-99 1999
<i>o,p'</i> -DDT	0	+	0	+	0	+	0	0
<i>p,p'</i> -DDT	0	+	0	+	0	+	0	0
<i>p,p'</i> -Dichlorbenzophenon	0	0	++	0	0	+	0	0
2'-Hydroxy-2,4,4'-trichlordiphenylether (Triclosan)	+	n.v.	+	+	+	+	0	+
α -HCH	0	0	0	+	0	+	0	0
β -HCH	0	0	0	0	0	+	0	0
γ -HCH	0	0	0	0	0	+	0	0
Aldrin	0	+	0	+	0	++	0	0
Bromophos	0	+	0	++	0	++	0	0
Ethylbromophos	0	+	0	++	0	++	0	0
Heptachlorepoxid	0	0	0	++	0	++	0	0
Endosulfan-sulfat	0	0	0	0	0	0	0	0
1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)- bicyclo[2,2,1]hept-2-en	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.12

Verbindung

	F4	F4U	F4F	F5	F5F	F7	F7U	F7F	F8	F8U	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Aliph. Kohlenwasserstoffe																
<i>n</i> -Decan bis <i>n</i> -Tetriacontan	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++++	++	++++	++	++++	++++
Aliph. Aldehyde und Ketone																
<i>n</i> -Octanal bis <i>n</i> -Dotriacontanal	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
<i>n</i> -Octan-2-on bis <i>n</i> -Octacosan-2-on	++	+	0	+	+	+	+	+	+	++	++	+	++	0	+	0
Carbonsäuren																
<i>n</i> -Decan- bis <i>n</i> -Dotriacontansäure	+++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
Palmitoleinsäure	++	+	+	++	++	++	+	+++	++	0	+++	+	+++	++	+++	+++
Ölsäure	++	++	+	+++	+++	++	+	+++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++
Linolsäure	++	+	+	++	++	+	+	++	++	++	+++	0	++	++	++	+++
Linolensäure	+	0	0	+	++	+	+	++	+	+	+	0	+	+	+	+
<i>iso</i> -Pentadecansäure	+++	++	+	+++	++	+	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
<i>anteiso</i> -Pentadecansäure	+++	++	+	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	+	++	++	++
<i>iso</i> -Hexadecansäure	+	+	+	++	++	+	+	++	+	0	++	+	+	+	+	++
<i>anteiso</i> -Hexadecansäure	++	0	0	+	+	0	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>iso</i> -Heptadecansäure	++	++	+	++	++	+	+	++	++	0	++	++	++	++	++	++
<i>anteiso</i> -Heptadecansäure	++	++	+	++	++	+	+	+	++	0	++	+	+	++	++	++
<i>iso</i> -Octadecansäure	0	0	0	+	++	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+
<i>anteiso</i> -Octadecansäure	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>iso</i> -Nonadecansäure	+	+	0	+	+	0	0	+	++	0	++	0	+	++	+	+
<i>anteiso</i> -Nonadecansäure	+	+	0	+	+	0	0	+	++	0	+	0	+	++	+	+
<i>iso</i> -Eicosansäure	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
<i>anteiso</i> -Eicosansäure	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>iso</i> -Heneicosansäure	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+
<i>anteiso</i> -Heneicosansäure	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	++	++	+
Terpenoide																
Pristan	++	++	++	++	++	+++	+	+	++	0	0	++	++	++	++	0
Phytan	+	+	+	+	+	+	+	+	++	0	+	++	+	++	++	0
Phytan	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	0	0	++	+	++	++	0
Phytadien	0	0	0	+	+	++	+	+	+	0	+	++	0	++	++	+++
Abietinsäure	++	+	+	+	++	+	+	0	++	0	+	0	0	++	++	++
Dehydroabietinsäure	++	++	++	++	+	+	++	0	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++
Tetrahydroabietinsäure	++	++	+	++	+	++	+	0	++	0	+	0	0	++	++	++
Dehydroabietin	++	++	+	+	+	++	+	+	++	++	++	+	++	++	++	++
Tetrahydroreten	+	+	+	++	++	++	++	0	+	+	++	++	++	++	++	++
Reten	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++
Dehydroabietan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	++	++	++
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on	++	+	+	0	+++	++	+	+	++	++	+++	++	++	++	++	++

Tabelle 3.12

Verbindung

	F4	F4U	F4F	F5	F5F	F7	F7U	F7F	F8	F8U	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Squalen	+++	++	0	++	++	+++	+	+	++	0	+++	++	++	++	+++	+++
Cholesterin	+++	+++	+++	+	+++	++	++	+++	+++	0	++	+++	+++	+++	+++	+++
5 α H-Cholestan-3 β -ol	++	++	++	0	+	++	+	+	+++	0	++	++	++	++	++	++
5 β H-Cholestan-3 β -ol	+++	+++	+++	0	+++	++	+	+	+	0	+	++	++	+	+++	+
5 α H-Cholestanon	+++	++	++	0	+	++	+	+	0	0	0	+	++	0	0	+
5 β H-Cholestanon	+++	++	++	0	+++	++	+	+	+	0	+	++	++	+	+	+
5 α H-Ergostan-3 β -ol	+	+	+	0	+	+	+	+	++	0	+	+	+	+	+	+
5 β H-Ergostan-3 β -ol	++	+	+	0	++	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0
5 α H-Ergostanon	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+
5 β H-Ergostanon	++	+	+	0	+++	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0
5 α H-Stigmastan-3 β -ol	++	+	+	0	+	++	++	++	+++	0	++	++	++	++	++	++
5 β H-Stigmastan-3 β -ol	+++	++	++	0	++	++	+	+	++	0	+	+	++	+	++	++
5 α H-Stigmastanon	++	+	+	0	+	++	++	++	+	0	+	++	++	0	++	++
5 β H-Stigmastanon	++	+	+	0	++	+	+	+	0	0	+	++	++	0	+	+
Stigmasten-3 β -ol	+++	+++	++	+	+++	++	+++	+++	++	0	++	+++	+	+	++	++

Alkylbenzole

Xylol	+	0	0	0	++	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+
Ethylbenzol	+	0	0	0	++	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0
Propylbenzol	+	0	0	0	++	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
Ethylmethylbenzole	+	0	0	0	++	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
Trimethylbenzole	++	+	+	+	+++	+	++	+	+	+	0	+	0	+	0	0
Diethylbenzole	+	0	0	0	++	+	+	+	++	0	++	+	0	+	0	0
Methylpropylbenzole	+	0	0	0	++	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0
Ethylidimethylbenzole	++	+	0	0	++	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0
Tetramethylbenzole	+	0	0	0	++	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0
C5-Benzole	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0
C6-Benzole	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0

Phenylalkane

2-,3-,4-,5-Phenyldecane	++	+	+	+++	+	++	+	0	++	+	++	+	+	++	++	+
2-,3-,4-,5-,6-Phenylundecane	+++	+	+	++++	+++	++++	++	0	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	++
2-,3-,4-,5-,6-Phenylododecane	++++	++	+	++++	+++	++++	++	0	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++
2-,3-,4-,5-Phenyltridecane	++++	++	+	++	+++	++++	++	0	++	++	+++	+	+++	+++	+++	++
4-,5-,6-Phenyltetradecane	+	0	0	++	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0

Alkylphenoethoxylylate / Metabolite

p-Octylphenole	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
p-Nonylphenole	++	+	++	++	+	+	+	+	++	+	0	0	0	++	++	0
p-Nonylphenoethoxylylate	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+
p-Nonylphenoethoxylylcarbonsäuren	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	++

Tabelle 3.12

Verbindung

F4	F4U	F4F	F5	F5F	F7	F7U	F7F	F8	F8U	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Naphthalin	+++	++	+	++++	+++	+++	+	+++	+	+++	+	+	+++	++	+++
Methylnaphthaline	+++	++	+	++++	+++	+++	+	+++	++	+++	+	++	+++	++	+++
C2-Naphthaline	+++	++	+	++++	+++	+++	+	++	++	+++	0	++	+++	++	++
C3-Naphthaline	++	+	+	+++	+++	+++	0	++	+	+++	+	++	++	++	+
C4-Naphthaline	+	0	0	+++	+++	+	0	++	+	+++	0	++	+	++	++
Acenaphthen	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	++	0	+++	++
Acenaphthylen	++	+	+	++	++	+	+	+	++	++	+	++	+	+	++
Indan	+	+	0	++	++	+	0	+	0	++	+	0	+	+	+
Methylindane	+	0	0	+	+	+	0	+	0	++	+	0	+	0	+
Dimethylindane	+	0	0	+	+	+	0	+	0	++	+	0	+	0	+
Trimethylindane	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+
Tetramethylindane	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	++	0	++	+	+
Fluoren	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Phenanthren	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C2-Phenanthrene	++	++	++	++	++	++	++	++	0	++	+	++	++	++	++
C4-Phenanthrene	0	0	0	++	++	+	+	+	0	+	++	++	+	+	++
Anthracen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	++	+++	++	++
Fluoranthen	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++
Pyren	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++
Benzfluoren	+	0	0	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Methylpyrene	+	0	0	+++	+	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++
Dimethylpyrene	+	0	0	++	+	++	++	++	++	+	+	++	+	+	++
Benzo[c]phenanthren	++	+	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Benzo[a]anthracen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Benzo[fluoranthene	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Benzo[e]pyren	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
Benzo[a]pyren	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
Dibenzanthracen	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	+	++	++
Dibenzpyren	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++

N-Heterocyclen

3-Methylindol	0	0	0	+++	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
9H-Carbazol	+	++	++	+++	+	++	0	++	++	++	+	++	++	++	++
Methylcarbazole	0	0	0	++	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	++
Benzocarbazol	++	++	++	++	+	+	+	+	0	++	+	++	0	0	+
Benzoacridin	0	++	++	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+

polycyclische aromatische KW

Tabelle 3.12

Verbindung

F4	F4U	F4F	F5	F5F	F7	F7U	F7F	F8	F8U	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F
1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997

O-Heterocyclen

Dibenzofuran	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Methyldibenzofurane	+++	+	+++	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++
Benzonaphthofurane	+++	++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+	+	++	0	++	+

S-Heterocyclen

Dibenzothiophen	+	0	0	+++	++	+	0	++	+++	+++	+	++	+	++	++
Methyldibenzothiophene	0	0	0	++	+	+	0	+++	+	++	+	+	+++	+	++
Benzonaphthothiophen	++	0	0	++	++	++	++	+	0	++	+	++	+	0	++
Methylbenzonaphthothiophen	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+
Dinaphthothiophen	0	0	0	++	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+

Aromat. Aldehyde, Ketone und Nitrile

1-Naphthalincarbaldehyd	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
2-Naphthalincarbaldehyd	0	0	++	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
1-Naphthalincarbonitril	+	++	+	0	+	0	++	0	0	++	0	++	0	+	+
2-Naphthalincarbonitril	++	+++	+++	++	++	+	0	+	+	++	++	+	+	+	++
Fluorenol	+	+	++	++	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0
Anthron	++	++	+++	++	+	+	+	++	+	0	+	+	+	+	0
Anthracinon	++	++	+++	++	0	+	+	++	0	0	+	+	++	+	0
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-on	0	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
9-Phenanthren-carbaldehyd	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+	0
Methylanthracinone	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
9-Anthracen-carbaldehyd	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Benzanthron	+	++	+++	++	+	+	+	++	0	+	+	+	++	0	+
5,12-Naphthacenchinon	+	+	++	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0

Weitere aromatische Verbindungen

Biphenyl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	++	++	++
Diphenylether	0	0	+	++	++	0	0	+	+	++	0	++	0	++	++
2,6-Naphthalindicarbonsäure	++	++	++	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	++	+

Phthalate / Weichmacher

Octyl-/Nonylphthalate	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+
Diisooctyladipat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triphenylphosphat	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+

Geruchsstoffe

HHCB (Galaxolide)	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0
AHTN (Tonalide)	+	+	+	+	++	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0
Galaxolidon	+	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.12**Verbindung**

Tabelle 3.12																															
Verbindung																															
F4	1997	F4U	1997	F4F	1997	F5	1997	F5F	1997	F7	1997	F7U	1997	F7F	1997	F8	1997	F8U	1997	F8F	1997	F9	1997	F9F	1997	F10	1997	F10U	1997	F10F	1997
2-Methyl-3-(4- <i>tert</i> -butylphenyl)propanal (Lilial)																															
4-Oxoisophoron																															
Vitamine und Metabolite																															
Vitamin K3 (Menadion)																															
Vitamin E (α -Tocopherol)																															
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide																															
Sulfide																															
Diisopropylsulfid																															
Hexylmethylsulfid																															
Dipropyltrisulfid																															
Chlorierte Verbindungen																															
Bis(chlorpropyl)ether																															
Bis(dichlorpropyl)ether																															
1,1,2,2-Tetrachlorethan																															
Tetrachlorethylen																															
Chlorbenzol																															
Dichlorbenzole																															
Dibrombenzole																															
Trichlorbenzole																															
Hexachlorbenzol																															
Chlornaphthaline																															
Dichlornaphthaline																															
Dichlorbenzoesäure																															
C14-PCBs																															
C15-PCBs																															
C16-PCBs																															
C17-PCBs																															
C18-PCBs																															
C19-PCBs																															
C10-PCB																															
Pestizide und Metabolite																															
N,N-Diethyl-3-methylbenzamid (DEET)																															
<i>o,p'</i> -DDE																															
<i>p,p'</i> -DDE																															
<i>o,p'</i> -DDD																															
<i>p,p'</i> -DDD																															

Tabelle 3.12		F4	F4U	F4F	F5	F5F	F7	F7U	F7F	F8	F8U	F8F	F9	F9F	F10	F10U	F10F
Verbindung		1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997	1997
o,p'-DDT p,p'-DDT p,p'-Dichlorbenzophenon 2-Hydroxy-2,4,4'-trichloridiphenylether (Triclosan) α-HCH β-HCH γ-HCH Aldrin Bromophos Ethylbromophos Heptachlorepoxid Endosulfan-sulfat 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-5,6-bis(methylene)-bicyclo[2,2,1]hept-2-en	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	+
	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	+
	+	+	+	+	+	++	0	++	+++	+	++	0	+	0	++	++	++
	++	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+
	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	++	++
	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+	0	++	0	+	++
	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	++	0	++	++
	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	++	++
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++

Anhang B

Sicherheitshinweise

Die folgende Liste umfasst sämtliche Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Gefahrstoffe sind, soweit vorhanden, mit den jeweiligen Gefahrensymbolen, R- und Sätzen versehen worden.

Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, dass man sich mit diesen Stoffen in irgendeiner Weise kontaminiert und diese Stoffe in die Umwelt eingebracht werden. Diese Verbindungen sind in der Liste mit leeren Feldern für die Gefahrensymbole, R- und S-Sätze gekennzeichnet.

Substanzname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F	11-36-66-67	(2-)9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetophenon	Xn	22-36	26
Aluminiumchlorid	Xi	36/37/38	26
Aluminiumiodid	C	14-34-40-42/43	22-26-36/37/39-45
4-Aminoantipyrin	Xn	22-36/37/38	26-36
3-Aminodibenzofuran			
Benzoessäure	Xn	22-36	26
Benzol	F, T	45-11-48/23/24/25	53-16-45
Benzophenon	Xi	36/37/38-52/53	26-36
Biphenyl	Xi, N	36/37/38-50/53	23-60-61
Brom	T+, C, N	26-35-50	26-45-61-7/9
4-Chlorbiphenyl	Xi	36/37/38	26-36
Chloramphenicol	T	45	53-45
Chloranil	Xi, N	36/38-50/53	37-60-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Cyclohexanon	Xn	10-20	25
Diazald	E, Xi	2-36/37/38-43	15-26-35-36/37
Dibenzofuran			22-24/25
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33

2,3-Dihydroxybiphenyl	Xi	36/37/38	26-36
4,4'-Dihydroxybiphenyl	Xn	21-36/37/38	26-36
1,2-Dimethoxybenzol	Xn	22	36
Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Eisen(III)chlorid	Xn	22-38-41	26-39
Eisessig	C	10-35	23-26-45
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Hexan	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
2-Hydroxybiphenyl	Xi, N	36/37/38-50	22-61
3-Hydroxybiphenyl	Xi	36/37/38	26-36
4-Hydroxybiphenyl	Xi	36/37/38	26-36/37
Iodbenzol	Xn	22-36	26-36
Kieselgel			22-24/25
Kupferiodid	Xn	22-36/37/38	26-36
Kupferpulver	F	11	16
Magnesiumsulfat			22-24/25
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide	C	10-34	16-26-36/37/39-45
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane	F, C	11-34	26-36/37/39-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriummethanolat	F, C	11-14-34	8-16-26-43-45
Natriumnitrit	O, T, N	8-25-50	45-61
4-Nitrobenzylidiazonium tetrafluoroborate	Xn	20/21/22-36/37/38	22-24/25-36/39
Oxalsäure	Xn	21/22	24/25
Oxalylchlorid	C	14-20-29-34	26-36/37/39-43-45
Pentan	F+, Xn, N	12-51/53-65-66-67	9-16-29-33-61-62
Petrolether	F, Xn	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Phenol	T, C	23/24/25-34-48/20/21/22-68	24/25-26-28-36/37/39-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Pyridinhydrobromid	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
Pyridinhydrochlorid	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36

Rose Bengal			22-24/25
Salizylsäure	Xn	22-41	26-39
Salzsäure, wässrig	C	10-20-34	26-36/37/39-45
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
Tetradekan	Xn	65-67	23-24-62
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Trichloressigsäurechlorid	T+	14-22-26-34	26-28-36/37/39-45
1,2,3-Trimethoxybenzol			22-24/25
1,2,3-Trimethoxybenzol			22-24/25
Wasserstoff	F+	12	9-16-33

R - Sätze

- R 1 Im trockenen Zustand explosionsgefährlich
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig
- R 7 Kann Brand verursachen
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen
- R 10 Entzündlich
- R 11 Leichtentzündlich
- R 12 Hochentzündlich
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 16 explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger / leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
- R 19 Kann explosionsgefährliche Peroxide bilden
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut

R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 23 Giftig beim Einatmen
R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25 Giftig beim Verschlucken
R 26 Sehr giftig beim Einatmen
R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
R 28 Sehr giftig beim Verschlucken
R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden
R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen
R 34 Verursacht Verätzungen
R 35 Verursacht schwere Verätzungen
R 36 Reizt die Augen
R 37 Reizt die Atmungsorgane
R 38 Reizt die Haut
R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
R 40 Irreversibler Schaden möglich
R 41 Gefahr ernster Augenschäden
R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss
R 45 Kann Krebs erzeugen
R 46 Kann vererbare Schäden verursachen
R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei länger Exposition
R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen
R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen
R 51 Giftig für Wasserorganismen
R 52 Schädlich für Wasserorganismen
R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 54 Giftig für Pflanzen
R 55 Giftig für Tiere
R 56 Giftig für Bodenorganismen
R 57 Giftig für Bienen
R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben
R 59 Gefährlich für die Ozonschicht

- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
- R 68 Irreversibler Schaden möglich

Kombinationen der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgans und die Haut
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens beim Verschlucken
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken

R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut

R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken

R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut

R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken

R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 40/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 40/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut

R 40/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken

R 48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken

R 48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 68/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 68/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut

R 68/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

- R 68/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 68/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 68/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 68/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken

S - Sätze

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
- S 3 Kühl aufbewahren
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten
- S 5 Unter... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
- S 5.1 Unter Wasser aufbewahren
- S 5.2 Unter Petroleum aufbewahren
- S 5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren
- S 6 Unter... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
- S 6.1 Unter Stickstoff aufbewahren
- S 6.2 Unter Argon aufbewahren
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 8 Behälter trocken halten
- S 9 Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
- S 14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
- S 14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten
- S 14.2 Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen fernhalten
- S 14.3 Von Eisen fernhalten
- S 14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten
- S 14.5 Von Säuren fernhalten
- S 14.6 Von Laugen fernhalten
- S 14.7 Von Metallen fernhalten
- S 14.8 Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten
- S 14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten

- S 14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten
- S 14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 15 Vor Hitze schützen
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen
 - S 23.1 Gas nicht einatmen
 - S 23.2 Dampf nicht einatmen
 - S 23.3 Aerosol nicht einatmen
 - S 23.4 Rauch nicht einatmen
 - S 23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (Vom Hersteller anzugeben)
 - S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
 - S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
 - S 28.3 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400
 - S 28.4 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 300 und Ethanol und anschließend mit viel Wasser und Seife
 - S 28.5 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400
 - S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser
 - S 28.7 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden

- S 35.1 Abfälle und Behälter müssen durch Behandeln mit 2%-iger Natronlauge beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen
- S 40.1 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Bei Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen und ... (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen ... (vom Hersteller anzugeben) verwenden (wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: "Kein Wasser verwenden")
- S 43.1 Zum Löschen Wasser verwenden
- S 43.2 Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden
- S 43.3 Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden
- S 43.4 Zum Löschen Kohlendioxid, kein Wasser verwenden
- S 43.6 Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden
- S 43.7 Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden
- S 43.8 Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur in Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 50.1 Nicht mischen mit Säuren
- S 50.2 Nicht mischen mit Laugen
- S 50.3 Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen

- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden
- S 59 Information zur Wiederverwendung/ Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rateinholen und Verpackung oder das Etikett vorzeigen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhig stellen
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist)

Kombinationen der S-Sätze

- S 1/2 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren
- S 3/9 Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 3/9/14 An einem kühlen, gut belüfteten Ort entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/14.1 An einem kühlen, gut belüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren
- S 3/9/14.2 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen aufbewahren
- S 3/9/14.3 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren
- S 3/9/14.4 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren
- S 3/9/14.5 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren
- S 3/9/14.6 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren
- S 3/9/14.7 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren
- S 3/9/14.8 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren
- S 3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
- S 3/9/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 3/14 An einem kühlen, von ... entfernten Ort aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
- S 7/8 Behälter trocken und dicht geschlossen halten

- S 7/9 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 7/47 Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)
- S 20/21 Bei der Arbeit nicht essen, trinken und Rauchen
- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 29/56 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen und diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 36/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 47/49 Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur nicht über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe.
Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine
anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, den 12. März 2006