

Name der Forschungsstelle(n)

IGF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.03.07 - 30.06.09

Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum : 01.03.07 - 30.06.09

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Untersuchungen zu Herkunft und Verbleib von endokrin wirksamen Substanzen bei der Papierherstellung und zum Potenzial für deren Abtrennung in Prozessen der Stoffaufbereitung

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigefügt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Darmstadt, den 19.10.2009

Ort, Datum


Unterschrift der/des Projektleiter(s)

Zusammenfassung

Erste orientierende Untersuchungen in der deutschen Papierindustrie haben ergeben, dass biologisch gereinigte Papierfabriksabwässer endokrine Wirkungen aufweisen können. Basis dieser Untersuchungen waren Tests, die mit dem in der Standardisierung befindlichen in vitro-Testsystem Recombinant Yeast Estrogen Assay (R-YEA) durchgeführt worden sind. Aus den Ergebnissen früherer Untersuchungen ging weiterer Klärungsbedarf hervor, der insbesondere folgende Themen betrifft:

- Verlauf der endokrinen Wirkung von Entnahme des Brauchwassers (Oberflächengewässer, Brunnen) bis zum gereinigten Ablauf der mehrstufigen Abwasserreinigungsanlage,
- Vergleich der Untersuchungsergebnisse des in vitro-Testes mit einem standardisierten in vivo-Testverfahren zur Beurteilung der Wirkung auf aquatische Organismen,
- Identifizierung von Einzelsubstanzen, die im biologisch gereinigten Papierfabriksabwasser eine endokrine Wirkung hervorrufen können,
- Untersuchung der endokrinen Wirkung von Faserstoffen und chemischen Additiven als Rohstoffen der Papierherstellung,
- Untersuchungen zur endokrinen Wirkung und endokrin wirksamen Inhaltsstoffen von fertigen Papieren.

Innerhalb des vorliegenden Projekts sind insgesamt 16 verschiedene Papierfabriken aus allen relevanten Sortenbereichen, mit unterschiedlichen (Faser-)Rohstoffen und Abwasserreinigungstechnologien, teilweise mehrfach, beprobt worden. Die Analyse der biologisch gereinigten Papierfabriksabwässer hat ergeben, dass in 12 der 16 Papierfabriken bei mindestens einer Probenahme eine endokrine Wirkung ermittelt wurde. Alle diese 12 Werke verarbeiten entweder Altpapier und/oder Holzstoff. Als Quellen dieser endokrinen Wirkungen, die zunächst mit dem R-YEA-Test untersucht worden sind, kommen weder das Brauchwasser, noch die eingesetzten chemischen Additive in Betracht, für die jeweils in umfangreichen Testserien keine endokrine Wirkung ermittelt wurde. Bei der Untersuchung der Faserrohstoffe gab es keine einheitlichen Ergebnisse. Insgesamt wurden 24 verschiedene Extrakte von Holzstoffen und Altpapieren nach Desintegration unter Standardbedingungen untersucht. Dabei ergab der R-YEA-Test für die Holzstoffe größtenteils Induktionsraten unter 0,7, die als antiöstrogen wirksam interpretiert werden müssen. Ein großer Teil der untersuchten Altpapiere wies Induktionsraten zwischen 0,8 und 1,2 auf. Diese Proben sind nicht endokrin wirksam. Allerdings wiesen zwei Altpapiere der Altpapiersorte 1.04 (Kaufhausaltpapier) mit Werten von 2,1 und 2,9 eine signifikante endokrine Wirkung auf.

Die Zuläufe zu den Abwasserreinigungsanlagen konnten in vielen Fällen aufgrund erhöhter Zytotoxizität nicht mittels R-YEA untersucht werden, dies gilt auch für einige der Abläufe der ersten biologischen Reinigungsstufen (anaerob oder aerob). Eine Korrelation der endokrinen Wirkung mit definierten kritischen Inhaltsstoffen aus der Gruppe der Xenobiotika (Pentachlorphenol, Bisphenol A, Phthalate, Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe) konnte nicht festgestellt werden. Diese Inhaltsstoffe waren nur in Ausnahmefällen in Spurenkonzentrationen überhaupt messbar. Die ermittelten Gehalte lagen unterhalb bzw. innerhalb der Werte, die für diese ubiquitär verbreiteten Stoffe in deutschen Oberflächengewässern regelmäßig gemessen werden. Als Quellen für eine mögliche endokrine Wirkung im Abwasser von Papierfabriken werden daher natürliche Pflanzeninhaltsstoffe aus dem Holz (Phytohormone) vermutet, die durch die Holzstoffherzeugung und -verarbeitung

sowie die Prozesse der Altpapieraufbereitung in das Kreislaufwasser und die Abwasserreinigung gelangen. Dafür kommen z. B. Vertreter der Lignane, Sterole und Flavonoide in Betracht, die im Kern- und Splintholz von Bäumen vorkommen und wegen der hohen Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor schon in äußerst geringen Konzentrationen im R-YEA-Test eine endokrine Wirkung ergeben können. Für die Analyse von nicht bekannten Substanzen im Abwasser im Konzentrationsbereich von wenigen ng/l wurden Untersuchungsmethoden entwickelt, bei denen die Analyten mittels Stir Bar Sorptive Extraction angereichert und über die nachfolgende Thermodesorption-GC/MS identifiziert werden können.

Für fünf Serien von Abwasserproben wurde zusätzlich zu der Untersuchung mittels in vitro-Testverfahren die Untersuchung der Wirkung auf aquatische Organismen (in vivo-Test) durchgeführt. Grundlage des gewählten Verfahrens ist die Exposition von Zebrabärblingen (*Danio rerio*) über einen Zeitraum von 10 Tagen mit dem zu untersuchenden Abwasser. Die Erfassung der endokrinen Wirkung erfolgt dabei über die Messung des Vitellogenin-Gehaltes (Biomarker) im Totalhomogenat der männlichen und weiblichen Fische. Mit einer Ausnahme ergaben diese Untersuchungen eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse des R-YEA-Testes auf den in vivo-Test. Alle untersuchten biologisch gereinigten Papierfabriksabwässer wiesen im in vivo-Test keine signifikante endokrine Wirkung auf die Zebrabärblinge auf. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann für die deutsche Papierindustrie nach aktuellem Kenntnisstand kein weiterer Handlungsbedarf im Hinblick auf die Reduzierung endokriner Wirkungen des gereinigten Abwassers festgestellt werden.

Alle Extrakte und Eluate der untersuchten Papiere (insgesamt 25 Papiere aus den Sortenbereichen Grafische Papiere, Verpackungspapiere und Tissue-Papiere) waren im R-YEA-Test endokrin nicht wirksam.

Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	4
1.1 Endokrines System und endokrine Substanzen	5
1.1.1 Methoden zur Untersuchung endokriner Wirkungen	6
1.1.2 Identifizierung und mögliche Herkunft endokrin wirksamer Substanzen in Papierfabrikationsabwässern	7
1.2 Ergebnisse bisheriger Untersuchungen	9
2 Forschungsziel, Lösungsweg und Untersuchungsmethoden	12
2.1 Forschungsziel	12
2.2 Lösungsweg	12
2.3 Untersuchungsmethoden	14
2.3.1 Probenvorbereitung für Untersuchung auf endokrine Wirkung	14
2.3.1.1 Probenvorbereitung Wasser- und Abwasserproben	15
2.3.1.2 Probenvorbereitung Faserstoffe und Altpapiere	15
2.3.1.3 Probenvorbereitung Papiere	15
2.3.2 Probenvorbereitung für Einzelstoff-Analytik mittels GC/MS	16
2.3.2.1 Probenvorbereitung der Abwasserproben für die Analyse auf definierte, potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe	16
2.3.2.2 Probenvorbereitung der Wasser- und Abwasserproben auf die Untersuchungen zur Identifizierung unbekannter Inhaltsstoffe	16
2.3.2.3 Probenvorbereitung Papiere	19
2.3.3 Methoden zur Untersuchung der endokrinen Wirkung von Abwasserproben	19
2.3.3.1 In vitro-Untersuchungen mit dem Recombinant Yeast Estrogen Assay (R-YEA)	20
2.3.3.2 In vivo-Untersuchungen	23
2.3.4 Untersuchungen zu Einzelstoffen mittels GC/MS	27
2.3.4.1 Analyse von gereinigten Papierfabriksabwässern auf definierte, potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe	27
2.3.4.2 Untersuchung und Identifizierung von Abwasserinhaltsstoffen nach Anreicherung der Analyten durch SBSE	28
2.3.4.3 Untersuchung von Papieren durch Thermodesorption-GC/MS	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Untersuchungen zur endokrinen Wirkung und zu Inhaltsstoffen von Abwässern aus der Papierherstellung	29
3.1.1 Untersuchung der endokrinen Wirkung von (Ab-)Wasserproben mittels R-YEA-Testverfahren	29
3.1.1.1 Abwasserscreening	29
3.1.1.2 Wiederholbarkeit der Messergebnisse	36
3.1.1.3 Einfluss der Filtration auf die endokrine Wirkung der Abwasserprobe	38

3.1.2	Vergleichende Untersuchungen mittels in vivo- und in vitro-Testverfahren	40
3.1.3	Untersuchungen zu Inhaltsstoffen in Abwasserproben mit Hilfe von GC/MS	48
3.1.3.1	Untersuchung von biologisch gereinigten Papierfabriksabwässern auf definierte endokrin wirksame Xenobiotika	49
3.1.3.2	Methodenentwicklung PDMS-Twister zur Analyse von bisher nicht identifizierten Abwasserinhaltsstoffen	50
3.1.3.3	Untersuchung von Abwasserproben der Papierindustrie nach SBSE mit PDMS-Twistern und anschließender Thermodesorption-GC/MS	55
3.1.3.4	Methodenentwicklung Acrylat-Twister	64
3.1.3.5	Untersuchung von Abwasserproben der Papierindustrie nach SBSE mit Acrylat-Twistern und anschließender Thermodesorption-GC/MS	65
3.2	Untersuchungen von Abwasserproben aus Abbautests (aerob/anaerob)	68
3.2.1	Untersuchungen zum aeroben Abbau von ARA-Zuläufen mittels Zahn-Wellens-Test	68
3.2.2	Untersuchungen zum anaeroben Abbau von ARA-Zuläufen mittels PTS-Prüfmethode PTS-WA 003/07	73
3.3	Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von chemischen Additiven für die Papierherstellung	75
3.3.1	Auswahl relevanter Additive	75
3.3.2	Untersuchungen ausgewählter Additive mit R-YEA-Testverfahren	78
3.4	Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von Faserstoffen (Primär- und Sekundärfaserstoffen)	87
3.5	Untersuchungen zur endokrinen Wirkung und Inhaltsstoffen von Papieren ..	88
3.5.1	Untersuchungen mittels R-YEA	89
3.5.2	Einzelstoff-Untersuchungen mittels Thermodesorption-GC/MS	90
4	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen	92
4.1	Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse	92
4.2	Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU	93
5	Veröffentlichungen und Vorträge, Ergebnistransfer	94
6	Danksagung	95
7	Literatur	96

Abkürzungsverzeichnis

AP	Altpapier
ARA	Abwasserreinigungsanlage
BPA	Bisphenol A
BW	Blindwert
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DWA	Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V.
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU-WRRL	EU-Wasserrahmenrichtlinie
GC/MS	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor
G _{EH}	Verdünnungsstufen in R-YEA-Test
HS	Holzstoff
IR	Induktionsrate β -Galaktosidase im R-YEA
kDa	Kilodalton, 1 kDa = 1.000 Da, 1 Da = 1/12 der Masse ¹² C-Isotops
K _{OW}	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
KWE	Kaltwasserextrakt
LC 50	mittlere letale (Stoff-)Konzentration für 50 % der beobachteten Population
LM	Lebensmittel
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
otro	ofentrocken
PAK	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCP	Pentachlorphenol
PDMS	Polydimethylsiloxan
RT	Retentionszeit
R-YEA	Recombinant Yeast Estrogen Assay
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TDS	Thermodesorptions-System
TIC	Totalionenchromatogramm
TMDD	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol
TMP	Thermomechanical Pulp
VTG	Vitellogenin
ZS	Zellstoff
ZWT	Zahn-Wellens-Test

1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Endokrin wirksame Stoffe sind seit einigen Jahren verstärkt in den Blickpunkt von Wissenschaft, Öffentlichkeit und politischen Entscheidungsgremien gerückt. Hintergrund sind zahlreiche Studien, die belegen, dass verschiedenartige Stoffe in den Hormonhaushalt von Organismen eingreifen und deren Reproduktionsfähigkeit negativ beeinflussen können. Dieser Effekt wurde insbesondere bei aquatischen Organismen festgestellt, so dass die Frage nach der Ursache und der Herkunft endokrin wirksamer Substanzen in den Oberflächenwässern zu klären ist.

Neben anderen Industriebranchen, wie der Textil- und Kosmetikindustrie, gibt es seit ca. 20 Jahren Untersuchungen im Ablauf und im Abstrom von Zellstofffabriken, die sich mit dem Vorkommen und dem Einfluss endokrin wirksamer Stoffe auf aquatische Lebewesen befassen. Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich in Nordamerika und Nordeuropa durchgeführt. Papierfabriken wurden nur in Ausnahmefällen betrachtet, soweit Werke mit integrierter Zellstoffherstellung in diese Studien einbezogen wurden. In [1] ist der derzeitige Stand des Wissens über die Auswirkungen endokriner Substanzen im Abfluss von Zellstoffwerken zusammenfassend und ausführlich dargelegt. In einigen der genannten Untersuchungen wurden endokrine Effekte nachgewiesen. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um Beeinflussungen der Reproduktions- und Leberparameter. Nach dem derzeitigen Wissenstand können, neben natürlichen Stoffen, den Phytohormonen, deren Ursprung das Holz selbst ist, anthropogene Stoffe aus Additiven, Druckfarben etc. für die endokrinen Wirkungen des Abwassers verantwortlich sein. Nach wie vor bestehen jedoch erhebliche Wissenslücken zu den Reaktionsmechanismen, den auslösenden Substanzen und deren Verhalten im Produktionsprozess bzw. bei der Abwasserbehandlung.

Zwischenzeitlich wurden auch einzelne Untersuchungen zur Konzentration von endokrin wirksamen Stoffen in Papieren beschrieben [2, 3, 4, 5], die zumindest für Papiere auf Altpapierbasis Hinweise auf das mögliche Vorkommen von endokrin wirksamen Substanzen gegeben haben.

Im Rahmen der Altstoffbewertung der EU wurden für einzelne endokrine Substanzen Risikoabschätzungen für die Wirkung dieser Stoffe auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit durchgeführt. Für einige dieser Stoffe, die auch in der Papierindustrie Verwendung finden, sind in diesem Zusammenhang Maßnahmen zur Risiko- und Expositionsminimierung gefordert worden. Dazu gehören die Nonylphenole und deren Verbindungen [6] sowie das Bisphenol A [7]. Aufgrund der unklaren Datenlage wurde ergänzend zu der Risikoabschätzung für Bisphenol A eine separate nachträgliche Bewertung der Auswirkungen des Recyclings von Thermopapier durchgeführt [8].

Im Jahr 2003 wurden durch das Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik der TU Darmstadt (PMV) in Zusammenarbeit mit der PTS München im Rahmen des Projektes „Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie“ [9, 10] erstmals orientierende Untersuchungen in der deutschen Papierindustrie zu dieser Thematik durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden im Jahr 2007 von den genannten Forschungsstellen weitergeführt [11]. Beide Forschungsarbeiten wurden vom Verband Deutscher Papierfabriken e. V. finanziert. Der Verband erhoffte sich aus Gründen eines vorsorgenden Umwelt- und Verbraucherschutzes erste Bewertungen des Emissionspotenzials von Stoffen mit endokriner Wirkung im Abwasser. Die Ergebnisse belegen dann auch, dass gereinigte Abwässer der Papierindustrie endokrin wirksame Substanzen enthal-

ten können. So wiesen von zehn getesteten Papierfabrikationsabwässern acht ein östrogenes Potenzial auf, darunter alle Papierfabriken, in denen entweder Altpapier als Faserrohstoff eingesetzt wird oder eine integrierte Holzstofferzeugung stattfindet. Stichprobenartige Untersuchungen im Jahr 2004 bestätigten diese Ergebnisse nur teilweise, ein Teil der Proben wies bei der Wiederholungsmessung kein östrogenes Potenzial mehr auf. Das endokrine Potenzial der Papierfabriksabwässer lag in diesen Fällen im Bereich dessen von biologisch gereinigten Abwässern aus kommunalen Kläranlagen. Allerdings ist davon auszugehen, dass Stoffe natürlichen Ursprungs in den Papierfabriksabwässern größeren Einfluss auf die endokrine Wirkung haben als in den kommunalen Abwässern. Eine Quantifizierung des Anteils gelang bisher nicht.

Durch neue Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften, aber auch einer Zunahme der Anfragen seitens der Behörden und der Kunden aus der papierverarbeitenden Industrie und dem Handel besteht seitens der Papierindustrie Interesse an einer wissenschaftlich-technischen Aufarbeitung dieses Themas. Vor dem Hintergrund eines vorsorgenden Umweltschutzes verfolgt dieses Projekt das Ziel, der deutschen Papierindustrie, sowohl den Primärfaser verarbeitenden Werken als auch den zahlreichen Betrieben, die Altpapier als Faserrohstoff einsetzen, belastbare Aussagen zum Vorkommen, zur Herkunft und zum Verbleib endokrin wirksamer Substanzen im Prozess der Papierherstellung und der Abwasserbehandlung zu liefern. Darüber hinaus sollen technische Möglichkeiten untersucht und bewertet werden, um endokrin wirksame Stoffe aus dem Prozess der Altpapieraufbereitung und Papiererzeugung auszuschleusen bzw. im Rahmen der Abwasseraufbereitung zu eliminieren.

1.1 Endokrines System und endokrine Substanzen

Das endokrine System von Lebewesen umfasst die Organe und Zellen, die Hormone produzieren, sowie die Blut- und Lymphwege, die diese Hormone an teilweise weit entfernte Zellen transportieren und dort eine koordinierte Antwort hervorrufen können. Es reguliert also Stoffwechsel-, Verhaltens-, Wachstums- und Reproduktionsprozesse sowie die Funktionen von Darm, Herzgefäßen, Nieren und Schilddrüse, aber auch Stressreaktionen. Durch Störungen kommt es zu Krankheiten, die sich auf verschiedenste Organe und Körperfunktionen erstrecken und die Regulations- und Anpassungsfähigkeit des gesamten Organismus mindern.

Unter endokrinen Substanzen sollen im folgenden körperfremde, also exogene Substanzen verstanden werden, die in einem Organismus Wirkungen erzeugen, welche von körpereigenen Hormonen gesteuert werden sollen. Auf einem von der Europäischen Kommission organisierten Workshop im Jahr 2001 [12] wurden endokrinen Substanzen folgende Eigenschaften zugeschrieben. Sie können

- direkt ein endokrines Organ beschädigen,
- direkt die Funktion eines endokrinen Organs verändern,
- mit Rezeptoren in Wechselwirkung treten oder
- den Hormonstoffwechsel entweder eines endokrinen Organs oder eines peripheren Organs verändern.

Endokrine Substanzen und deren Wirkungen weisen noch andere spezifische Besonderheiten auf, die mit den toxischen Effekten anderer Stoffe nicht vergleichbar sind. So können endokrine Wirkungen schon bei sehr geringen Substanz-Konzentrationen im ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)-

und ppt (ng/kg)-Bereich auftreten. Die Ursachen und deren Wirkungen können um Jahre oder Jahrzehnte auseinander liegen. So schädigen einige endokrin wirksame Stoffe beispielsweise das menschliche Fortpflanzungssystem kurz vor der Geburt, aber erst mit der Geschlechtsreife wird diese Wirkung offensichtlich. Bei der Entwicklung der Organismen gibt es sehr sensible Phasen, in denen die Stoffe verstärkt oder überhaupt erst wirken. Außerhalb dieser sensiblen Phasen können die Stoffe wirkungslos sein oder ganz andere Wirkungen hervorrufen. Bei tierischen Organismen und beim Menschen liegen diese sensiblen Phasen meist kurz vor oder kurz nach der Geburt. Manche der endokrinen Wirkungen können irreversibel sein. Neben diesen unumstrittenen Effekten werden weitere Thesen diskutiert und untersucht. Dazu gehört die Low-Dose-Hypothese, nach der die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bei endokrinen Effekten nicht immer monoton steigend sind, d. h. einige endokrin wirksame Stoffe üben ihre Wirkung in geringen Konzentrationen, nicht aber in höheren Konzentrationen aus. Auch synergistische Effekte, bei denen sich die endokrine Wirkung beim Vorhandensein mehrerer endokrin wirksamer Stoffe gegenseitig verstärkt und additive Effekte einzelner Substanzen werden untersucht.

1.1.1 Methoden zur Untersuchung endokriner Wirkungen

Zur Untersuchung der endokrinen Wirkung von chemischen Stoffen werden sowohl in vivo- als auch in vitro-Tests eingesetzt. Für beide Testsysteme steht eine Vielzahl von Parametern zur Wirkungsbeurteilung zur Verfügung.

In vitro-Verfahren (z. B. Rezeptorbindungsassays, Reporter- und Transkriptaseaktivierungsassays) können Substanzen bezüglich ihres endokrinen Wirkpotenzials einordnen, allerdings beschränkt auf vorgegebene Wirkprinzipien. Sie erfassen die Effekte im zellulären und subzellulären Bereich. Die Einordnung bezüglich des Wirkpotenzials kann nicht extrapoliert oder zur Vorhersage an intakten Organismen verwendet werden. Für Substanzen, die eine metabolische Aktivierung ihrer endokrinen Wirkung benötigen, besteht bei in vitro-Testverfahren die Gefahr der falsch-negativen Beurteilung ihres endokrinen Wirkpotenzials, da bei vielen in vitro-Tests metabolische Prozesse nicht oder nur eingeschränkt stattfinden können [13].

In vivo-Tests mit lebenden Organismen berücksichtigen Aufnahme, Verteilung und den Metabolismus sowie die Summe der Wirkungen einer Substanz. Sie haben daher eine große Aussagekraft, da sie den gesamten Organismus berücksichtigen. In vivo-Testverfahren nutzen verschiedene endokrine Endpunkte. Für die Beurteilung der endokrinen Wirkung in aquatischen Organismen ist in zahlreichen Studien die Untersuchung der Vitellogeninsynthese bei juvenilen oder männlichen Fischen beschrieben worden [14, 15, 16]. Auch in verschiedenen neueren Dokumenten wurde die Vitellogenininduktion in Fischen diskutiert und als Biomarker für die endokrine Wirkung in Wasserorganismen anerkannt [17]. Weitere Endpunkte aus in vivo-Testsystemen sind z. B.:

- der Gonado-somatische Index (GSI) bei Fischen,
- Schilddrüsenparameter (Hormonspiegel, Histologie),
- Geschlechterdifferenzierung,
- Imposex bei Mollusken (Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane bei weiblichen Tieren),
- östrogenhaltige Eihüllenproteine,
- Uterus-Gewichtstest u. a.

In **Tab. 1** sind die Vor- und Nachteile von in vitro- und in vivo-Testmethoden für die Untersuchung der endokrinen Wirkung zusammengefasst.

Tab. 1: Charakteristik von in vitro- und in vivo-Untersuchungsmethoden

	in vitro-Verfahren	in vivo-Verfahren
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • schnell, kostengünstig, • gut reproduzierbar, • hohe Selektivität, • geeignet für Screening-Untersuchungen 	<ul style="list-style-type: none"> • große Aussagekraft, • berücksichtigt gesamten Organismus, • nützlich zur Risikobeurteilung
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Beschränkung auf vorgegebene Wirkprinzipien, • Begrenzte Übertragbarkeit auf Gesamtorganismus 	<ul style="list-style-type: none"> • lange Testdauer, hoher Arbeitsaufwand, • hohe Kosten, • oft schlecht reproduzierbar, • große Streuung in den Ergebnissen wegen Inhomogenität des biologischen Materials, • Abhängigkeit von Tierspezies, Form der Verabreichung und Dosis-Intervallen

Zusammenfassende Übersichten zu den verschiedenen Testmethoden sind in [9] und [18] enthalten.

In den bisherigen Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von Abwässern der deutschen Papierindustrie kamen vorwiegend der R-YEA-Test (=Recombinant Yeast Estrogen Assay) und der R-YAA-Test (=Recombinant Yeast Androgen Assay) zum Einsatz. Diese in vitro-Tests, die die Summe aller rezeptorvermittelten östrogenen bzw. androgenen Wirkungen erfassen, arbeiten mit rekombinanten, d. h. modifizierten Hefezellen. Das Ergebnis wird als Induktionsrate IR für das Enzym β -Galaktosidase angegeben. Da dieses Testsystem auch für die Untersuchungen im vorliegenden Projekt eingesetzt wurde, ist sein Aufbau und die Wirkungsweise im Abschnitt 2.3.3.1 detailliert beschrieben. Zur Beurteilung der Relevanz der Ergebnisse des R-YEA-Tests für aquatische Organismen wurden weiterführende Untersuchungen auch mit Hilfe von in vivo-Tests durchgeführt. Die dafür zum Einsatz kommende Untersuchungsmethode zur Vitellogeninsynthese in Zebraquariabläuflingen wird im Abschnitt 2.3.3.2 dargestellt.

1.1.2 Identifizierung und mögliche Herkunft endokrin wirksamer Substanzen in Papierfabrikationsabwässern

Endokrin wirksame Stoffe können sowohl natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs sein. Neben den endogenen, also körpereigenen Hormonen (z. B. β -Östradiol, Testosteron) ist eine Vielzahl von natürlichen endokrinen Substanzen aus der Pflanzenwelt bekannt. Für die Zellstoff- und Papierindustrie sind insbesondere die Phytohormone von Bedeutung, die als natürliche Holzinhaltstoffe direkt aus den Faserrohstoffen in den Papierherstellungsprozess und damit auch in das Wasserkreislaufsystem der Papierfabrik eingetragen werden. Zu den Phytohormonen gehören beispielsweise Enterolacton, β -Sitosterol und Genistein als exemplarische Vertreter der Lignane, Sterole und Flavonoide. Die genannten Substan-

zen sind auch als Inhaltsstoffe in Abwässern der Zellstoff- und Holzstofferzeugung bekannt [19, 20, 21, 22]. Insbesondere Genistein, das wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den weiblichen Sexualhormonen als Phytoöstrogen bezeichnet wird, hat eine hohe Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor. Es zeigt schon in vergleichbar geringen Konzentrationen eine östrogene Wirkung, die der des natürlichen Östrogens 17 β -Östradiol nahe kommt. Genistein ist insbesondere in der Sojabohne enthalten, wird aber auch im Kernholz von Bäumen gefunden. In den Abläufen kommunaler Kläranlagen wird Genistein im Allgemeinen nur in Konzentrationen von wenigen ng/l gemessen. Im biologisch gereinigten Ablauf einer Zellstofffabrik in Kanada wurden Genistein-Konzentrationen bis zu 10,5 μ g/l ermittelt [23].

Die anthropogenen endokrin wirksamen Stoffe können unterteilt werden in solche, die eine beabsichtigte endokrine Wirkung haben und zu diesem Zweck hergestellt werden (z. B. die für Therapiezwecke und zur Empfängnisverhütung hergestellten synthetischen Hormone) und in die große Gruppe der Xenobiotika (Industriechemikalien), die eine nicht beabsichtigte endokrine Aktivität entfalten können. Für diese Gruppe wurde als kurzfristige Maßnahme im Auftrag der EU-Kommission im Juni 2000 von bkh Consulting Delft und dem TNO Nutrition and Food Research die sogenannte bkh-Liste mit 553 Substanzen zusammengestellt, die möglicherweise ein endokrines Potenzial haben [24]. Für 118 dieser Stoffe lagen im Jahr 2001 Beweise für endokrine Wirkungen oder potenziell endokrine Wirkungen vor. Davon waren zu diesem Zeitpunkt allerdings schon 109 Stoffe bereits verboten, unterlagen Anwendungsbeschränkungen oder waren durch bestehende gemeinschaftliche Rechtsvorschriften geregelt [25]. Die bkh-Liste wurde daher im Jahr 2002 in einer überarbeiteten und ergänzten Fassung veröffentlicht. Diese Liste sowie alle weiteren gültigen Dokumente, die im Auftrag bzw. von der EU-Kommission zu dieser Thematik veröffentlicht wurden, sind in aktueller Form ständig auf der Internetseite der EU-Kommission zur Strategie für endokrin disruptive Chemikalien verfügbar: www.ec.europa.eu/environment/endocrine/index_en.htm.

In den weiteren sehr umfangreichen Arbeiten der Europäischen Kommission zur Umsetzung der Gemeinschaftsstrategie für endokrin wirksame Stoffe in den letzten fünf Jahren wurde eine Liste von zusätzlichen 94 Chemikalien erarbeitet, deren endokrine Wirksamkeit erwiesen wurde, davon 84 Stoffe, die ein hohes Expositionspotenzial aufweisen [26]. Zu diesen Stoffen gehören unter anderem Vertreter der Phthalate, Bisphenole, Polychlorierten Biphenyle (PCB) und Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Diese Chemikalien werden oder wurden für die Papierherstellung und -verarbeitung eingesetzt, so dass sie zum Teil über das Altpapier wieder in den Produktionsprozess, die Prozess- und Abwässer eingetragen werden können. In der **Tab. 2** sind einige Stoffe der bkh-Liste aufgeführt, die von Relevanz für die Zellstoff- und Papierindustrie sind.

Tab. 2: Auszug bkh-Liste mit relevanten Stoffen für die Papierindustrie [27]

<i>Gruppe Industriechemikalien</i>	<i>Beispiele</i>	<i>Mögliche Herkunft in Papierindustrie</i>
Alkylbenzole und -styrole	Styrol	Binder, Co-Binder
Chlorphenole und -benzole	Pentachlorphenol (PCP)	Holzschutzmittel, Biozid
Alkylphenole und Derivate	Alkylphenolethoxylate und -polyethoxylate	Entschäumer, Reiniger, Emulgatoren
Chlorierte Paraffine		Selbstdurchschreibepapiere in Archiven
Phthalate	Di-(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Di-n-butylphthalat (DBP), Diisobutylphthalat (DIBP)	Klebstoffe, chemische Additive, Druckfarben
Bisphenole	Bisphenol A	Thermopapier
Triphenylmethan-Derivate		Farbstoffe
Polychlorierte Biphenyle (PCB)		Selbstdurchschreibepapiere in Archiven
Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	Phenanthren	Druckfarben, Ruß
Kupferverbindungen		Druckfarben
Epichlorhydrin		Nassverfestiger

1.2 Ergebnisse bisheriger Untersuchungen

Die ersten Ergebnisse der Forschung über die Existenz und die Konzentration von Stoffen mit endokrinem Potenzial in unserer Umwelt sind vor ca. 20 Jahren publiziert worden. Nachdem Wissenschaftler festgestellt haben, dass es bei einigen aquatischen Lebewesen in den letzten Jahren verstärkte Tendenzen zur Verweiblichung und/oder Vermännlichung einiger Spezies gegeben hat, wurden zahlreiche Untersuchungen zu den Ursachen dieser Entwicklungen und dem Vorkommen von endokrin wirksamen Stoffen in der aquatischen Umgebung in Form von Monitoring-Studien durchgeführt. Auch die Abwässer der Zellstoff- und Papierindustrie wurden als mögliche Quellen dieser Stoffe in Oberflächengewässern in diesen Studien erwähnt [1, 28, 29, 30, 31].

Erschwert wird die Ergebnisinterpretation durch den Umstand, dass für den Test einer wässrigen Probe auf endokrine Wirkung keine standardisierten Messmethoden zur Verfügung stehen, so dass eine eindeutige Zuordnung einer endokrinen Wirkung auf einen konkreten chemischen Stoff mit einer genau bekannten Konzentration nicht möglich ist. Aus diesem Grund und den im Abschnitt 1.1 beschriebenen spezifischen Wirkungen von Stoffen auf das Hormonsystem tierischer und menschlicher Organismen existieren bis heute keine definierten Grenzwerte, bei deren Einhaltung die schädliche Wirkung auf lebende Organismen ausgeschlossen werden kann. Die Europäische Kommission und die Mitgliedsstaaten beteiligen sich an der „Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force“ der OECD, die 1998 mit dem Ziel der Entwicklung anerkannter Prüfmethode eingesetzt wurde. Im Fünften Rahmenprogramm der Europäischen Gemeinschaft im Bereich der Forschung, technologischen Entwicklung und Demonstration (1999 bis 2002) wurden

Forschungen über die endokrinen Wirkungen chemischer Stoffe als vorrangig festgelegt. Darüber hinaus wurde eine gezielte Aufforderung zur Einreichung von Forschungsvorschlägen zu den Auswirkungen von Stoffen mit endokriner Wirkung auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt am 31. Mai 2001 veröffentlicht und mit Haushaltsmitteln von 20 Mio. Euro ausgestattet. Alle diese Anstrengungen haben dazu geführt, dass mittlerweile das Wissen über die Identität einzelner endokriner Stoffe einschließlich der Stoffströme und der Wirkungen dieser Stoffe auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt gestiegen ist [30, 31].

Das Vorkommen von endokrin wirksamen Substanzen in Papierprodukten und in biologisch gereinigten Abwässern der Papierindustrie ist Gegenstand einiger weniger Untersuchungen und Veröffentlichungen der letzten Jahre. So wurden von einer Arbeitsgruppe des Institutes für Abfallwirtschaft und Altlasten der TU Dresden in den Jahren 2002 und 2005 Untersuchungen über endokrin wirksame Stoffe in Zellulose, im Altpapier und in verschiedenen Papierprodukten auf Altpapierbasis veröffentlicht [3, 4]. Die Verfasser kamen zu dem Ergebnis, dass alle untersuchten Altpapiersorten messbare Konzentrationen sowohl an Bisphenol A (Farbreagens im Thermopapier) als auch Octyl- und Nonylphenolen aufwiesen, Zellstoff-Proben dagegen nicht. Die höchsten Konzentrationen an Bisphenol A und an Nonylphenolethoxylaten wurden in zwei Toilettenpapierproben ermittelt, die zu 100 % aus Altpapier hergestellt wurden. Im Jahr 2009 wurden neuere Untersuchungen der TU Dresden veröffentlicht, in denen Recycling-Toilettenpapiere aus Deutschland, Australien und China auf mögliche endokrine Stoffe (PCP, Octylphenol, Nonylphenol und BPA) analysiert wurden [5]. In keiner der untersuchten Proben wurde PCP bzw. Octylphenol oberhalb der Nachweisgrenze von 0,1 mg/kg detektiert. Nonylphenol wurde in zwei der vier deutschen Proben in einer Konzentration von bis zu 0,75 mg/kg gemessen. BPA wurde in drei der vier untersuchten Proben aus Deutschland in Konzentrationen bis zu 16 mg/kg ermittelt. Der Eintrag dieser Stoffe aus den Haushalten in das Abwassersystem wird als wesentliche Quelle für die Befrachtung des kommunalen Abwassers und des Klärschlammes in kommunalen Abwasserreinigungsanlagen betrachtet.

Noch detaillierter wurden von Papier ausgehende endokrine Wirkungen von Vinggaard et al. [2] beschrieben. Inhalt dieser Studie, in der 20 handelsübliche Küchenrollen beprobt wurden (neun Altpapier haltige Sorten, elf ausschließlich Primärfaser haltige Sorten), war sowohl ein Screening der Extrakte der Papierproben auf östrogene Wirkung mit Hilfe eines in vitro-Hefezellentestes als auch die chemische Einzelstoffanalyse dieser Extrakte, mit deren Hilfe die Substanzen identifiziert werden sollten, die für die östrogene Wirkung dieser Papierprobe verantwortlich sind. Von den neun Altpapier haltigen Küchenrollen, wiesen sieben im Extrakt ein östrogenes Potenzial auf, von den elf Primärfaser basierenden Proben nur zwei. Die Autoren dieser Untersuchung kommen zu dem Ergebnis, dass Bisphenol A aufgrund seiner relativ hohen Konzentrationen in den AP-haltigen Papierprodukten (0,55 – 24,1 mg/kg) und seiner hohen Sensivität in dem Hefezellen-Test maßgeblich zu dem Ergebnis für die Induktionsrate des Enzyms β -Galaktosidase und damit zu dem Testergebnis für die östrogene Wirkung der Papierprobe beiträgt. Doch auch andere Stoffe wie die Nonyl- und Octylphenole, die in Primär- und Sekundärfaser basierenden Produkten annähernd gleich verteilt sind, führen noch in sehr geringen Konzentrationen zu einem messbaren östrogenen Effekt, während Phthalate, wie Di-n-butylphthalat, Di-isobutylphthalat und Diethylphthalat erst in größeren Konzentrationen messbare östrogene Wirkungen in dem genannten Hefezellen-Test hervorrufen [32, 33, 34, 35].

Erste Forschungsergebnisse zum Abbau von endokrin wirksamen Stoffen in kommunalen Abwasserreinigungsanlagen liegen bereits vor. In diesem Zusammenhang wird insbesondere auf ein vom Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen gefördertes Forschungsvorhaben „Eintrag und Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen“ aus dem Jahr 2003 verwiesen [36]. Am Beispiel der Großklärwerke Köln-Stammheim und Düsseldorf Süd konnte für ca. 70 Einzelstoffe die Elimination aus dem Abwasser in den verschiedenen Verfahrensstufen der Abwasserreinigung gezeigt werden, darunter auch für einige der endokrin wirksamen Stoffe, die im Abwasser der Zellstoff- und Papierindustrie diskutiert werden (z. B. DEHP, den wichtigsten Vertreter der Substanzklasse der Phthalate, Bisphenol A, Nonyl- und Octylphenole). Trotz Eliminationsraten von über 90 % zwischen Zu- und Ablauf der Kläranlagen kommen die Autoren dieses Berichtes zu dem Ergebnis, dass in den Abläufen dieser Kläranlagen noch eine deutliche Reduzierung dieser Stoffe notwendig ist, um die $PNEC_{(aqua)}$ -Werte auch in kleineren Fließgewässern sicher einzuhalten¹. Gleichzeitige Untersuchungen der endokrinen Wirkung der Abläufe aus den Kläranlagen sind leider nicht durchgeführt worden.

Detailliert werden mögliche Eliminationsraten für endokrine Substanzen in der Abwasseraufbereitung in [37] beschrieben, Schwerpunkt dieser Arbeiten waren Untersuchungen zu den Änderungen des endokrinen Potenzials kommunaler Abwässer durch weitergehende Abwasserreinigungsverfahren. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Papierindustrie ist aber nur bedingt gegeben, da sich Inhaltsstoffe und wesentliche Parameter der Abwässer aus kommunalen Kläranlagen (CSB, DOC, AOX, zahlreiche wasserlösliche organische Stoffe aus dem Rohstoff Holz etc.) von denen der Papierindustrie wesentlich unterscheiden.

Die in der deutschen Papierindustrie bisher durchgeführten und publizierten Untersuchungen zu endokrin wirksamen Stoffen im Abwasser der biologischen Abwasserreinigungsanlagen sind maßgeblich vom Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik der TU Darmstadt (PMV) sowie der Papiertechnischen Stiftung in München (PTS) bearbeitet und vom Verband Deutscher Papierfabriken e. V. (VDP) finanziell gefördert worden [9, 10, 11, 27, 38]. In allen diesen Untersuchungen wurde zur Überprüfung der endokrinen Wirkungen ein in-vitro-Test mit modifizierten Hefezellen (R-YEA- bzw. R-YAA-Test) ausgewählt, da er sich gut für ein erstes Abwasserscreening eignet. Über die ersten Untersuchungen im Jahr 2003, in denen sich für acht von zehn Werken ein endokrines Potenzial im Ablauf der Abwasserreinigungsanlage bestätigt hat, wurde bereits berichtet [9; 10].

Ein Jahr später wurden diese Untersuchungen im Rahmen eines Forschungsvorhabens zur Identifizierung der Rest-CSB verursachenden organischen Substanzen im Ablauf biologisch gereinigter Papierfabriksabwässer weitergeführt [38]. Dabei wurden auch Werke beprobt, aus denen bereits im Jahr 2003 Abwasserproben entnommen wurden. In einigen Werken hat sich der Befund einer endokrinen (in diesem Fall östrogenen) Wirkung bestätigt, in anderen Fällen nicht. So konnte insbesondere die These, dass in allen Altpapier verarbeitenden Werken das biologisch gereinigte Abwasser eine endokrine Wirkung zeigt, nicht bestätigt werden. Allerdings sind in den bisherigen Untersuchungen lediglich stich-

¹ $PNEC$ = Predicted No Effect Concentration, $PNEC_{(aqua)}$ -Werte geben an, bis zu welcher Konzentration auch über mehrere Trophiestufen keine schädlichen Wirkungen auf aquatische Lebewesen anzunehmen sind

probenartig Abwässer entnommen worden (insgesamt zehn Werke), so dass heute noch keine belastbaren Aussagen getroffen werden können. Dennoch werfen diese Ergebnisse weitere Fragen auf, die in dem vorliegenden Projekt zu bearbeiten sind. Da auch bei gleichem Rohstoffeinsatz und vergleichbaren Produktionsabläufen und -bedingungen eine endokrine Wirkung des gereinigten Abwassers nicht konstant gegeben ist, sollen weitere Faktoren, die das Testergebnis beeinflussen können, untersucht werden. Die in [38] erstmals zeitgleich vorgenommenen Untersuchungen zur Einzelstoffbestimmung der prioritären Stoffe nach EU-Wasserrahmenrichtlinie [39] mittels GC/MS führten trotz sehr geringer Bestimmungsgrenzen des Messverfahrens im Bereich von 50 bzw. 100 ng/l zu keinen sinnvollen Korrelationen zu der summarisch erfassten Größe „endokrine Wirkung“. Auch zu den Parametern CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf), DOC (Dissolved Organic Carbon) und zur Konzentration an lignin- bzw. huminähnlichen Verbindungen konnte erwartungsgemäß keine signifikante Abhängigkeit ermittelt werden. Weitere Teiluntersuchungen in diesem Projekt hatten den Einfluss der Filtration der Abwasserproben auf die endokrine Wirkung zum Inhalt. Dafür wurden Abwasserproben jeweils unfiltriert, nach 0,45 µm-Filtration und nach 1 kDa-Membranfiltration auf ihre endokrine Wirkung untersucht. Obwohl es durchaus Abstufungen in der Induktionsrate der β -Galaktosidase gegeben hat, kann zunächst keine generelle Aussage getroffen werden, dass durch eine Filtration die endokrine Wirkung des Abwassers durch Adsorptionsvorgänge der endokrin wirksamen Moleküle an Feststoffpartikeln geringer wird. Weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Proben sind notwendig, um dazu verlässliche Aussagen ableiten zu können.

2 Forschungsziel, Lösungsweg und Untersuchungsmethoden

2.1 Forschungsziel

Ziel des vorliegenden Projektes ist es, durch Untersuchungen von endokrin wirksamen Stoffen in den Produkten und im Abwasser der Papierindustrie detaillierte Aussagen über die Identität, das Vorkommen, die Herkunft und den Verbleib dieser Substanzen abzuleiten. Erstmals sollen durch ein gezieltes Untersuchungsprogramm alle theoretisch möglichen Quellen für endokrine Substanzen im Prozess der Papiererzeugung systematisch untersucht und die Einträge bewertet werden. Durch detaillierte Untersuchungen in ausgewählten Abwasserbehandlungsanlagen der Papierindustrie sollen Reinigungsverfahren auf ihre Möglichkeit zur Reduzierung von endokrin wirksamen Stoffen untersucht werden. Der Einfluss wesentlicher Abwasserparameter der realen Abwässer auf die Entfernung endokrin wirksamer Stoffe in den einzelnen Reinigungsstufen wird bewertet. Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von gereinigten Abwässern deutscher Papierfabriken basieren im Wesentlichen auf in vitro-Testverfahren, die die Wirkung von Stoffen im zellulären Bereich beschreiben können. In diesem Projekt sollen zusätzlich in vivo-Untersuchungen mit aquatischen Organismen durchgeführt werden, um die Übertragbarkeit der bisherigen Erkenntnisse auf lebende Organismen bewerten zu können.

2.2 Lösungsweg

Die Forschungsarbeiten sind in fünf Arbeitspakete aufgegliedert:

- AP 1: Screening der östrogenen Wirkung von Papierfabrikationsabwässern,
- AP 2: Identifizierung von Einzelstoffen, die die endokrine Wirkung in ausgewählten Abwasserproben verursachen können,
- AP 3: Ermittlung von Quellen endokrin wirksamer Substanzen im Prozess,

- AP 4: Untersuchung der Extrakte von Papierprodukten auf östrogene Wirkung,
- AP 5: Untersuchung der verschiedenen Technologien der Abwasserbehandlung auf ihr Potenzial zur Abreicherung von endokrin wirksamen Substanzen im Abwasser.

Im Projektzeitraum wurden vom nicht-wissenschaftlichen Personal die Arbeiten zur chemischen Analyse von Abwasserproben, Stoffsuspensionen, chemischen Additiven und Papieren durchgeführt (Summenparameter wie CSB, TOC und AOX, Einzelstoffanalysen mittels GC/MS), unterstützt durch eine wiss. Hilfskraft, die für die Probenvorbereitung (z. B. Herstellung von Stoffsuspensionen, Additivmischungen, Filtration von Abwasserproben etc.) zuständig war. Die wissenschaftliche Mitarbeiterin hat die Probenahmen organisiert und durchgeführt, die Subauftragnehmerleistungen koordiniert, die chemischen Untersuchungen geplant, sämtliche Auswertungen vorgenommen, aktuelle Fachveröffentlichungen recherchiert, Berichte erstellt sowie Projektbegleitersitzungen und Präsentationen vorbereitet. Die Leistungen Dritter (Untersuchungen zur endokrinen Wirkung mittels in vitro- und in vivo-Verfahren) sind wie geplant beauftragt und erledigt worden. Die durchgeführten Arbeiten entsprachen dem beantragten und von den Gutachtern bewilligten Projektplan, waren vom Ablauf her erforderlich und in ihrem Umfang angemessen.

Für die Untersuchung der (Ab-)Wasserproben, der Faserrohstoffe, der chemischen Additive und der fertigen Papiere sollte eine repräsentative Auswahl der Papierfabriken in Deutschland beprobt werden. Entsprechend den Angaben im Forschungsantrag sind insgesamt 16 Papierfabriken in die Untersuchungen einbezogen worden: 7 Werke, die Verpackungspapiere herstellen, 4 Fabriken aus dem Bereich der Tissue-Papiere und 5 Werke aus dem Bereich der Grafischen Papiere. Zu jeder Papiersorte wurden sowohl Werke mit Altpapiereinsatz beprobt, als auch Papierfabriken, die ausschließlich Frischfasern einsetzen.

In **Tab. 3** sind die untersuchten Werke aufgelistet. Aufgrund der teilweise vertraulichen Betriebsdaten und Untersuchungsergebnisse wurden die Angaben zu den Fabriken allgemein gehalten. Dadurch soll verhindert werden, dass Rückschlüsse auf die Zuordnung von Angaben zu einer speziellen Papierfabrik gezogen werden können. Soweit es für die Ergebnisinterpretation erforderlich ist, wird in den folgenden Abschnitten in Einzelfällen auf betriebliche Besonderheiten hingewiesen.

Tab. 3: Auswahl der untersuchten Papierfabriken

Code-Nr. Papierfabrik	Faserstoffe	Abwasserreinigung
<i>Verpackungspapiere</i>		
D	HS / ZS / DIP	aerob - aerob
L	100 % AP	anaerob - aerob
W	100 % AP	anaerob - aerob
Z	100 % AP	aerobe Vorreinigung, Indirekteinleiter
H	100 % AP	anaerob - aerob
O	100 % AP	anaerob - aerob
M	ZS / HS	aerob - aerob
<i>Tissue-Papiere</i>		
Y	100 % ZS	aerob - aerob
X	100 % AP	aerob - aerob
E	100 % AP	anaerob - aerob
J	100 % AP	anaerob - aerob
<i>Grafische Papiere</i>		
A	100 % ZS	aerob - aerob
U	100 % AP	aerob - aerob
K	AP / HS	aerob - aerob
I	100 % AP	anaerob - aerob
N	ZS / HS	aerob - aerob

2.3 Untersuchungsmethoden

2.3.1 Probenvorbereitung für Untersuchung auf endokrine Wirkung

Im vorliegenden Projekt wurden sowohl Abwasser-, als auch Faserstoff-, Altpapier- und Papierproben, aber auch chemische Additive aus der Papierherstellung auf ihre endokrine Wirkung untersucht. Für diese Proben ist jeweils eine spezifische Probenvorbereitung erforderlich, da für die nachfolgenden Untersuchungen auf endokrine Wirkung nur verdünnte wässrige Lösungen eingesetzt werden können. Daher mussten für die festen Proben entsprechende Aufschlüsse bzw. Extraktionen und für die flüssigen Additive geeignete Verdünnungen durchgeführt werden. Ziel dieser Probenahmestrategie war es, Proben zu generieren, die sich von den Medien aus der Produktion und/oder Anwendung im Hinblick auf Stoffdichte, Stoffkonzentration etc. möglichst wenig unterscheiden.

Das Handling im Labor erforderte äußerste Sorgfalt. Da die endokrine Wirkung einiger Stoffe bereits im unteren ng/l-Bereich nachgewiesen wurde, ist eine Querkontamination der Proben schon durch geringfügige Konzentrationen von Stoffen in Laborgefäßen, Raumluft, Glasgeräten, Chemikalien, Verdünnungswasser etc. möglich. Für die Probenahme und -vorbereitung wurden fast ausschließlich Glasgefäße verwendet, um mögliche Auswascheffekte aus Kunststoffgefäßen und Adsorptionsvorgänge an Gefäßwänden zu vermeiden. Dennoch ließ es sich, insbesondere bei der Entnahme größerer Probemengen

(z. B. jeweils 25 l Abwasserprobe für die in vivo-Untersuchungen) nicht vermeiden, Kunststoffkanister für die Probenahme einzusetzen. Da diese Abwasserproben regelmäßig auch in diesen Mengen eingefroren werden mussten, kamen keine anderen Gefäße in Frage. In diesen Fällen wurden in Absprache mit den beiden Untersuchungsstellen für die endokrinen Wirkungstests häufig benutzte und gespülte Polyethylen-Kanister eingesetzt, von denen eine Migration von interessierenden Stoffen in die Probe eher unwahrscheinlich ist.

Die Proben für den R-YEA-Test wurden sofort nach der Probenahme bzw. nach der Herstellung der entsprechenden Proben im Labor in 100 ml-Schott-Glasgefäßen eingefroren, um Reaktionen der Probenbestandteile untereinander und vor allem mikrobiologischem Befall vorzubeugen. Je Probe wurden zwei Glasgefäße mit je ca. 60 ml Probe eingefroren, um im Bedarfsfall eine Rückstellprobe zur weiteren Untersuchung zur Verfügung zu haben. Alle Proben wurden an die Mitarbeiter der INCOS BOTÉ GmbH persönlich übergeben, da ein wiederholtes Ein- und Ausfrieren der Proben zu nicht reproduzierbaren Differenzen in den Untersuchungsergebnissen des R-YEA führen kann.

2.3.1.1 Probenvorbereitung Wasser- und Abwasserproben

Die Untersuchung der Wasser- und Abwasserproben erfolgte im Normalfall in der unfiltrierten homogenisierten Probe. Je nach Aufgabenstellung wurden aber auch gezielt Filtrationen der Abwasserproben durchgeführt, um den Einfluss der Feststoffabtrennung auf das Testergebnis zu erfassen. Da diese Probenvorbereitungsschritte für die Ergebnisse durchaus relevant sind, wird bei der Ergebnisdiskussion näher darauf eingegangen.

2.3.1.2 Probenvorbereitung Faserstoffe und Altpapiere

Die Herstellung der Faserstofffiltrate erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift für das Aufschlagen von Chemie-Zellstoff (DIN EN ISO 5263-1:2004-12). Es wurden sowohl Filtrate von Holzstoffen, als auch von verschiedenen Altpapieren und Altpapiersorten hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 40 g otro des zerkleinerten und homogenisierten Probenmaterials in einem Standard-Desintegrator in 2 l Leitungswasser (Temperatur 40 °C) 20 min. lang zerfasert. Die Suspension wurde anschließend über ein Schwarzbandfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde eingefroren und der Fa. INCOS BOTÉ zur Analyse mit dem R-YEA übergeben.

Aufgrund der Ergebnisse der ersten Filtratuntersuchungen wurden von einigen Altpapieren zusätzlich zu den Filtraten auch Kaltwasserextrakte (KWE) erstellt und untersucht. Für die KWE wurden ebenfalls 40 g otro des zerkleinerten und homogenisierten Probenmaterials in 2 l Leitungswasser (Temperatur 20°C) gegeben und dort bei Raumtemperatur 24 h, unter gelegentlichem Umrühren belassen. Die Suspension wurde anschließend über ein Schwarzbandfilter abfiltriert, eingefroren und die Probe zur Analyse mit dem R-YEA an INCOS BOTÉ überbracht.

2.3.1.3 Probenvorbereitung Papiere

Insgesamt wurden 25 Papiere unterschiedlicher Papiersorten auf die endokrine Wirkung untersucht. Dazu wurden Kaltwasserextrakte (KWE) der Papiere gemäß DIN EN 645 [40] hergestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden jeweils 10 g Papier mit 200 ml destilliertem Wasser extrahiert.

2.3.2 Probenvorbereitung für Einzelstoff-Analytik mittels GC/MS

Im Vergleich zu der Bestimmung des „Summenparameters“ endokrine Wirkung ist die Probenvorbereitung für die Einzelstoff-Analytik wesentlich aufwändiger. Wesentliche Ursache dafür ist die erforderliche Bestimmung von Einzelsubstanzen im Spurenbereich in einer sehr komplexen Probenmatrix. In Abhängigkeit von den spezifischen Eigenschaften und den relevanten Konzentrationsbereichen der Analyten ist neben der Anreicherung der Stoffe und Abtrennung von Matrixkomponenten teilweise auch eine Derivatisierung erforderlich, um die erforderlichen Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

2.3.2.1 Probenvorbereitung der Abwasserproben für die Analyse auf definierte, potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe

Die Probenvorbereitung der Abwasserproben erfolgt in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Analyten nach den in **Tab. 4** genannten standardisierten Messmethoden.

Tab. 4: Untersuchungsmethoden für die Bestimmung definierter Einzelsubstanzen

Parameter	Untersuchungsmethode
Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	DIN 38407-39:2008 (Normentwurf)
Bisphenol A	ISO 18857-2:2009
Phthalate	DIN EN ISO 18856:2005
PCP	DIN EN 12763:1999

2.3.2.2 Probenvorbereitung der Wasser- und Abwasserproben auf die Untersuchungen zur Identifizierung unbekannter Inhaltsstoffe

Die Untersuchung von Wasser- und Abwasserproben auf die interessierenden unbekannt Komponenten erfordert einen zusätzlichen Schritt der Analytanreicherung, da diese Stoffe nur in Spurenkonzentrationen im ng/l- bis unteren µg/l-Bereich vorliegen. Herkömmliche Methoden der Anreicherung sind vor allem die Solid Phase Extraction (SPE) und die Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Aus diesbezüglichen eigenen Vorarbeiten und Projekten ist bekannt, dass die SPE zur Anreicherung von organischen Substanzen in Abwässern der Papierindustrie nur bedingt geeignet ist. Aufgrund der hohen Belastung dieser Abwässer (insbesondere der zu untersuchenden Zuläufe zur ARA) mit organischen Stoffen (Huminstoffe und deren Derivate, Lignin und ligninähnliche Verbindungen, Abbauprodukte der Cellulosen und Hemicellulosen u. a.) kommt es regelmäßig zur Verklebung und Inaktivierung des Säulenmaterials. Feststoffe und kolloidal gelöste Moleküle in der Abwasserprobe verstärken diesen Effekt noch. Außerdem ist die Kapazität der handelsüblichen SPE-Materialien bei den hohen CSB-Frachten der Abwässer der Papierindustrie schnell erschöpft.

Auch die Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Analytanreicherung ist keine geeignete Alternative. Nachteilig sind vor allem die großen Mengen an organischen (teilweise toxischen) Lösungsmitteln, die für die Abtrennung der organischen Komponenten aus der wässrigen Phase

erforderlich sind, und die geringe Effektivität bei der Probenvorbereitung (viele manuelle Arbeitsschritte). Darüber hinaus sind in den Abwässern der Papierherstellung einige chemische Additive (z. B. Emulgatoren, Tenside aus dem Deinking-Prozess) und deren Metabolite enthalten, die zu einer Emulsionsbildung führen. Dadurch ist die Abtrennung der organischen von der wässrigen Phase stark erschwert oder überhaupt nicht möglich.

In der instrumentellen Analytik wurden in den letzten Jahren einige vielversprechende Methoden zur Anreicherung von Spurenstoffen entwickelt, die bei einem hohen Anreicherungsfaktor die o. g. Nachteile umgehen und außerdem in modernen GC/MS-Systemen automatisiert werden können. Dadurch wird die Effektivität dieser Anreicherungsschritte deutlich erhöht. Neben Purge and Trap-Methoden für flüchtige Stoffe ist vor allem die Solid Phase Micro Extraction (SPME), bei der die Anreicherung an einer mit dem Adsorbens überzogenen Quarzfaser erfolgt, in zahlreichen Forschungsarbeiten eingesetzt worden. Mit der SPME lassen sich Anreicherungsfaktoren von 1.000, in einigen Fällen sogar bis 10.000 erreichen. Bei der SPME stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht der organischen Stoffe zwischen der stationären Phase und der Wasserphase ein, das heißt, es findet keine vollständige Adsorption der Analyten wie bei der SPE statt. Als stationäre Phase wird meistens eine Quarzfaser eingesetzt, die von Polydimethylsiloxan (PDMS), typischerweise 0,5 µl oder weniger, überzogen ist. Die benötigte Abwasserprobemenge für die SPME-Analytik liegt bei 5 – 10 ml. Für die klassischen Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der SPE ist für eine vergleichbare Bestimmungsgrenze ca. ein Liter der Abwasserprobe erforderlich. Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung ist relativ gering. Sie beträgt, in Abhängigkeit von der untersuchten Matrix und den Zielsubstanzen, ca. 10 – 30 min. Die beladene Quarzfaser wird dann im Chromatographen thermodesorbiert, die Analyten also direkt in das Injektionssystem des Gerätes eingebracht, so dass keine zwischenzeitliche Kontamination der Probe eintreten kann. Die Faser steht danach für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Untersuchungen haben ergeben, dass der Anreicherungsfaktor der Zielsubstanzen um so höher ist, je größer der Wert für den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten K_{OW} ist. Stoffe, die stark lipophil sind, reichern sich in der PDMS-Phase also wesentlich stärker an als hydrophile Substanzen. Das bedeutet, dass Stoffe mit einem geringen K_{OW} -Wert (< 10.000), wie z. B. niedrige Alkohole und niedermolekulare organische Säuren, nur eine geringe Wiederfindungsrate in der PDMS-Phase aufweisen und daher oftmals nicht empfindlich genug nachgewiesen werden können. Mit dem Ziel, diesen Nachteil mit den vielen Vorteilen der SPME kombinieren zu können, wurde vor ca. 10 Jahren die Technologie der Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) entwickelt [41].

Bei der SBSE werden Magnetührstäbchen mit der stationären Phase überzogen. Auch hier wird PDMS als stationäre Phase verwendet. Aufgrund der geometrischen Verhältnisse (Oberfläche des Magnetührstäbchens) und der vorgesehenen Applikation sind die Magnetührstäbchen mit 50 – 300 µl PDMS überzogen. Dadurch ist das Aufnahmevermögen für die organischen Stoffe im Vergleich zu den 0,5 µl PDMS bei der SPME deutlich höher. Die Empfindlichkeit der SBSE ist durch den höheren Anreicherungsfaktor um ca. 100 bis zu 1.000 mal größer. Dadurch können auch Stoffe mit einer geringeren Lipophilie und einem K_{OW} von ca. 500 nachgewiesen werden. Stoffe mit höheren K_{OW} -Werten können, je nach Matrix, mit Hilfe dieser Anreicherungsmethodik auch in Konzentrationen von 1 – 100 ng/l analysiert werden. Die Anreicherung mittels SBSE wird in einem Probefläschen (Volumen der Probe ca. 10 – 20 ml) mit einem handelsüblichen Magnetührer durchgeführt. Im Anschluss wird das Röhrchen aus der Probe entnommen, außen trocken gewischt

und in die Thermodesorptionseinheit des GC/MS-Gerätes eingebracht. Dort werden die organischen Substanzen unter definierten Bedingungen thermodesorbiert, in einer Kühlfalle bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgefangen (Kühlmittel: flüssiger Stickstoff), gaschromatographisch getrennt und mittels Massenspektrometer detektiert.

Die Technologie der Stir Bar Sorptive Extraction ist von der Gerstel GmbH, Mülheim, entwickelt worden. Die mit der stationären Phase überzogenen Magnetrührstäbchen (siehe **Abb. 1**) werden derzeit unter dem Handelsnamen TwisterTM von der Gerstel GmbH vertrieben und weiterentwickelt. Verschiedene Veröffentlichungen und Applikationsberichte zu Anwendungen der TwisterTM für unterschiedliche analytische Aufgabenstellungen sind in den letzten Jahren veröffentlicht worden. Neben der Analyse von Chemikalien-Rückständen in flüssigen Lebensmitteln ist auch die Untersuchung von Spurenstoffen in wässrigen Proben bereits für einige Analyten publiziert worden [41, 42, 43, 44].



Abb. 1: TwisterTM - Applikation in SBSE zur Anreicherung organischer Stoffe aus wässriger Phase (Quelle: http://www.gerstel.com/pdf/Twister_deu.pdf)

Im Rahmen des vorliegenden Projekts sind insbesondere die PDMS-Twister zum Einsatz gekommen, die vor allem für die Spurenanreicherung von organischen, eher lipophilen Stoffen geeignet sind. Innerhalb der Projektlaufzeit sind seitens der Fa. Gerstel die Arbeiten zur Entwicklung einer polaren stationären Phase vorangetrieben worden. Aufgrund der Charakteristik der zu untersuchenden Stoffe in Papierfabriksabwässern sind auch die polaren organischen Stoffe von Interesse, so dass auch die neu entwickelten Acrylat-Twister für die Anreicherung von Spurenstoffen getestet wurden.

Die polare Phase des Acrylat-Twisters besteht nach Angaben des Herstellers aus folgenden Komponenten [45], die auf Polyacrylat-Basis entwickelt worden sind (vgl. **Tab. 5**):

Tab. 5: Zusammensetzung der polaren Phase des Gerstel-Twisters (Quelle: Gerstel GmbH)

Komponente	Funktion
25 % Hydroxylgruppen tragende Segmente	Polarität
25 % vernetzende Segmente	Mechanische und thermische Stabilität
50 % Polyglykol-Segmente	„Weichmacher“ (Massentransfer, Diffusion); Polarität

Die Kenntnis über die stoffliche Zusammensetzung des Acrylat-Twisters ist vor allem wichtig, um bei der Auswertung der Chromatogramme mögliche Peaks aus dem Ausbluten

der polaren Phase von den Peaks zu unterscheiden, die aus Inhaltsstoffen des Abwassers resultieren. Auf der Grundlage der Bestandteile dieser polaren Phase sollte insbesondere die Extraktion von Stoffen, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (z. B. Alkohole, Carbonsäuren) gut gelingen. Veröffentlichungen und Applikationsberichte liegen dazu bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor, da die Entwicklung des Acrylat-Twisters noch nicht abgeschlossen ist. Im Vergleich zum PDMS-Twister verfügt der Acrylat-Twister nur über 25 µl stationäre Phase.

Bei der Durchführung der SBSE mit den Acrylat-Twistern ist zu beachten, dass die stationäre Phase thermisch nicht so stabil ist und daher eine maximale Thermodesorptionstemperatur von 220°C nicht überschritten werden sollte. Außerdem hat sich während der Untersuchungen gezeigt, dass die Acrylat-Twister nach dem Extraktionsschritt durch sorgfältiges Abtrocknen mit einem fusselfreien Tuch und anschließendem Trocknen an der Luft von Wasser befreit werden sollten, da ein zu hoher Wasseranteil zum Zufrieren der Kühlfalle während der Kryofokussierung führen kann.

Im Rahmen der Methodenentwicklung sind die verschiedenen Twister in unterschiedlichen Größen und unter Variation der Bedingungen für die Stir Bar Sorptive Extraction (Rührzeiten und -geschwindigkeiten) untersucht worden. Die Resultate sind im Abschnitt 3.1.3.2 und 3.1.3.4 dargestellt.

2.3.2.3 Probenvorbereitung Papiere

Für die Analyse fertiger Papiere auf mögliche endokrin wirksame Einzelstoffe wurden Untersuchungen mittels Thermodesorption-GC/MS durchgeführt. Diese Untersuchungsmethode ist im Anhang 4 der RAL-UZ 14 [46] für die Analyse flüchtiger Verbindungen aus Recyclingpapieren beschrieben. Das Verfahren beruht auf einer Erhitzung eines repräsentativen Prüfstücks des Papiers auf 180°C über einen Zeitraum von 5 Minuten. Die ausgetriebenen Analyten werden anschließend in der Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff bei -150°C gekühlt. Nach schnellem Aufheizen der Kühlfalle werden die Analyten in das GC/MS-System überführt und dort qualitativ und in einigen Fällen auch quantitativ untersucht.

2.3.3 Methoden zur Untersuchung der endokrinen Wirkung von Abwasserproben

Wie bereits im Abschnitt 1.1 dargestellt, wurden die Untersuchungen von Abwasserproben, Papierextrakten und -eluat, chemischen Additiven, Faserstoffextrakten etc. mit dem R-YEA-Test durchgeführt. Dies ist insbesondere mit den bereits in der deutschen Papierindustrie durchgeführten Untersuchungen zu begründen, deren Ergebnisse die Grundlage für dieses Projekt darstellen. Im INFOR Projekt Nr. 45 [9] wurde das Testsystem u. a. ausgewählt, da es zu einer DIN-Normung dieses Verfahrens kommen sollte. Die Normung eines in vitro-Testverfahrens zum Nachweis endokriner Wirkungen über DIN ist zum Zeitpunkt der Berichterstattung allerdings eingestellt, da es neue vielversprechende Verfahren auf molekular-biologischer Basis gibt, die man erst erproben möchte. Dann wurde diskutiert, ein sehr ähnlich aufgebautes Testsystem nach CEN zu zertifizieren, das aber mit einem anderen Hefezellenstamm arbeitet. Der Hefetest mit reduzierter Zellwand (sensitiver für Umweltproben) konnte nicht weiter verfolgt werden, da er nicht freigegeben wurde (Lizenz). Es wurde jedoch auf EU-Ebene ein Ringversuch dazu gestartet. Ferner muss verfolgt werden, welches in vitro-Verfahren von der OECD als Standardverfahren vorgeschlagen wird. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen aus den vorausgegangenen Projekten zu gewährleisten, kam das bisher eingesetzte Testsystem des R-YEA auch

für die folgenden Arbeiten zur Anwendung. In allen hier beschriebenen Untersuchungen wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse nur noch die östrogene Wirkung der Proben untersucht. Androgene Wirkungen von Abwässern aus der Papierindustrie sind im vorliegenden Projekt nicht betrachtet worden, da sie nur in Ausnahmefällen bislang beobachtet worden sind [9, 18]. Insofern beziehen sich alle kommenden Aussagen und Ergebnisse zur „endokrinen“ Wirkung ausschließlich auf die getestete östrogene Wirkung der Proben. Die in vitro-Untersuchungen wurden im Unterauftrag durch die Fa. INCOS BOTÈ GmbH, Nieder-Olm, durchgeführt.

Ein standardisiertes in vivo-Messverfahren zur Bestimmung der endokrinen Wirkung von Abwasserproben existiert ebenfalls nicht. Nach Auswertung der Literatur und Beratung durch unabhängige Forschungsstellen wurde ein Untersuchungsverfahren in Anlehnung an die OECD Guideline for Testing of Chemicals 204 „Prolonged Toxicity Test“ mit Zebraabfingern (*Danio rerio*) ausgewählt. Diese Untersuchungen wurden an der Universität Heidelberg, Institut für Zoologie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Braunbeck durchgeführt.

2.3.3.1 In vitro-Untersuchungen mit dem Recombinant Yeast Estrogen Assay (R-YEA)

Bei dem ausgewählten Wirkungstest handelt es sich um ein in vitro-Verfahren mit rekombinanten Hefezellen.

Testprinzip

Während der Inkubation der Hefen werden in Anwesenheit von Kupferionen die jeweiligen Rezeptoren gebildet. Sind geeignete Liganden, die an den jeweiligen Rezeptor andocken können, im Testansatz vorhanden, so reagieren diese nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ mit den Rezeptoren und aktivieren diese (vgl. **Abb. 2**).

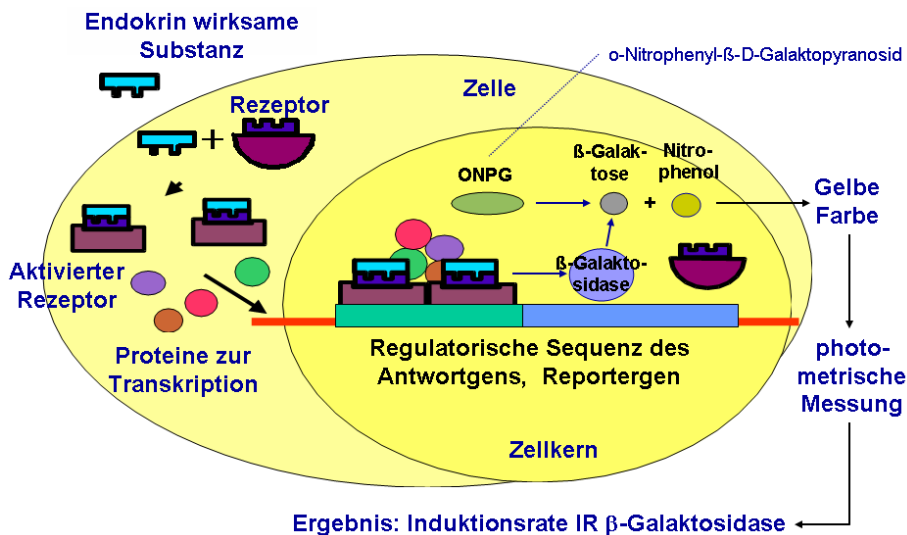


Abb. 2: Prinzip des R-YEA nach [47] überarbeitet

Der Ligand-Rezeptor-Komplex wirkt nun als Transkriptionsfaktor und bindet an das entsprechende Antwort-Element. Weiterhin erfolgt die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie und sorgt für die Transkription des Reportergens lacZ bzw. für die Bildung der β -

Galaktosidase. Die östrogenabhängige Induktion der β -Galaktosidase kann über die Aktivität des Enzymes quantitativ bestimmt werden.

Der Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgt nach der Lyse der Hefezellen durch die Zugabe der farblosen Substanz o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG), die durch das Enzym in β -D-Galaktose und den gelben Farbstoff o-Nitrophenol gespalten wird (vgl. **Abb. 3**). Diese Reaktion kann photometrisch nachgewiesen werden (OD 420).

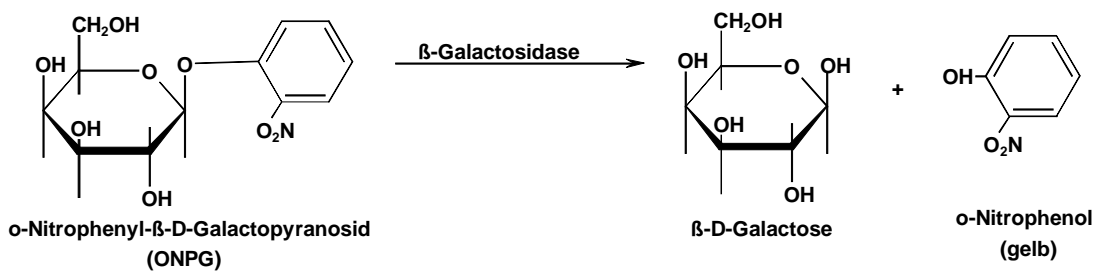


Abb. 3: Spaltungsreaktion von ONPG durch β -Galactosidase [48]

Die Enzymaktivität (optische Dichte OD 420 bezogen auf OD 600, Zellzahl) der Probe, unter Berücksichtigung der Enzymaktivität der Negativkontrolle, gibt die Induktionsrate der β -Galaktosidase an. Die Zytotoxizität kann über die Erfassung des Wachstums der Hefen (OD 600) im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden.

Testdurchführung

Um Wachstumshemmungen der Hefen im Testansatz zu vermeiden, wurden die pH-Werte der Proben auf Werte zwischen 6,8 und 7,2 eingestellt. Die Hefen werden über Nacht in dem jeweiligen Anzuchtmedium (2 % Glukose, 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base, östrogen: + 36 mg/l L-Lysin, 24 mg/l L-Histidin) vermehrt. Vor der Inkubation der Hefen wurde eine optische Dichte (600 nm) der Hefensuspension von 0,1 eingestellt, in dem die Hefen für 5 min bei 1.440 g und 4°C abzentrifugiert wurden, der Überstand verworfen und die Hefen in einer Lösung (1 Teil 10-fach Konzentrat des Anzuchtmediums + 1 Teil 1 M Mannose) resuspendiert wurden.

Die Untersuchung der Abwasserproben erfolgte in der Regel in Verdünnungsstufen mit folgenden Konzentrationen: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %. Der Probenanteil im Testansatz betrug 66,7 % bzw. 66,7 % der Verdünnung, d. h. es wurden jeweils 80 μ l der Proben in die wells einer 96-well Platte gegeben. Dazu wurden 20 μ l des Reaktionsmediums (10-fach Konzentrat des Anzuchtmediums + 0,6 mg/ml Ampicillin und 0,6 mg/ml Streptomycin sowie 5,4 μ l/ml 150 μ M Kupfersulfat-Lösung) pipettiert und anschließend 20 μ l der eingestellten Hefensuspension zugegeben. Die 96-well Platten wurden anschließend bei 30 °C und 150 Upm für 18 h inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung des Wachstums der Hefen (OD 600 nm) sowie der β -Galaktosidase-Test. Pro well wurden 100 μ l Lac-Z-Puffer (0,06 M Na₂HPO₄, 0,01 M KCl, 0,01 M MgSO₄, 0,04 M NaH₂PO₄, 0,1 % SDS, 2 mg/L ONPG, 0,25 mg/ml Lyticase) in die wells pipettiert und die Platten für 4 h bei 37 °C und 900 Upm erneut inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des gebildeten gelben Farbstoffs (Nitrophenol) bei 420 nm. In der **Abb. 4** ist der Ablauf des Tests zusammenfassend dargestellt.

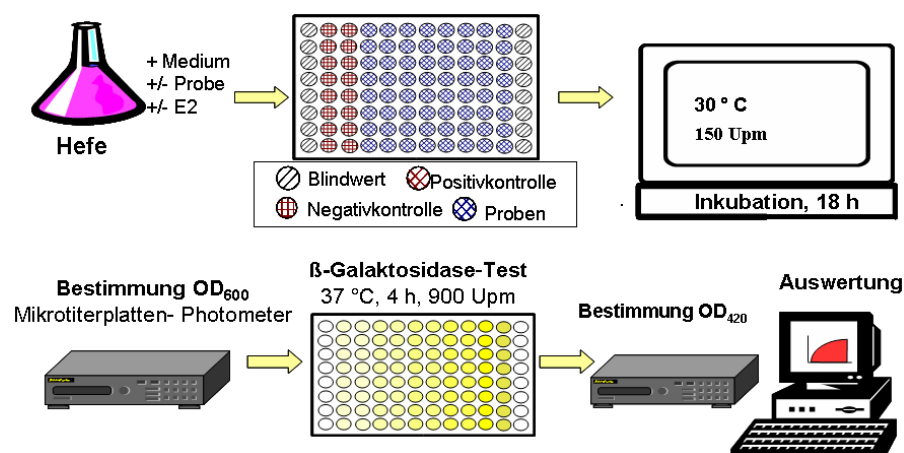


Abb. 4: Testschema des R-YEA nach [9]

Bei zytotoxischen Effekten ist eine Verminderung des Zellwachstums bei der Messung mit OD 600 nm feststellbar. Weicht das Zellwachstum um mehr als 25 % von der Blindprobe ab, ist die Probe als zytotoxisch einzustufen und eine Bewertung ist nicht möglich. Auch ein erhöhtes Zellwachstum kann die Beurteilung der Ergebnisse beeinflussen.

Die Untersuchung der Proben erfolgte im Wesentlichen in fünf Verdünnungsstufen (siehe **Tab. 6**). Lediglich in Einzelfällen, z. B. auf Grund zytotoxischer Effekte, wurden zusätzliche Verdünnungsstufen untersucht. Zudem wurden in jedem Testansatz Positiv- und Negativkontrollen sowie Blindwerte mitgeführt. Mit den Blindwerten wurden die Eigenfärbungen bzw. Trübungen der Proben bei der Bewertung berücksichtigt und von den jeweiligen Messwerten subtrahiert.

Tab. 6: Verdünnungsreihen der Proben im R-YEA

G _{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz
1,5	66,67 %
3	33,33 %
6	16,66 %
12	8,33 %
24	4,17 %
48	2,19 %

Das Testergebnis wird bei einer Induktionsrate der β-Galaktosidase von $\geq 1,5$ (im Vergleich zur Negativkontrolle) als signifikant positiv gewertet. Gemäß der geplanten Normung des Tests wird als Ergebnis die erste Verdünnungsstufe G_{EH} (G=Verdünnungsstufe, E=estrogen, H=Hefe) angegeben, deren Wert unter 1,5 liegt.

Auswertung der Ergebnisse des R-YEA

Die Messung der IR ermöglicht es nicht, mit einer eindeutigen Ja-Nein-Entscheidung eine endokrine Wirkung zu beurteilen. Anhand von Positiv- und Negativkontrollen lässt sich aber aussagen, dass eine Induktionsrate der β-Galaktosidase von IR = 1,5 eine signifikante Erhöhung darstellt und somit mit statistischer Sicherheit eine östrogene Wirkung der Probe vorliegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt bei IR=1,5 nur 1 %. Dagegen bedeutet eine In-

duktionsrate unter 1,5 nur, dass die Wahrscheinlichkeit abnimmt, mit der in der jeweiligen Probe östrogenes Potenzial vorliegt. Es bedeutet nicht, dass ein östrogenes Potenzial für die Probe gänzlich ausgeschlossen werden kann. Zur Beurteilung der $IR < 1,5$ sind jedoch immer die Bedingungen im jeweiligen Testansatz zu berücksichtigen, so dass eine vergleichende Diskussion dieser Werte zu falschen Interpretationen führen kann. Wird an einer Probe mehrfach eine IR knapp unter 1,5 festgestellt z. B. 1,4 oder 1,3, so ist es wahrscheinlich, dass diese Probe über ein östrogenes Potenzial verfügt.

Die Bewertung des R-YEA kann durch zytotoxische Wirkungen der Probe beeinträchtigt werden. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgt über das Wachstum der Hefen, wobei die Optische Dichte (OD 600 nm) der Proben nach der Inkubation auf die OD (600 nm) der Negativkontrolle bezogen wird. Messwerte von Proben mit einem Wachstum zwischen 125 % und 75 % der Negativkontrolle werden als nicht zytotoxisch eingestuft, von 75 % bis 50 % als zytotoxisch und Wachstumswerte unter 50 % als stark zytotoxisch. Im letzteren Fall kann das östrogene Potenzial nicht bestimmt werden. Zytotoxische Effekte führen im R-YEA eher zu falsch negativen Ergebnissen als zu falsch positiven Ergebnissen.

Wachstumswerte, die über 125 % der Negativkontrolle liegen, deuten auf sehr hohe Nährstoffgehalte der Proben oder auf das Vorhandensein der entsprechenden Selektionsmarker in den Proben hin.

Basierend auf den vorliegenden Daten kann für den vorliegenden Testansatz des R-YEA von einer Nachweisgrenze von 0,1 pM 17- β -Östradiol ausgegangen werden. Auf Grund der Verdünnung, die sich durch den Probenansatz bei der Untersuchung von Gewässerproben ergibt, sollte vorsorglich von einer Nachweisgrenze von 0,2 pM 17- β -Östradiol (= 0,054 ng/l) ausgegangen werden.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich bei dem Hefetest um ein Screeningverfahren handelt, das angibt, ob Stoffe in einer Umweltprobe vorhanden sind, die an den jeweiligen humanen Hormonrezeptor binden und dadurch eine hormonartige Wirkung hervorrufen können. Stoffe mit östrogenen Wirkung, die nicht rezeptor-vermittelt, sondern über einen anderen Mechanismus wirken, können mit diesem Testsystem nicht erfasst werden. Des Weiteren müssen die endokrinen Stoffe der Probe durch die Zellwand zum Rezeptor gelangen können.

Eine toxikologische bzw. ökotoxikologische Bewertung kann mit diesem Testsystem nicht getroffen werden, da das Testsystem keinerlei Aufschluss über Parameter wie die Abbaubarkeit, Bioverfügbarkeit, Verteilung und über den Metabolismus sowie die Art dieser Substanzen geben kann.

2.3.3.2 In vivo-Untersuchungen

Die in vivo-Untersuchungen wurden an Abwasserproben von vier verschiedenen Papierfabriken durchgeführt. Eine Papierfabrik wurde mit einem zeitlichen Abstand von ca. 7 Monaten ein zweites Mal beprobt. Von jeder Papierfabrik wurden vier verschiedene Probenahmestellen untersucht:

- das Brauchwasser nach Aufbereitung,
- der Zulauf zur Abwasserreinigungsanlage,
- der Ablauf der ersten biologischen Reinigungsstufe (anaerob bzw. aerob) sowie
- der Ablauf der Nachklärung.

Von jeder Probenahmestelle wurden ca. 25 l Abwasser entnommen. Parallel zu den in vivo-Untersuchungen wurden in vitro-Untersuchungen der Proben mittels R-YEA-Test durchgeführt, außerdem die Standardparameter CSB, pH-Wert und Leitfähigkeit bestimmt und ausgewählte Proben mittels GC/MS auf einzelne Inhaltsstoffe analysiert.

Die Proben für die in vivo-Untersuchungen (jeweils 21 l) wurden direkt nach der Probenahme in der Papierfabrik zum Institut für Zoologie an die Universität Heidelberg gefahren. 20 l der Proben wurden dort eingefroren. Mit der verbliebenen Probemenge wurde zunächst ein Test auf akute Toxizität durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten auf der Grundlage eines Embryo-Toxizitätstests mit Zebrafischeiern nach DIN EN ISO 15088 [49]. Durch diese Akut-Tox-Tests wurde gewährleistet, dass die Zebraabärblinge in dem anschließenden Testverfahren keinem toxischen Medium ausgesetzt werden und die zu untersuchenden endokrinen Wirkungen nicht durch andere toxische Wirkungen der Abwasserprobe überlagert werden. Soweit bei dieser Untersuchung akut toxische Eigenschaften der Probe festgestellt wurden, erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Abwasserprobe beim Testansatz (Testkonzentration nicht geringer als 1:10 des LC50-Wertes).

Wie oben bereits erwähnt, sollten die vorliegenden Proben nur auf östrogene Wirkung untersucht werden. Entsprechend dem vorgegebenen Verfahrensablauf wurden ausgereifte männliche und weibliche Zebraabärblinge über einen Zeitraum von 10 Tagen in einem halb-statischen Testsystem (Aquarium) der (verdünnten) Wasserprobe ausgesetzt. Die Testdauer von 10 Tagen ist ausreichend für die Vitellogenin-Induktion in den Testfischen. Vitellogenin ist ein Eidotter-Vorläufer-Protein, welches in der Leber durch östrogene Induktion gebildet wird. Es wird durch das Blutsystem in die Ovarien transportiert und dort in verschiedene Dotterproteine gespalten. Diese Proteine dienen als Nahrung für die sich entwickelnden Embryos. Durch natürliche und/oder synthetische östrogen wirksame Stoffe im (Ab-)Wasser wird ebenfalls eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor ausgelöst, wodurch auch in männlichen und in jungen Fischen eine Vitellogenin-Synthese stattfindet [50]. Diese Reaktion kann in der Natur zu Reproduktionsstörungen bei den Fischen führen. In dem eingesetzten Testverfahren dient der Vitellogeningehalt als Biomarker für die östrogene Aktivität der (Ab-)Wasserprobe. Der Vitellogeningehalt wird im Totalhomogenat der Testfische mit Hilfe des etablierten enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen. Die Vitellogenin-Bestimmung wurde im Rahmen dieses Projektes unter der Leitung von Dr. Holbech an der University Southern Denmark in Odense durchgeführt. Neben dem Vitellogenin-Gehalt sind auch die Mortalität und das Alterungsverhalten der Fische Untersuchungsergebnisse des durchgeführten biologischen Testverfahrens.

Versuchsdurchführung und Testbedingungen

Testsystem

Species:	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)
Alter, Geschlecht und Größe:	Ausgereifte männliche und weibliche Fische aus dem gleichen Brutstamm und im gleichen Alter
Herkunft:	Die Testfische stammen aus den lokalen Brutstämmen der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie der Universität Heidelberg.

Haltungsbedingungen: In Übereinstimmung mit der OECD Test Guideline No. 204 für ausgedehnte Toxizitätstests mit Fischen (OECD 1984) werden die Fische in den Labors mindestens zwei Wochen vor Beginn des Tests im Wasser ohne jegliche Chemikalienzugabe gehalten. Während dieser Haltung werden die Fische mit Salzwassergarnelen (*Artemia* sp.) und kommerziellem Fischfutter (TetraMin, Tetra, Melle Germany) *ad libitum* gefüttert.

Testanlage

Typ und Größe: 5-Liter-Glas-Aquarien mit jeweils 4 Liter Testmedium
Identifizierung: Jede Testeinheit ist durch den Code der Wasserprobe und die Nummer des Aquariums eindeutig identifiziert.

Testbedingungen

Anzahl der Replikate: 10 Fische (5 männliche und 5 weibliche), verteilt auf zwei Aquarien
Anzahl der Fische pro Replikat: 5
Beladung: Maximale Beladung von 1 g Fisch / Liter
Testumgebung: Geregelt Raumluft
Wassertemperatur: 25 ± 2 °C (erreicht durch von Heizmatten)
Lichtregelung: 16 h hell : 8 h dunkel
Lichtintensität: 540 – 1.080 lux
pH-Wert der Probe: 6,5 – 8,5
Maximale Änderungen während des Testes: $\pm 0,5$
Konzentration an gelöstem Sauerstoff: Mindestens 60 % der Sättigungskonzentration
Futter: Die Fische werden mit Salzwassergarnelen (*Artemia* sp.) und handelsüblichem Fischfutter (TetraMin, Tetra, Melle) *ad libitum* zweimal täglich gefüttert. Zwischen den Fütterungszeiten liegen mindestens 3 Stunden.
Reinigung des Aquariums: Nicht gegessenes Futter und Fäkalien werden täglich durch Absaugen vom Boden des Behälters entfernt.

Testwasser

Wasserproben entweder unverdünnt oder verdünnt mit entchlortem Leitungswasser.

Testablauf

Konzentration des Abwassers: Verdünnung entsprechend des LC 50 der Ergebnisse des Embryotoxizitätstests (nicht weniger als 1:10 des LC 50)

Kontrolle:	Leitungswasser ohne Zusatz der Abwasserproben
Einsetzen der Fische:	Zu Beginn des Tests werden jeweils 5 Fische in zufälliger Reihenfolge in jedes Aquarium eingesetzt.
Expositionsdauer:	10 Tage
Wechsel der Wasserprobe:	Während der Testdauer wird die Wasserprobe mindestens alle 48 Stunden ersetzt, in dem mindestens $\frac{3}{4}$ des Behältervolumens (ca. 3 l) neues Wasser eingebracht wird.

Testparameter

Mortalität, Anzeichen von Vergiftung und Vitellogenin:	Während der Testdauer werden alle Testfische mindestens einmal täglich im Hinblick auf Mortalität und Vergiftungsanzeichen beobachtet. Tote Fische werden vom Boden des Behälters entfernt und verworfen. Klar erkennbare Unterschiede im Aussehen und Verhalten zwischen getesteten Fischen und Fischen aus dem Kontrollmedium werden täglich dokumentiert. Am Ende des Tests wird das Nassgewicht aller Fische bestimmt. Anschließend wird der Vitellogeningehalt für alle überlebenden Fische untersucht.
Wiegen der Testfische:	Eine Teilprobe von 10 männlichen und 10 weiblichen Fischen aus dem Stamm der Testfische wird vor dem Test gewogen, um das mittlere Gewicht zu bestimmen.
Messung von pH-Wert, gelöstem Sauerstoff und Wassertemperatur:	Die Wassertemperaturen, pH-Werte und Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff von allen Testansätzen und von dem Kontrollansatz werden an jedem Arbeitstag gemessen.

Probenahme am Ende des Experiments

Tötung der Fische:	Die Fische werden in einer gesättigten Lösung von 4-Aminobenzoesäureethylester (Benzocain, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) betäubt.
Vorbereitung und Lagerung der Proben:	Nach der Betäubung werden die Fische individuell gewogen und von jedem Fisch separat das Geschlecht bestimmt. Die Tierkörper werden unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrem Transfer an die University of Southern Denmark, Odense, für die Vitellogeninmessung bei -70°C gelagert.
Vitellogeninmessung:	Der Vitellgeningehalt wird individuell im Totalhomogenat jedes Fisches mittels ELISA bestimmt.

2.3.4 Untersuchungen zu Einzelstoffen mittels GC/MS

Die GC/MS wurde im vorliegenden Projekt sowohl für die Untersuchung von Papieren als auch für die qualitative und quantitative Analyse von Inhaltsstoffen in (behandelten und unbehandelten) Abwasserproben der Papierindustrie eingesetzt. Es wurde mit einem GC 6890 mit MSD 5975N der Fa. Agilent gearbeitet. Das Gerät ist mit der Thermodesorptionseinheit TDS3 der Fa. Gerstel ausgestattet. Für die Identifizierung einzelner Stoffe im Chromatogramm wurde die NIST05 MS-Spektren-Bibliothek herangezogen. Außerdem wurde in Einzelfällen durch Spiken der Probe mit einer Zielsubstanz die Identität und die Zuordnung einer Verbindung zu einem bestimmten Peak überprüft.

2.3.4.1 Analyse von gereinigten Papierfabriksabwässern auf definierte, potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe

Wie bereits in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben, kommen für die Untersuchung dieser Standard-Parameter im Abwasser genormte Analysenverfahren zum Einsatz. Alle diese Verfahren beruhen auf der Analytik mittels GC/MS. Je nach Parameter erfolgt die Probenvorbereitung durch Reinigen der Probe und Aufkonzentrieren bzw. Derivatisierung der Analyten. Die im Einzelnen untersuchten Parameter und die Bestimmungsgrenzen der Messverfahren sind in **Tab. 7** aufgelistet.

Tab. 7: Untersuchte Inhaltsstoffe und Bestimmungsgrenzen der Messmethoden

Parameter	Bestimmungsgrenzen
<i>Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)</i> <ul style="list-style-type: none"> • Naphthalin • Fluoren • Acenaphthylen • Acenaphthen • Anthracen • Phenanthren • Fluoranthen • Pyren • Chrysen • Benzo(a)pyren 	Naphthalin 100 ng/l, alle anderen Einzelstoffe jeweils 50 ng/l
Bisphenol A	50 ng/l
<i>Phthalate</i> <ul style="list-style-type: none"> • Dimethylphthalat • Diethylphthalat • Diisobutylphthalat • Di-n-butylphthalat • Butylbenzylphthalat • Di(2-ethylhexyl)phthalat • Di-n-octylphthalat 	alle Einzelstoffe jeweils 100 ng/l
Pentachlorphenol PCP	50 ng/l

2.3.4.2 Untersuchung und Identifizierung von Abwasserinhaltsstoffen nach Anreicherung der Analyten durch SBSE

Die Twister wurden nach erfolgter Anreicherung zunächst mit Reinstwasser gespült und mit einem fusselfreien Tuch trocken getupft. Bei den polaren Acrylat-Twistern, die auch Wasser aus der Probe in größeren Mengen aufnehmen können, hat sich ein weiterer Trocknungsschritt an der Luft über einen Zeitraum von 1 h als sinnvoll erwiesen, um das Einfrieren während der Kryofokussierung zu vermeiden.

Danach wurden die Twister ebenfalls thermodesorbiert, die Analyten in der Kryofokussierung angereichert und mittels GC/MS untersucht. Für die Thermodesorption der PDMS-Twister galt dabei folgendes Temperaturprogramm: Starttemperatur 20°C, 60°C/min auf 300°C, 5 min halten. Aufgrund der geringeren thermischen Stabilität der Acrylat-Twister wurden diese nur auf 220°C aufgeheizt, wiederum mit einer Haltezeit von 5 min. Die Thermodesorption erfolgte im Heliumstrom (Helium 5.0) mit einem Gasfluss von 35 ml/min.

Die Bedingungen für die gaschromatografische Analyse sind im folgenden aufgelistet:

GC 6890 Methode

Ofen: Starttemperatur: 40°C, 27°C/min auf 310°C, 10 min halten
Aufnahmezeit: 37 min
Modus: splitlos
Säule: SUPELCO 24392, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gasfluss : 1,0 ml/min

MSD 5975N Methode

Scan: 25-400
Solvent Delay: 3,00 min
MS Quadrupol: 200°C
MS Source: 250°C

Die PDMS-Twister wurden nach erfolgter Thermodesorption über einen Zeitraum von 4 h bei 300°C und einem Heliumfluss von 50 ml/min im TDS konditioniert. Die Acrylat-Twister wurden 30 min bei 220°C ebenfalls im Heliumstrom mit 50 ml/min ausgeheizt. Beide Röhrchen wurden nach dem Erkalten in verschlossenen Vials bis zur nächsten Analyse gelagert.

2.3.4.3 Untersuchung von Papieren durch Thermodesorption-GC/MS

Die Thermodesorption der Papiere, jeweils in Form von Papierstreifen in der Größe von 3 mm x 60 mm, wurde entsprechend des Temperaturprogramms nach RAL –UZ 14, Anhang 4, bei einer Maximaltemperatur von 180°C (5 min Haltezeit) und einem Heliumfluss (Helium 5.0) von 35 ml/min durchgeführt. Die Bedingungen für die gaschromatografische Analyse sind im folgenden aufgelistet:

GC 6890 Methode

Ofen: Starttemperatur: 40°C, 5 min halten, 20°C/min auf 140°C, 10°C/min auf 240°C, 2°C/min auf 290°C, 15 min halten
Aufnahmezeit: 51 min
Modus: Solvent Vent, Split 1:10

Säule: SUPELCO 24392, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gasfluss : 1,0 ml/min

MSD 5975N Methode

Scan: 25-400
Solvent Delay: 3,00 min
MS Quadrupol: 200°C
MS Source: 250°C

Die Glasrohre für die Aufnahme der Papierstreifen wurden nach erfolgter Analyse mit einem Helium-Fluss von 50 ml/min und einer Maximaltemperatur von 300°C über 5 min konditioniert und nach dem Erkalten, mit Endstopfen versehen, gelagert.

3 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von Abwässern, Faserrohstoffen, chemischen Additiven und hergestellten Papieren erläutert. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag auf den Untersuchungen der Wirkung und Inhaltsstoffe der Abwässer der Papierindustrie, da die gereinigten Abwässer größtenteils direkt in die Oberflächengewässer abfließen. Die Untersuchungen der Rohwässer, der Faserstoffe, Additive und fertigen Papiere dienen vor allem dem Aufdecken von Quellen und Senken möglicher endokrin wirksamer Stoffe bei der Papierherstellung.

3.1 Untersuchungen zur endokrinen Wirkung und zu Inhaltsstoffen von Abwässern aus der Papierherstellung

Ein großer Teil der Untersuchungen der Abwässer der deutschen Papierindustrie auf endokrine Wirkung wurden in diesem Projekt, wie auch in anderen bereits abgeschlossenen Forschungsprojekten, mit Hilfe des R-YEA-Testverfahrens durchgeführt. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf aquatische Lebewesen bewerten zu können, sollen in diesem Projekt ausgewählte Abwasserproben auch mit Hilfe eines in vivo-Testverfahrens untersucht werden.

Alle weiteren Proben (Extrakte und Eluate von Faserstoffen, Papieren und Altpapieren, chemische Additive) wurden ausschließlich mit dem R-YEA-Test untersucht.

3.1.1 Untersuchung der endokrinen Wirkung von (Ab-)Wasserproben mittels R-YEA-Testverfahren

In diesen ersten orientierenden Untersuchungen wurden die Abwasserproben von 16 verschiedenen Papierfabriken auf ihre endokrine Wirkung mittels R-YEA untersucht.

3.1.1.1 Abwasserscreening

Bei der Auswahl der zu beprobenden Werke wurden alle Papiersorten und verschiedene Faserrohstoffe berücksichtigt. Ziel dieser Untersuchungen war es, zunächst ein Screening der endokrinen Wirkung von Papierfabriksabwässern durchzuführen. Dabei sollte in erster Linie der Verlauf der endokrinen Wirkung beim Durchlauf des Wassers durch die Papierfabrik untersucht werden. Daher wurden als Probenahmestellen in allen Fällen das

Brauchwasser (nach Aufbereitung), der Zulauf zur ARA, der Ablauf der ersten biologischen Reinigungsstufe (aerob oder anaerob) und der Ablauf der Nachklärung ausgewählt. Von diesen Proben wurden regelmäßig weitere Summenparameter, wie der CSB, pH-Wert, Leitfähigkeit und AOX, bestimmt. Dies diente in erster Linie dem Test, ob die Proben den normalen Betriebszuständen der ARA entsprechen, aber auch der Untersuchung möglicher Abhängigkeiten bzw. Korrelationen der R-YEA-Ergebnisse von weiteren Abwasserparametern. Im folgenden werden die Ergebnisse des R-YEA-Testes der unterschiedlichen Abwasserproben der einzelnen Werke diskutiert. Induktionsraten von 1,5 oder höher werden jeweils fett gedruckt. Diese Proben sind als endokrin wirksam einzustufen. Mögliche Korrelationen der Ergebnisse der endokrinen Wirkung der Abläufe der Nachklärung mit den o. g. Summenparametern werden in Form von Diagrammen zusammengestellt, soweit dies sinnvoll erschien.

a) Werke mit Tissue-Produktion (Tab. 8 - Tab. 11)

Tab. 8: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk Y (100 % ZS)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,19	0,49	1,4
Zulauf ARA	1.202	7,58	2,95	1,0
Ablauf aerobe Hochlaststufe	886	7,44	2,36	1,1
Ablauf Nachklärung	377	7,16	2,25	1,4

Tab. 9: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk X (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	6,97	0,53	1,0
Zulauf ARA	1.274	6,64	2,28	1,8
Ablauf aerobe Hochlaststufe	1.037	7,07	2,90	7,6
Ablauf Nachklärung	87	7,66	2,57	1,6

Tab. 10: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk J (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	---	---	---	---
Zulauf ARA	1.823	6,89	2,19	5,2
Ablauf IC-Reaktor	894	7,41	2,76	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	178	7,31	2,21	1,9

Tab. 11: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk E (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,04	0,67	1,2
Zulauf ARA	1.537	6,82	2,44	zytotoxisch
Ablauf IC-Reaktor	711	7,30	2,89	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	167	7,21	2,01	1,3

Bewertung

In dem Zellstoff verarbeitenden Werk sind alle vier Probenahmestellen endokrin nicht wirksam. Von den drei AP verarbeitenden Werken konnten nicht alle Proben mit dem R-YEA-Test auf endokrine Wirkung bewertet werden, da in einem Fall der Zulauf zur ARA und in beiden untersuchten Werken mit Anaerobstufe der Ablauf des IC-Reaktors stark zytotoxisch reagiert haben. Alle untersuchten Brauchwasserproben sind endokrin nicht wirksam. Dagegen sind in den beiden Werken X und J sowohl die Zuläufe zur ARA als auch der Ablauf der Nachklärung deutlich endokrin wirksam. Im Werk E ist der Ablauf der Nachklärung mit einer IR von 1,3 als nicht endokrin wirksam einzustufen.

b) Werke mit Herstellung von Grafischen Papieren (Tab. 12 - Tab. 16)

Tab. 12: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk A (100 % ZS)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,02	0,22	1,3
Zulauf ARA	1.586	7,81	0,95	0,9
Ablauf aerobe Hochlaststufe	485	7,01	1,42	3,5
Ablauf Nachklärung	53	7,51	1,33	0,8

Tab. 13: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk K (HS/AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	36	7,58	0,38	1,3
Zulauf ARA	2.220	7,61	1,93	2,9
Ablauf aerobe Hochlaststufe	1.688	7,44	1,81	4,8
Ablauf Nachklärung	408	8,11	1,89	3,0

Tab. 14: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk U (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	31	7,28	0,93	1,3
Zulauf ARA	3.097	6,90	4,11	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	251	7,88	4,06	2,2

Tab. 15: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk I (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,124	0,54	1,2
Zulauf ARA	2.678	6,74	2,06	zytotoxisch
Ablauf IC-Reaktor	922	7,33	2,93	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	232	7,15	2,66	1,6

Tab. 16: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk N (ZS/HS)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,02	0,40	1,3
Zulauf ARA	2.023	7,81	2,10	1,7
Ablauf aerobe Hochlaststufe	820	7,33	1,81	2,8
Ablauf Nachklärung	152	7,66	1,89	1,8

Bewertung

Auch in den untersuchten Papierfabriken, die grafische Papiere (Zeitungsdruck-, Magazin-, Kopierpapiere u. a.) herstellen, sind alle untersuchten Brauchwässer endokrin nicht wirksam. Die Zuläufe zur ARA sind in zwei Fällen stark zytotoxisch, in zwei Fällen deutlich endokrin wirksam und nur im Fall der Zellstoff verarbeitenden Fabrik endokrin nicht wirksam. In allen Fabriken ist das endokrine Potenzial im weiteren Verlauf angestiegen. Alle Abläufe der ersten biologischen Reinigungsstufe (aerob) sind mit IR-Werten von 2,8 bis 4,8 deutlich endokrin wirksam. Der Ablauf des IC-Reaktors im Werk I ist so stark zytotoxisch, dass keine IR ermittelt werden konnte. Die Abläufe der Nachklärung sind, mit Ausnahme des Zellstoff verarbeitenden Werkes, ebenfalls endokrin wirksam. Unterschiede in den Abwasserreinigungstechnologien können nicht festgestellt werden.

c) Werke mit Produktion von Verpackungspapieren (Tab. 17 - Tab. 23)

Abwasserreinigung anaerob / aerob

Tab. 17: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk L (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,66	0,32	1,3
Zulauf ARA	5.482	6,23	3,69	2,6
Ablauf IC-Reaktor	937	7,44	4,03	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	194	8,11	3,03	2,0

Tab. 18: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk W (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,64	1,60	1,4
Zulauf ARA	3.406	5,79	3,73	1,5
Ablauf IC-Reaktor	1.067	6,89	4,06	2,9
Ablauf Nachklärung	169	7,56	3,32	1,5

Tab. 19: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk H (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,51	1,44	1,4
Zulauf ARA	2.967	6,21	3,22	zytotoxisch
Ablauf IC-Reaktor	866	6,77	3,01	2,6
Ablauf Nachklärung	201	7,26	2,56	1,8

Tab. 20: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk O (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,32	1,05	1,2
Zulauf ARA	4.771	6,67	3,41	zytotoxisch
Ablauf IC-Reaktor	1.020	7,33	3,87	zytotoxisch
Ablauf Nachklärung	192	7,84	2,92	1,6

Abwasserreinigung aerob / aerob

Tab. 21: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk D (HS/ZS/DIP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,30	0,12	1,2
Zulauf ARA	3.092	6,69	1,61	1,1
Ablauf aerobe Hochlaststufe	1.535	6,98	1,35	1,6
Ablauf Nachklärung	94	7,4	1,50	2,3

Tab. 22: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk Z (100 % AP)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,20	0,12	0,8
Zulauf ARA	4.017	7,29	1,75	1,4
Ablauf aerobe Hochlaststufe	2.405	7,11	1,82	1,0

Tab. 23: Ergebnisse Abwasseruntersuchungen Werk M (ZS/HS)

Probenbezeichnung	CSB in mg/l	pH-Wert	Leitfähigkeit in mS/cm	IR im R-YEA
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,35	0,32	1,3
Zulauf ARA	1.822	7,82	1,78	1,7
Ablauf aerobe Hochlaststufe	743	7,41	1,95	1,2
Ablauf Nachklärung	159	7,51	1,66	1,3

Bewertung

Auch in den 7 untersuchten Papierfabriken, die Verpackungspapiere produzieren (Wellpappenrohpa-piere, Faltschachtelkartons u. a.), sind die für die Produktion eingesetzten Wasser endokrin nicht wirksam. Von den 7 Zuläufen zur ARA weisen drei eine $IR \geq 1,5$ auf und sind damit endokrin wirksam. Zwei der Zuläufe sind zytotoxisch und zwei mit IR-Werten $< 1,5$ endokrin nicht wirksam. Vier der 7 beprobten Verpackungspapier-Fabriken verfügen in der biologischen Abwasserreinigung über eine Anaerob-Stufe (IC-Reaktor). Die Abläufe der Anaerobie sind in zwei Fabriken stark zytotoxisch, in den anderen beiden Fabriken mit IR-Werten von 2,6 und 2,9 stark endokrin wirksam (Werk W und Werk H). In diesen beiden Werken haben die Proben vom Ablauf der Anaerobie das höchste endokrine Potenzial. Sowohl die Zuläufe zur ARA als auch die Abläufe der Nachklärung weisen deutlich geringere IR-Werte auf. Von den drei Werken, die über eine aerobe Hochlaststufe als erste biologische Reinigungsstufe verfügen, weist nur eine Probe (Werk D) eine höhere IR als 1,5 auf. In diesem Werk steigt die endokrine Wirkung nach der zweiten aeroben Reinigungsstufe aber deutlich an, so dass im Ablauf der Nachklärung eine IR von

2,3 gemessen wurde. Von den Abläufen der Nachklärung ist nur das Werk M, in dem Zellstoff und Holzstoff als Faserstoffe eingesetzt werden, endokrin nicht wirksam. Werk Z gehört zu den Indirekteinleitern, so dass hier keine Aussage zum Ablauf der Nachklärung getroffen werden kann. 5 der 7 Abläufe weisen mit IR-Werten von 1,5 bis 2,3 eine endokrine Wirkung auf.

In Auswertung der Ergebnisse aller 16 untersuchten Papierfabriken können folgende Aussagen abgeleitet werden:

- Die für die Produktion eingesetzten Oberflächen- und Brunnenwässer sind mit hoher Wahrscheinlichkeit endokrin nicht wirksam und können als Quellen für mögliche endokrin wirksame Stoffe in den Prozess- und Abwässern der Papierindustrie wohl zukünftig unberücksichtigt bleiben. Dass diese Wässer Stoffe enthalten, die im Laufe der Abwasserreinigung zu endokrin wirksamen Stoffen metabolisiert werden können oder aber in Wechselwirkung zu anderen potenziell endokrin wirksamen Stoffen aus den Prozesswässern treten können, ist eher unwahrscheinlich und kann im Rahmen dieses Projektes nicht weiter untersucht werden.
- Von den 16 Zuläufen sind 4 endokrin unbedenklich, 5 zytotoxisch und 7 Zuläufe sind mit IR-Werten $\geq 1,5$ als endokrin wirksam einzustufen. Zu den unbedenklichen Zuläufen gehören die beiden Werke, die zu 100 % ZS einsetzen (Werk Y – Tissue und Werk A - Grafische Papiere), aber auch zwei Werke, die aus 100 % AP bzw. aus HS/ZS/DIP Verpackungspapiere herstellen.
- Der Einfluss der biologischen Abwasserreinigung auf die endokrine Wirkung ist nicht einheitlich. Der Vergleich zwischen Zulauf zur ARA und Ablauf der ersten biologischen Reinigungsstufe ist bei den Anaerobanlagen aufgrund der hohen Zytotoxizität entweder im Zulauf oder im Ablauf des IC-Reaktors nicht möglich, in einem Fall wird die Induktionsrate höher. Ist die erste biologische Stufe eine aerobe Stufe, ist die Zytotoxizität nur in einem Fall problematisch. In 5 der 8 Aerobanlagen wird die IR nimmt das endokrine Potenzial signifikant zu, in einem Fall bleibt es annähernd konstant und in zwei Werken nimmt die IR signifikant ab.
- Der Vergleich Zulauf ARA – Ablauf Nachklärung ist in 5 der 16 Werke wegen Zytotoxizität nicht möglich, ein Werk ist Indirekteinleiter, so dass der Ablauf der Nachklärung nicht angegeben werden kann. Von den verbleibenden 10 Werken ist in 5 Werken im Ablauf der Nachklärung in etwa das gleiche endokrine Potenzial gemessen worden wie im Zulauf zur ARA, trotz zwischenzeitlich höherer Werte nach der ersten biologischen Reinigungsstufe. In 2 Werken ist die IR im Ablauf der ARA höher, in 3 Werken geringer als im Zulauf zur ARA.

Die endokrine Wirkung der Abwasserproben ergibt keine signifikanten Korrelationen zu den zusätzlich gemessenen Summenparametern. In **Abb. 5** sind die im gereinigten Papierfabriksabwasser ermittelten Induktionsraten des R-YEA-Testes exemplarisch gegen den Rest-CSB dieser Proben aufgetragen.

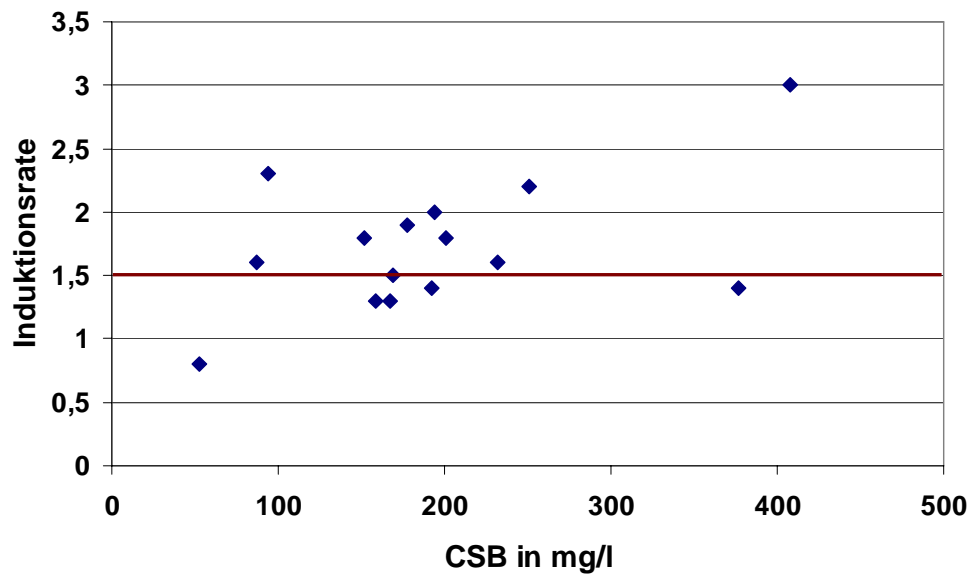


Abb. 5: Abhängigkeit der IR vom Rest-CSB im biologisch gereinigten Abwasser

Auch der AOX-Gehalt, der pH-Wert und die Leitfähigkeit der Proben haben in den gemessenen Größenordnungen keinen messbaren Einfluss auf die Induktionsraten. Allerdings ist die Bestimmung dieser Werte wichtig, um die korrekte Durchführung des R-YEA-Testes zu gewährleisten.

3.1.1.2 Wiederholbarkeit der Messergebnisse

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt [9, 10, 11, 18, 38], sind die Ergebnisse des R-YEA-Testes in den gereinigten Papierfabrikationsabwässern nicht konstant. Um einen Überblick zu bekommen, in welchen Schwankungsbreiten die Ergebnisse bei vergleichbaren Produktionsbedingungen in den Werken differieren können, wurden im Werk L (Herstellung von Verpackungspapieren aus 100 % AP) über einen Zeitraum von insgesamt zwei Jahren zu verschiedenen Jahreszeiten Proben vom Zulauf zur ARA und vom Ablauf der Nachklärung entnommen und mittels R-YEA-Test untersucht. **Abb. 6** gibt einen Überblick über die Messergebnisse der wiederholten Beprobung im Werk L in einem ausgewählten Zeitraum von ca. 10 Wochen. In dieser Zeit sind in der Papierfabrik keine wesentlichen Umstellungen im Produktionsprozess, in den eingesetzten Altpapiersorten, den chemischen Additiven oder in der Abwasserreinigung vorgenommen worden.

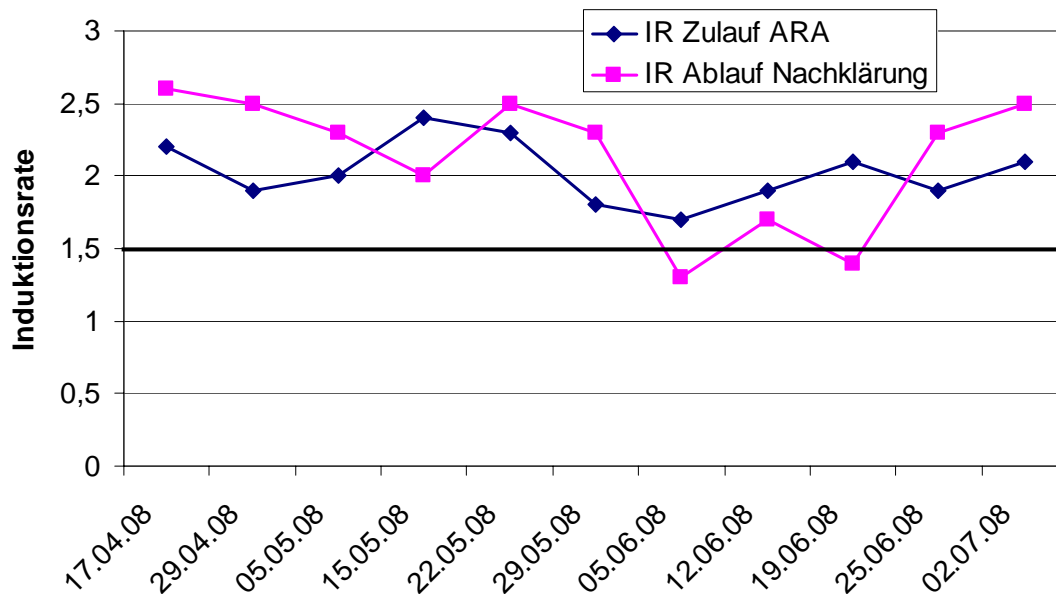


Abb. 6: Verlauf der endokrinen Wirkung im Zulauf zur ARA und im Ablauf der Nachklärung in Abhängigkeit von der Zeit

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, schwanken die Induktionsraten im Zulauf zur ARA in dieser Zeit zwischen 1,7 und 2,4. Im Ablauf der Nachklärung differieren die Messwerte noch stärker. Hier liegen die Werte zwischen 1,3 und 2,6. Der Zulauf zur ARA scheint zumindest in der endokrinen Wirkung weniger zu schwanken als das biologisch gereinigte Abwasser. Wie schon den o. g. Betrachtungen zu entnehmen ist, hat die Abwasserreinigung doch einen erheblichen Einfluss auf das gemessene endokrine Potenzial der Abwasserprobe. Möglicherweise haben schon geringe Änderungen in der Zusammensetzung des Abwassers oder in den Betriebsparametern der Abwasserreinigung eine größere Wirkung auf das endokrine Potenzial als bisher vermutet wurde. Da endokrine Wirkungen bereits von einzelnen Inhaltsstoffen im Bereich weniger ng/l ausgelöst werden können, sind auch die üblichen Schwankungen in der Zusammensetzung des eingesetzten Altpapieres nicht zu vernachlässigen. In der Grundaussage, dass die Abwässer im Zulauf zur ARA und im Ablauf der Nachklärung im Werk L eine endokrine Wirkung aufweisen, ändert sich im Verlauf des o. g. Untersuchungszeitraums wenig. Auch die beiden IR-Werte von 1,3 und 1,4 im Ablauf der Nachklärung bedeuten nur eine geringere Wahrscheinlichkeit der endokrinen Wirkung und nicht den Ausschluss endokriner Wirkungen in diesen Proben (siehe Abschnitt 2.3.3.1).

Für die Interpretation der Ergebnisse wesentlich komplexer ist die Tatsache, dass die IR für den Ablauf der Nachklärung in einigen Fällen höher und in anderen Fällen niedriger ausfallen, als die Werte für den Zulauf zur ARA. Das Potenzial der mehrstufigen biologischen ARA, endokrin wirksame Stoffe zu entfernen bzw. keine neuen endokrin wirksamen Stoffe aus den Abwasserinhaltsstoffen zu bilden, ist offensichtlich auch ohne Änderungen in der Produktion nicht gleichbleibend. Die parallel dazu gemessenen CSB- und pH-Werte schwanken nur wenig und geben keine Aufschlüsse über die variierenden Auswirkungen der Prozesse der Abwasserreinigung auf das endokrine Potenzial der Proben.

3.1.1.3 Einfluss der Filtration auf die endokrine Wirkung der Abwasserprobe

Die Frage, inwieweit die Adsorption endokrin wirksamer Stoffe an Feststoffpartikel das endokrine Potenzial der Abwasserprobe beeinflusst, konnte in den bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. Sollten die Feststoffe mit den adsorbierten endokrinen Stoffen effektiv aus der wässrigen Phase entfernt werden können, ergäbe sich mit einer zusätzlichen Filtration eine Möglichkeit, die endokrinen Stoffe aus dem Ablauf des gereinigten Papierfabriksabwassers in die Oberflächengewässer zurückzuhalten.

Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zum Einfluss der Filtration auf das endokrine Potenzial der Abwasserproben durchgeführt worden. Dafür wurden von drei Papierfabriken wieder an den bekannten vier Probenahmestellen (Brauchwasser nach Aufbereitung, Zulauf ARA, Ablauf erste biologische Reinigungsstufe und Ablauf Nachklärung) Proben entnommen und diese in der unfiltrierten Probe sowie nach 0,45 µm-Filtration und nach zusätzlicher 5 kDa-Filtration mittels R-YEA untersucht. Um mögliche Effekte durch das entionisierte Wasser und durch das Leitungswasser im Labor sowie durch aus den Filtern eluierte Stoffe auszuschließen, sind alle diese Proben ebenfalls mit dem R-YEA-Test untersucht worden. Alle diese „Blindproben“ wiesen IR von 1,0 bis 1,2 auf und waren damit endokrin nicht wirksam. Bei der Herstellung der Filtrate wurden trotzdem zusätzlich die ersten 100 ml verworfen, um mögliche Auswascheffekte aus dem Filtermaterial auszuschließen. Die Filtrationen erfolgten durch Druckfiltration mit einem Überdruck von ca. 4 bar. In den **Abb. 7** bis **Abb. 9** sind die Ergebnisse der Filtrationen der Proben aus den Werken K, L und D dargestellt.

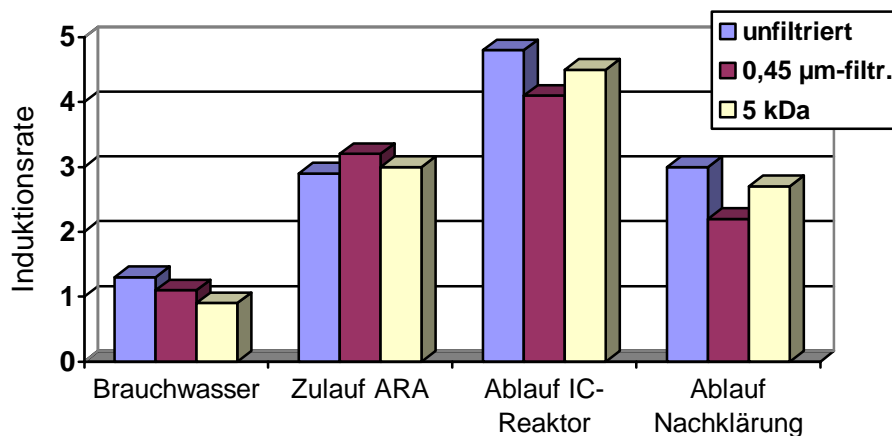


Abb. 7: Ergebnisse des R-YEA-Testes nach erfolgter Probenfiltration – Werk K

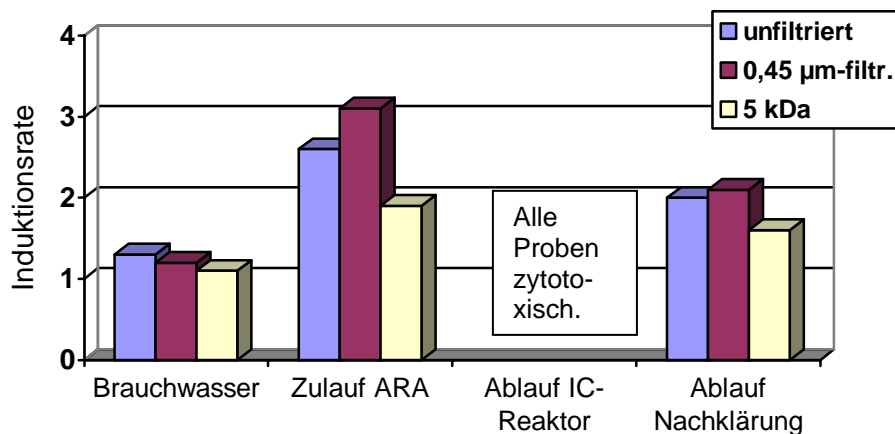


Abb. 8: Ergebnisse des R-YEA-Testes nach erfolgreicher Probenfiltration – Werk L

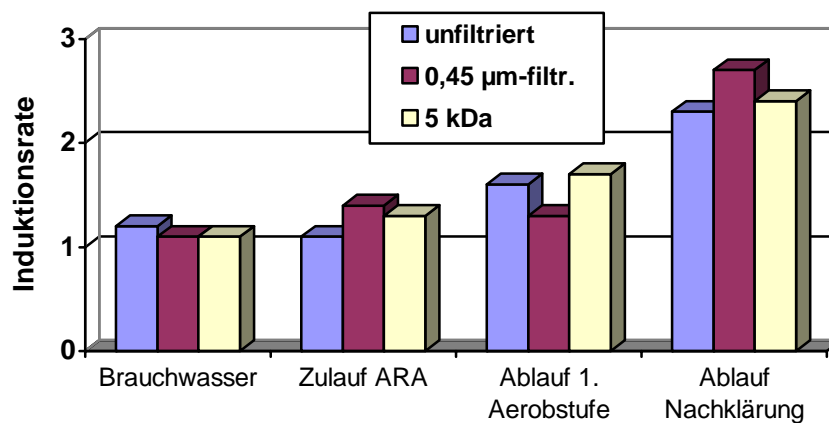


Abb. 9: Ergebnisse des R-YEA-Testes nach erfolgreicher Probenfiltration – Werk D

Die Filtrationen sind mit den gleichen Proben ein zweites Mal durchgeführt worden. Die dabei ermittelten IR-Werte lagen max. um 0,2 oberhalb oder unterhalb der o. a. Werte. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, sind die Unterschiede in den Induktionsraten bei der Filtration der Brauchwässer am geringsten. Alle diese Proben sind mit IR zwischen 0,9 und 1,3 nicht endokrin wirksam. In den Abwasserproben konnte kein einheitlicher Trend in den Auswirkungen der Filtration festgestellt werden. Bei den Zuläufen wird durch die 0,45 µm-Filtration eher eine Erhöhung der endokrinen Wirkung festgestellt, die darauffolgende 5 kDa-Filtration führt dann wieder zu etwas niedrigeren Werten, die aber nicht als signifikante Änderung angesehen werden können. Auch die zytotoxischen Eigenschaften der Ablaufprobe des IC-Reaktors im Werk L (siehe Abb. 8) haben sich durch die Filtration nicht verändert. Betrachtet man die Abläufe der Nachklärung, ergibt sich auch hier durch die Filtration keine signifikante Veränderung der endokrinen Wirkung. Eine Filtration als nachgeschaltete Maßnahme der weitergehenden Abwasserreinigung ist auf der Grundlage dieser Ergebnisse nicht sinnvoll, um endokrin wirksame Substanzen aus den Abläufen zu entfernen. Die 5 kDa-Membran entspricht in der Porengröße in etwa der Ultrafiltration (Ultrafiltrations-Membran: Porengröße 0,01 – 0,1 µm \cong ca. 1 – 500 kDa).

3.1.2 Vergleichende Untersuchungen mittels in vivo- und in vitro-Testverfahren

Für die Durchführung der in vivo-Untersuchungen wurden vier verschiedene Papierfabriken ausgewählt, bei denen im Ablauf der ARA mit dem in vitro-Testverfahren bereits mehrfach eine östrogene Wirkung nachgewiesen worden ist. Nach der Probenahme wurden die Proben getrennt, um das gleiche Probenmaterial sowohl mit dem in vivo-Test (Universität Heidelberg), als auch mit dem R-YEA-Test (INCOS BOTÉ GmbH) und auch auf die Summenparameter CSB, pH und Leitfähigkeit und organische Einzelstoffe mit der GC/MS (IfP-gGmbH) untersuchen zu können. Für diese Untersuchungen wurden von den vier Papierfabriken jeweils vier Proben an unterschiedlichen Stellen entnommen (Brauchwasser nach Aufbereitung, Zulauf ARA, Ablauf erste biologische Reinigungsstufe, Ablauf Nachklärung). In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der jeweiligen in vivo- und in vitro-Untersuchung für jedes Werk separat gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Einzelstoff-Analytik sind dem folgenden Abschnitt 3.1.3 zu entnehmen.

Während der experimentellen Arbeiten wurde festgestellt, dass einige Proben (insbesondere vom Zulauf zur ARA und vom Ablauf der ersten biologischen Reinigungsstufe) toxische bzw. zytotoxische Eigenschaften aufwiesen. Aus diesem Grund wurden die Proben an der Universität Heidelberg zunächst nach DIN EN ISO 15088 [49] auf akute Toxizität untersucht (Range finder) und die Proben danach entsprechend verdünnt. Die Verdünnungen der Proben nach diesem Toxizitätstest sind bei der Ergebnisdarstellung angegeben. Durch die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Abwasserproben ist der Vergleich der vier Proben eines Werkes untereinander und der Vergleich mit den Ergebnissen des in vitro-Tests teilweise problematisch.

Für diese Untersuchungen wurden vier verschiedene Papierfabriken beprobt. Ein Werk davon wurde mit einem zeitlichen Abstand von acht Monaten zweimal untersucht, um Anhaltspunkte für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zweier unterschiedlicher Probenahmen zu bekommen.

Werk E (Herstellung von Tissue aus 100 % AP)

Tab. 24: Probenparameter für in vivo-Untersuchungen Werk E

Probenbezeichnung	Probe-Nr.	CSB in mg/l	pH-Wert	Verdünnung der Probe nach Akut-Tox-Test
Brauchwasser nach Aufbereitung	891/09	< 15	7,11	unverdünnt
Zulauf ARA	892/09	1.623	6,88	1:20
Ablauf IC-Reaktor	893/09	801	7,25	1:20
Ablauf Nachklärung	894/09	172	7,18	unverdünnt

Die VTG-Messungen nach 10tägiger Exposition der Zebraabärblinge mit den Abwasserproben ergab die in **Abb. 10** dargestellten Ergebnisse:

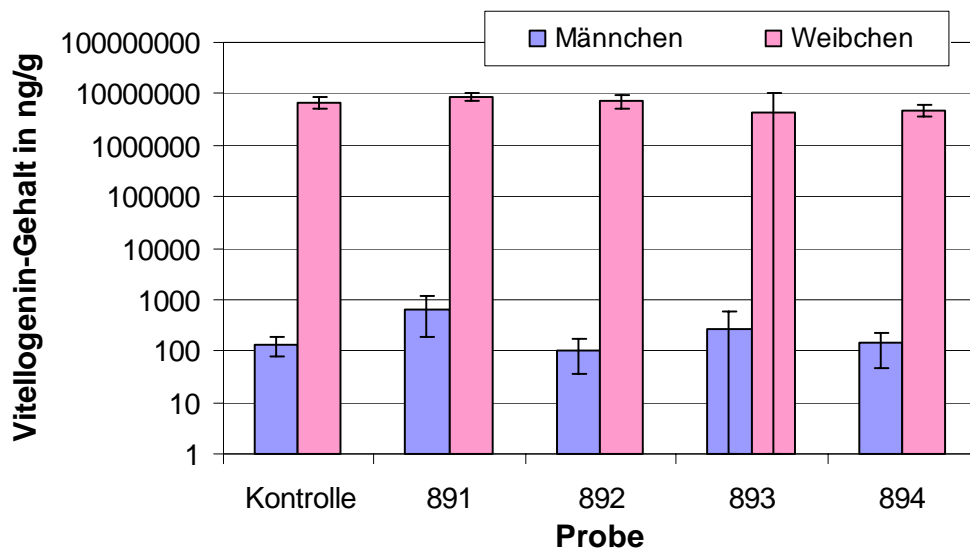


Abb. 10: VTG-Gehalte der Abwasserproben im Werk E

Bewertung:

Keine der Versuchsgruppen zeigt signifikante Veränderungen im VTG-Gehalt im Vergleich zu den Kontrolltieren. Alle untersuchten Proben sind gegenüber den Zebrabärblingen nicht östrogen wirksam.

Zum Vergleich sind hier die Untersuchungsergebnisse des R-YEA-Tests mit den gleichen Abwasserproben angegeben. Um die Ergebnisse bewerten zu können, muss die jeweilige Verdünnung im R-YEA-Test beachtet werden, die bereits aus dem Testansatz vorgegeben ist (siehe Tab. 6 im Abschnitt 2.3.3.1). Eine Verdünnung der in vivo-Abwasserprobe von 1:20 (Das untersuchte Medium im Aquarium besteht also nur zu 5 % aus Abwasser, die restlichen 95 % sind Trinkwasser) entspricht in etwa der Verdünnungsstufe $G_{EH}=24$, in der ca. 4,2 % der Probe im Testansatz vorhanden sind.

Tab. 25: Ergebnisse R-YEA-Untersuchungen Werk E

G_{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz	Ergebnis Induktionsrate IR			
		Brauchwasser	Zulauf ARA*	Ablauf IC-Reaktor**	Ablauf Nachklärg.
1,5	66,67 %	1,17	---	---	1,23
3	33,33 %	1,04	---	---	1,22
6	16,66 %	1,08	---	---	1,01
12	8,33 %	1,05	---	---	1,19
24	4,17 %	0,95	---	---	1,08
48	2,19 %	1,03	---	---	1,13

* Der Zulauf zur ARA war so stark zytotoxisch (Hemmung des Zellwachstums), dass erst bei einer Verdünnung von 1:240 eine Testauswertung möglich war.

** Der Ablauf des IC-Reaktors war so stark zytotoxisch, dass erst bei einer Verdünnung von 1:60 eine Testauswertung möglich war.

Sowohl die in vivo-Untersuchungen als auch die Ergebnisse der R-YEA-Testes zeigen für die unverdünnten Proben „Brauchwasser“ und „Ablauf Nachklärung“ keine östrogene Wirkung. Für den „Zulauf ARA“ und den „Ablauf IC-Reaktor“ wurden von beiden Untersuchungsstellen in den unverdünnten Proben toxische bzw. zytotoxische Wirkungen ermittelt, so dass diese beiden Proben erst im stark verdünnten Zustand zu messbaren Ergebnissen führten. Die Ergebnisse der in vivo-Untersuchungen erlauben die gleichen Schlussfolgerungen wie die der in vitro-Messungen.

Werk K (Herstellung von grafischem Papier aus AP/HS)

Tab. 26: Probenparameter für in vivo-Untersuchungen Werk K

Probenbezeichnung	Probe-Nr.	CSB in mg/l	pH-Wert	Verdünnung der Probe nach Akut-Tox-Test
Brauchwasser nach Aufbereitung	1087/09	12	8,0	unverdünnt
Zulauf ARA	1088/09	1.609	7,0	1:20
Ablauf Hochlast-Aerobie	1089/09	1.110	7,5	1:5
Ablauf Nachklärung	1090/09	384	7,9	unverdünnt

Die VTG-Messungen nach 10tägiger Exposition der Zebrabärblinge mit den Abwasserproben ergab die in **Abb. 11** dargestellten Ergebnisse:

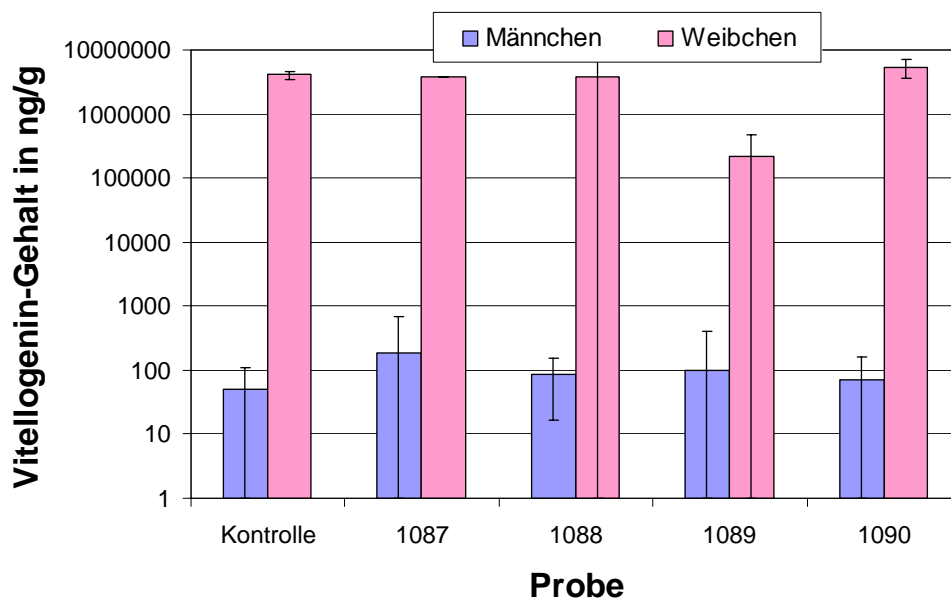


Abb. 11: VTG-Gehalte der Abwasserproben im Werk K

Bewertung:

In keiner der Gruppen wurde eine signifikante Abweichung der VTG-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Auffällig sind die verhältnismäßig niedrigen Werte bei den Weibchen aus der Probe „Ablauf Hochlast-Aerobie“, in der zwei der drei Weibchen ganz

ähnliche Werte auf sehr niedrigem Niveau (53fach niedriger Wert als der Mittelwert der Kontrolle) aufweisen. Hier könnte eine abwasserbedingte Verringerung der VTG-Gehalte vorliegen. Aufgrund der geringen Anzahl der weiblichen Fische sind die Ergebnisse aber nicht belastbar. In dieser Versuchsreihe gab es einen „Männchenüberschuss“, da das Geschlecht der Tiere vor Versuchsbeginn wegen dem geringen Alter der Tiere von ca. 16 Wochen von außen nicht eindeutig bestimmbar war und erst nach Testende „in situ“ festgelegt werden konnte.

Tab. 27: Ergebnisse R-YEA-Untersuchungen Werk K

G _{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz	Ergebnis Induktionsrate IR			
		Brauchwasser	Zulauf ARA*	Abl. Hochlast-Aerobie**	Ablauf Nachklärg.
1,5	66,67 %	0,85	---	---	1,32
3	33,33 %	0,92	---	---	0,80
6	16,66 %	0,84	---	1,15	0,83
12	8,33 %	0,91	---	0,85	0,80
24	4,17 %	1,00	0,89	0,85	0,97
48	2,19 %	1,00	0,83	0,90	0,83

* Der Zulauf zur ARA war so stark zytotoxisch (Hemmung des Zellwachstums), dass erst bei einer Verdünnung von 1:24 eine Testauswertung möglich war.

** Der Ablauf Hochlast-Aerobie erwies sich in den ersten beiden Verdünnungen zytotoxisch, so dass erst ab einer Verdünnung von 1:6 eine Testauswertung möglich war.

Auch bei diesen Untersuchungen ist eine gute Übereinstimmung zwischen den ermittelten toxischen bzw. zytotoxischen Eigenschaften der Proben und den daraus resultierenden Verdünnungen in den beiden Testreihen gegeben. Die Ergebnisse der in vivo- und der in vitro-Untersuchungen ergeben in beiden Fällen keine östrogene Wirkung aller vier untersuchten Proben.

Werk D (Herstellung von Verpackungspapieren aus ZS / HS /DIP)

Tab. 28: Probenparameter für in vivo-Untersuchungen Werk D

Probenbezeichnung	Probe-Nr.	CSB in mg/l	pH-Wert	Verdünnung der Probe nach Akut-Tox-Test
Brauchwasser nach Aufbereitung	204/2009	< 15	7,30	unverdünnt
Zulauf ARA	205/2009	3.092	6,98	1:10
Ablauf Hochlast-Aerobie	206/2009	1.535	6,69	1:20
Ablauf Nachklärung	207/2009	94	7,41	unverdünnt

Die VTG-Messungen nach 10tägiger Exposition der Zebraabärblinge mit den Abwasserproben ergab die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse:

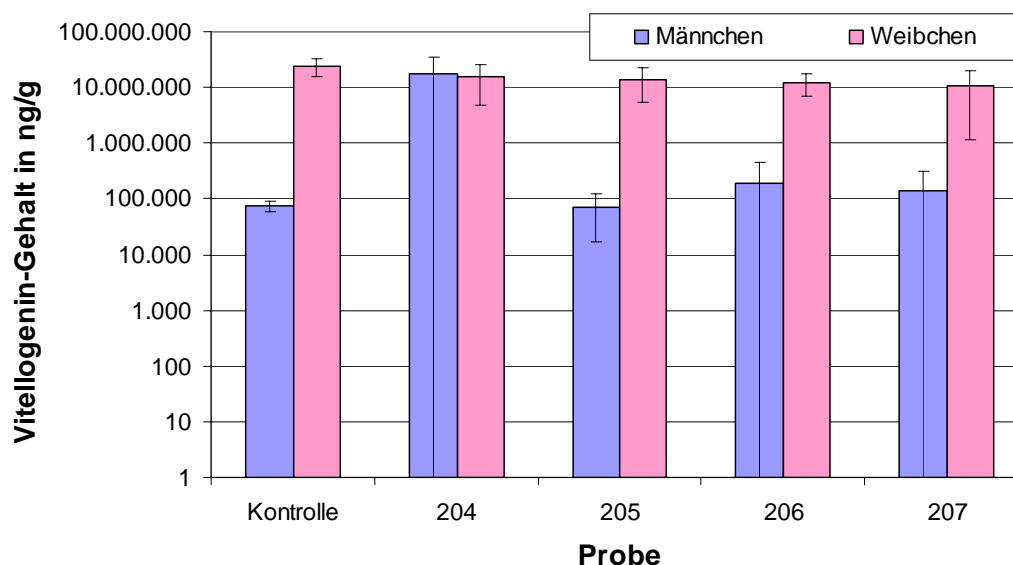


Abb. 12: VTG-Gehalte der Abwasserproben im Werk D

Bewertung:

Bei den weiblichen Fischen gab es keine signifikanten Veränderungen, alle Versuchsgruppen weisen VTG-Gehalte auf, die auf dem gleichen Niveau liegen wie bei den Kontrollweibchen. Dabei ist die Reproduzierbarkeit der VTG-Werte in den einzelnen Gruppen sehr hoch. Bei den männlichen Fischen dagegen gibt es innerhalb der Gruppen starke Schwankungen. So weisen schon 2 der 5 Kontrollmännchen sehr hohe VTG-Gehalte auf, die als Ausreißer verworfen werden müssen. Und auch bei den Proben „Brauchwasser nach Aufbereitung“, „Ablauf Hochlast-Aerobie“ und „Ablauf Nachklärung“ gibt es große Differenzen in den gemessenen VTG-Konzentrationen der männlichen Fische einer Versuchsgruppe. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die ursprünglichen Proben (Totalhomogenate der exponierten Fische) auf dem Transport nach Dänemark verloren gingen und die Rückstellproben vor der VTG-Analyse ein zweites Mal aufgetaut werden mussten. Da Vitellogenin gegenüber wiederholten Auftau- und Einfriervorgängen nicht beständig ist, kann es hier zum Zerfall des Proteins in einigen Proben gekommen sein. Aufgrund der Datenlage zu den erhobenen VTG-Werten bei den männlichen Fischen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und zur Kontrollgruppe.

Tab. 29: Ergebnisse R-YEA-Untersuchungen Werk D

G _{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz	Ergebnis Induktionsrate IR			
		Brauchwasser	Zulauf ARA	Abl. Hochlast-Aerobie	Ablauf Nachklärg.
1,5	66,67 %	1,18	0,63	1,01	0,89
3	33,33 %	1,11	0,51	1,11	1,05
6	16,66 %	1,10	0,64	1,12	1,07
12	8,33 %	1,24	0,60	1,31	1,20
24	4,17 %	1,18	0,75	1,30	1,20

48	2,19 %	1,38	0,72	1,15	1,06
----	--------	------	------	------	------

Die Ergebnisse des R-YEA-Tests zeigen eindeutig, dass alle vier (Ab-)Wasserproben des Werkes D nicht östrogen wirksam sind. Obwohl die Auswertung der VTG-Gehalte als Endpunkt der in vivo-Untersuchungen problematisch war, scheinen auch hier vergleichbare Ergebnisse nach Auswertung der beiden Testverfahren vorzuliegen.

Werk L (Herstellung von Verpackungspapieren aus 100 % AP)

Tab. 30: Probenparameter für in vivo-Untersuchungen Werk L

Probenbezeichnung	1. Probenahme am 13.11.2008		2. Probenahme am 08.06.2009	
	CSB in mg/l	pH-Wert	CSB in mg/l	pH-Wert
Brauchwasser nach Aufbereitung	< 15	7,66	< 15	7,51
Zulauf ARA	5.482	6,23	5.221	6,41
Ablauf IC-Reaktor	937	7,44	1.056	7,37
Ablauf Nachklärung	194	8,11	201	7,82

Aufgrund der Ergebnisse des Akut-Tox-Tests wurden die Proben in folgender Verdünnung für die in vivo-Untersuchung eingesetzt:

Tab. 31: Verdünnung der Proben für in vivo-Untersuchungen Werk L

Probenbezeichnung	1. Probenahme am 13.11.2008	2. Probenahme am 29.06.2009
Brauchwasser nach Aufbereitung	unverdünnt (Probe-Nr. 1097/2008)	unverdünnt (Probe-Nr. 1224/2009)
Zulauf ARA	1:10 (Probe-Nr. 1098/2008)	1:20 (Probe-Nr. 1225/2009)
Ablauf IC-Reaktor	1:10 (Probe-Nr. 1099/2008)	1:10 (Probe-Nr. 1226/2009)
Ablauf Nachklärung	unverdünnt (Probe-Nr. 1100/2008)	unverdünnt (Probe-Nr. 1227/2009)

Die VTG-Messungen nach 10tägiger Exposition der Zebraabfänger mit den Abwasserproben ergab die in den **Abb. 13** und **Abb. 14** dargestellten Ergebnisse:

Probenahme 1:

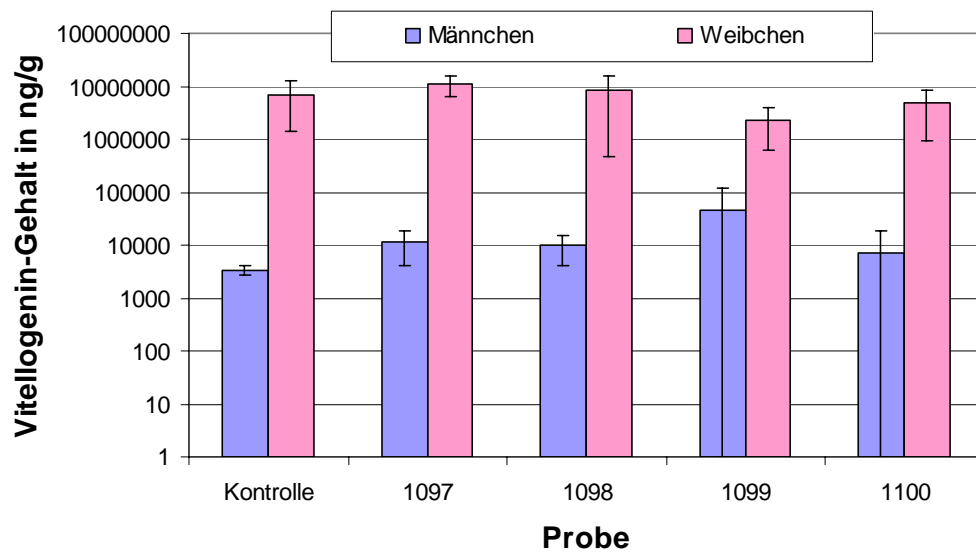


Abb. 13: VTG-Gehalte der Abwasserproben bei 1. Messung im Werk L

Bewertung:

Die Proben „Brauchwasser nach Aufbereitung“ und „Zulauf ARA“ zeigten eine leichte, aber signifikante Erhöhung des VTG-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollmännchen. Bei den Proben „Brauchwasser nach Aufbereitung“ und „Ablauf IC-Reaktor“ ist jeweils eine Probe wegen VTG-Konzentrationen weit oberhalb des Messbereichs als Ausreißer eliminiert worden. Der „Ablauf Nachklärung“ weist gegenüber den Zebraabfärbungen kein endokrines Potenzial auf.

Tab. 32: Ergebnisse R-YEA-Untersuchungen Werk L, 1. Probenahme

G _{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz	Ergebnis Induktionsrate IR			
		Brauchwasser	Zulauf ARA*	Ablauf IC-Reaktor**	Ablauf Nachklärung
1,5	66,67 %	0,73	---	---	14,28
3	33,33 %	1,00	---	---	6,30
6	16,66 %	1,01	---	---	2,88
12	8,33 %	1,03	---	---	1,48
24	4,17 %	0,95	---	---	1,25
48	2,19 %	0,83	---	---	1,20

* Der Zulauf zur ARA war so stark zytotoxisch, dass erst ab einer Verdünnung von 1:120 eine Testauswertung möglich war.

** Der Ablauf des IC-Reaktors war so stark zytotoxisch, dass erst bei einer Verdünnung von 1:60 eine Testauswertung möglich war.

Bei dieser Testserie wurden Differenzen in den Ergebnissen der beiden Tests auf endokrine Wirkung festgestellt. Während der R-YEA-Test eine eindeutig starke östrogene Wirkung des biologisch gereinigten Abwassers der Papierfabrik L ergab, konnte dieses Ergebnis in den in vivo-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Beim Brauchwasser dagegen deutet ein leicht erhöhter VTG-Gehalt der Männchen auf einen erhöhten VTG-Gehalt hin, im R-YEA-Test war diese Probe negativ.

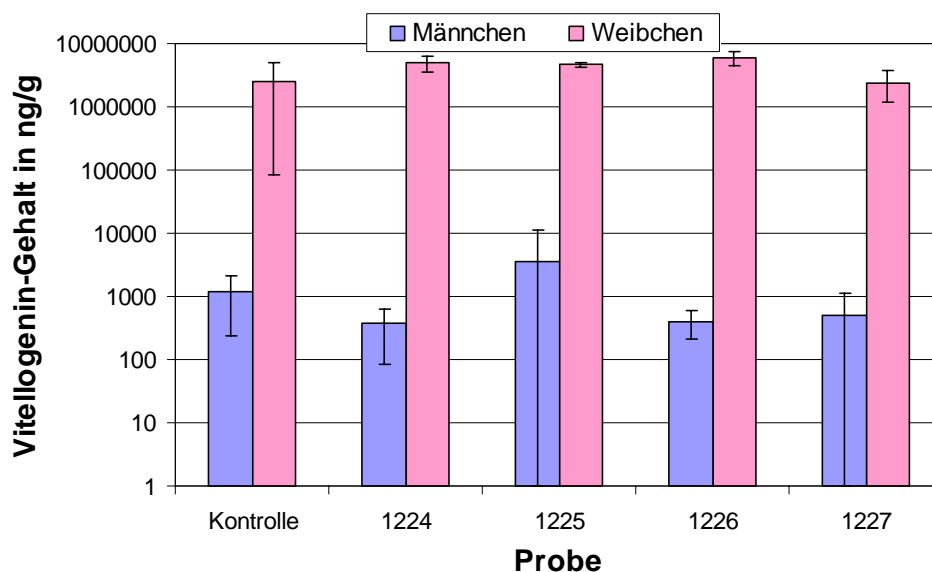
Probenahme 2:

Abb. 14: VTG-Gehalte der Abwasserproben bei 2. Messung im Werk L

Bewertung:

Beide Geschlechter zeigten bereits in der Kontrolle eine erhöhte Variabilität der VTG-Werte, die zwischen dem minimalen und maximalen Wert um den Faktor 200-300 variieren. Die Unterschiede in den VTG-Gehalten der Weibchen sind gegenüber der Kontrolle nicht signifikant. Bei den Männchen variieren die Werte vor allem in den Proben „Zulauf ARA“ und „Ablauf Nachklärung“ sehr stark. Im „Zulauf ARA“ ist gegenüber der Kontrolle der VTG-Gehalt der Männchen im Mittel etwas erhöht. Der höchste Wert übersteigt den der Kontrolle um das Sechsfache. Hier könnte es möglicherweise eine Reaktion auf eine leichte östrogene Belastung während der 10tägigen Exposition ergeben haben. Da es sich hier aber um einen Einzelwert handelt, ist auch für diese Probe kein signifikantes erhöhtes VTG-Niveau zu beobachten. Alle vier Proben weisen damit keine signifikante östrogene Wirkung auf.

Tab. 33: Ergebnisse R-YEA-Untersuchungen Werk L, 2. Probenahme

G _{EH} (Verdünnungsstufe)	Konzentration der Probe im Testansatz	Ergebnis Induktionsrate IR			
		Brauchwasser	Zulauf ARA*	Ablauf IC-Reaktor**	Ablauf Nachklärg.
1,5	66,67 %	0,89	---	---	1,45
3	33,33 %	1,01	---	---	1,19
6	16,66 %	1,00	---	---	0,94
12	8,33 %	1,07	---	---	1,15
24	4,17 %	0,97	---	---	1,23
48	2,19 %	0,90	---	---	1,29

* Der Zulauf zur ARA war so stark zytotoxisch (Hemmung des Zellwachstums), dass erst bei einer Verdünnung von 1:120 eine Testauswertung möglich war.

** Der Ablauf des IC-Reaktors war so stark zytotoxisch, dass erst bei einer Verdünnung von 1:60 eine Testauswertung möglich war.

In der 2. Probenahme im Werk L stimmen die Untersuchungsergebnisse für die beiden unverdünnten Proben „Brauchwasser“ und „Ablauf Nachklärung“ sehr gut überein. Beide Testverfahren kommen zu dem Ergebnis „keine östrogene Wirkung“.

Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo-Untersuchungen

- Bei allen untersuchten Papierfabriken sind das Brauchwasser und das biologisch gereinigte Abwasser (Ablauf Nachklärung) nicht akut toxisch, die Proben konnten für den nachfolgenden Test auf endokrine Wirkung mit den Zebrabärblingen unverdünnt eingesetzt werden. Dagegen wirken sowohl der Zulauf zur ARA, als auch der Ablauf der ersten biologischen Reinigungsstufe (aerob bzw. anaerob) in allen Fällen akut toxisch auf die Zebrafisch-Eier (Test nach DIN EN ISO 15088:2009), so dass die Proben 1:5, 1:10 bzw. 1:20 für die Untersuchung der endokrinen Wirkung verdünnt werden mussten.
- Mit Ausnahme der 1. Probenahme im Werk L sind alle nach den o. g. Verdünnungen untersuchten Proben östrogen nicht wirksam. Die etwas erhöhten VTG-Gehalte im „Brauchwasser“ und im „Zulauf zur ARA“ haben sich bei der 2. Probenahme nicht bestätigt.
- Alle biologisch gereinigten Abwässer („Ablauf Nachklärung“) der Papierfabriken zeigen in den in vivo-Untersuchungen keine endokrine Wirkung.
- Beim Vergleich der in vivo- mit den in vitro-Untersuchungen fällt zunächst auf, dass bei beiden Untersuchungsverfahren nur die Proben „Brauchwasser“ und „Ablauf Nachklärung“ unverdünnt getestet werden konnten, da toxische bzw. zytotoxische Wirkungen in den Proben „Zulauf ARA“ und „Ablauf erste biologische Reinigungsstufe“ eine Verdünnung der Proben vor der Testdurchführung erforderlich machten. In Auswertung dieser Ergebnisse ist es fraglich, ob die Anwendung dieser Testverfahren für nicht biologisch gereinigte Abwässer aus der Papierindustrie in weiterführenden Untersuchungen sinnvoll ist.
- Die Ergebnisse der in vivo-Testreihen zeigen für die unverdünnten Proben eine gute Übereinstimmung mit denen der in vitro-Untersuchungen. Lediglich im Falle der ersten Probenahme im Werk L wurden abweichende Ergebnisse für das Brauchwasser und das biologisch gereinigte Abwasser ermittelt. Da die Endpunkte für die endokrinen Wirkungstests in diesen beiden Testverfahren sehr unterschiedlich sind und auf ganz verschiedenen biologischen und biochemischen Reaktionen beruhen, kann eine Ursache für diese Differenzen nicht angegeben werden.

3.1.3 Untersuchungen zu Inhaltsstoffen in Abwasserproben mit Hilfe von GC/MS

Um die Ursachen für die in einigen Proben aufgetretene endokrine Wirkung im R-YEA-Test zu untersuchen, wurden Einzelstoffanalysen mittels GC/MS durchgeführt. Dabei lag der Schwerpunkt zunächst auf der chemischen Analyse von ausgewählten ARA-Abläufen auf Vertreter der PAK, der Phthalate sowie Pentachlorphenol und Bisphenol A. Alle diese Stoffe sind in der bkh-Liste (siehe Tab. 2) enthalten und können ein endokrines Potenzial aufweisen. Im zweiten Teil dieser Arbeiten sollten weitere, bisher nicht genau identifizierte Abwasserinhaltsstoffe untersucht werden. Dafür wurden Methoden zur Analytanreicherung mittels Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recherchiert, erprobt und weiterentwickelt.

3.1.3.1 Untersuchung von biologisch gereinigten Papierfabriksabwässern auf definierte endokrin wirksame Xenobiotika

Zunächst sollten verschiedene Kläranlagenabläufe (Probenahmestelle jeweils Ablauf der Nachklärung) auf ihre Inhaltsstoffe untersucht werden. Die Auswahl der Proben umfasste Werke aller drei Papiersortenbereiche (Grafische Papiere, Verpackungspapiere, Tissue-Papiere), hergestellt sowohl aus Primär-, als auch aus Sekundärfaserstoffen. Außerdem sollten sowohl Proben untersucht werden, die im R-YEA-Test eine IR von 1,5 und größer aufwiesen (östrogen wirksame Proben), als auch Proben, die im R-YEA-Test keine östrogene Wirkung ergeben haben.

Aufgrund der Kenntnisse zur stofflichen Zusammensetzung von Papieren, verarbeiteten Papieren, die als Altpapiere in den Faserkreislauf zurückkehren, und der chemischen Additive für die Papierherstellung wurde der Gehalt an folgenden, potenziell endokrin wirksamen, Stoffen im gereinigten Abwasser gemessen: 10 Vertreter der Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), Bisphenol A, 7 Vertreter der Phthalate und Pentachlorphenol (PCP). Für die Bestimmung wurden die im Abschnitt 2.3.2.1 genannten standardisierten Bestimmungsmethoden verwendet. **Tab. 34** enthält eine Übersicht über die Ergebnisse der Inhaltsstoff-Analytik in den Abläufen der Nachklärung. Zum Vergleich ist auch das Ergebnis des R-YEA-Testes der jeweiligen Probe angegeben.

Tab. 34: Analysenergebnisse endokrin wirksame Stoffe im Ablauf von Papierfabriken

Parameter	Werk A (100 % ZS)	Werk U (100 % AP)	Werk D (HS/ZS/ DIP)	Werk L (100 % AP)	Werk Y (100 % ZS)	Werk E (100 % AP)
<i>PAK</i>						
• Naphthalin	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
• Fluoren	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Acenaphthylen	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Acenaphthen	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Anthracen	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Phenanthren	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Fluoranthen	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Pyren	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Chrysen	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
• Benzo(a)pyren	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
Bisphenol A	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
<i>Phthalate</i>						
• Dimethylphthalat	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
• Diethylphthalat	< 100	100	< 100	< 100	< 100	< 100
• Diisobutylphthalat	< 100	175	125	110	< 100	207
• Di-n-butylphthalat	< 100	110	< 100	180	< 100	< 100
• Butylbenzylphthalat	< 100	< 100	< 100	< 100	100	< 100
• Di(2-ethylhexyl)phthalat	120	< 100	< 100	326	< 100	241
• Di-n-octylphthalat	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Pentachlorphenol PCP	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
Ergebnisse R-YEA (Induktionsrate IR)	0,8	2,2	2,3	2,0	1,4	1,3

* Alle Angaben in ng/l.

Die Ergebnisse der Einzelstoffanalytik zeigen, dass die untersuchten potenziell endokrin wirksamen Inhaltsstoffe in den biologisch gereinigten Papierfabriksabläufen nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind. Dies bestätigt analoge Untersuchungen aus dem Jahr 2005, in denen prioritäre Stoffe nach Anhang X der EU-WRRL in verschiedenen Papierfabriksabwässern analysiert worden sind [38]. Lediglich im Fall einiger Phthalate (Di-isobutylphthalat, Di-n-butylphthalat und Di(2-ethylhexyl)phthalat) wurden messbare Gehalte ermittelt. Diese sind mit Werten zwischen 100 ng/l und 326 ng/l auf geringerem Niveau als die 2005 gemessenen Spurenstoffkonzentrationen. Eine Korrelation zwischen den Gehalten der untersuchten Inhaltsstoffe und der im R-YEA-Test ermittelten Induktionsrate für die endokrine Wirkung besteht nicht.

3.1.3.2 Methodenentwicklung PDMS-Twister zur Analyse von bisher nicht identifizierten Abwasserinhaltsstoffen

Wie im Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben, ist für die Untersuchung von organischen Spurenstoffen im Abwasser eine Anreicherung der Analyten vor der eigentlichen GC/MS-Analyse notwendig. Im vorliegenden Fall wurde zu diesem Zweck die Anreicherung mit Hilfe der SBSE-Technologie mit TwisternTM der Fa. Gerstel durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung dieses Systems ist im Abschnitt 2.3.2.2 enthalten.

Vor Beginn der Messungen wurde die SBSE-Methode im Hinblick auf folgende Parameter optimiert:

- Wiederfindung möglichst vieler Substanzen mit hoher Abundance,
- hohe Reproduzierbarkeit der Analytanreicherung,
- kurze Anreicherungszeiten.

Folgende Parameter wurden dazu variiert:

- die Abmessungen der PDMS-Twister und damit das Volumen der stationären Phase,
- die Anreicherungszeit,
- das Volumen der Abwasserprobe,
- die Rührgeschwindigkeit.

Abmessungen der PDMS-Twister

Die PDMS-Twister sind in den Abmessungen 10 x 0,5 mm, 20 x 0,5 mm, 10 x 1 mm und 20 x 1 mm erhältlich. Mit den Standard-Thermodesorptionsröhrchen können nur die Twister mit der Schichtdicke 0,5 mm thermodesorbiert werden. Daher wurde im folgenden auch nur mit den Twistern mit den Abmessungen 10 x 0,5 mm und 20 x 0,5 mm gearbeitet. Die o. g. PDMS-Twister unterscheiden sich ausschließlich in den Dimensionen und damit in der Menge an PDMS-Material, das zur Extraktion zur Verfügung steht. Die Art und Zusammensetzung der PDMS-Phase ist bei allen erwähnten PDMS-Twistern identisch. In **Abb. 15** sind die Chromatogramme, die nach der Extraktion einer Abwasserprobe mit den unterschiedlichen Twistern aufgenommen wurden, exemplarisch dargestellt.

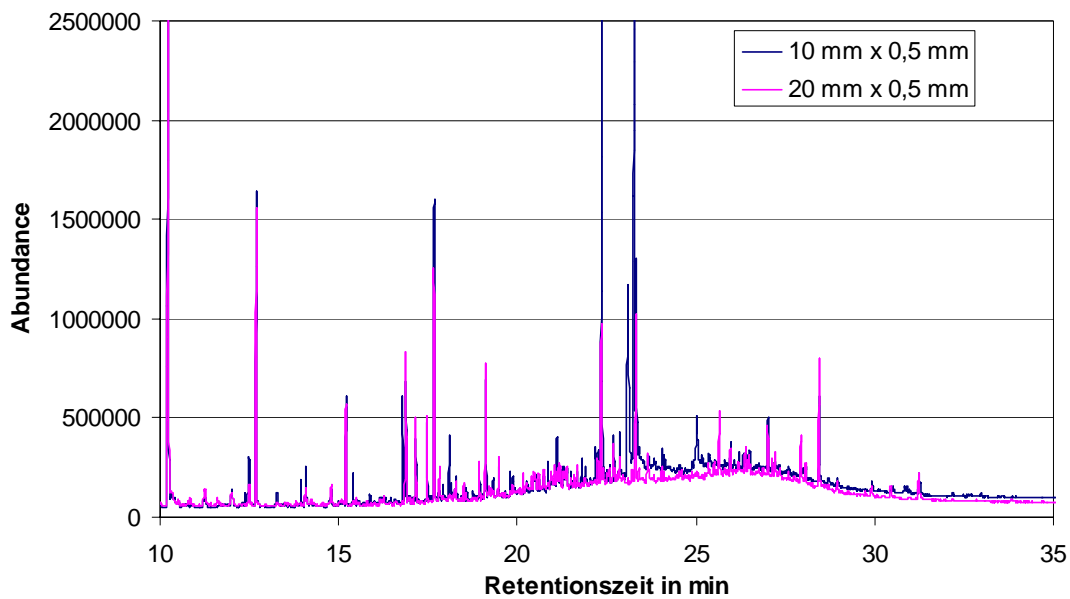


Abb. 15: Chromatogramme nach Anreicherung mit PDMS-Twistern der Größe 10 x 0,5 mm und 20 x 0,5 mm

Die Chromatogramme unterscheiden sich nicht signifikant in den Peakhöhen. Für einige Substanzen wurden mit den kleineren Twistern bessere Wiederfindungsraten ermittelt, für andere mit den längeren Extraktionsröhrchen. Daher wurden in den weiteren Untersuchungen ausschließlich PDMS-Twister der Abmessungen 10 x 0,5 mm eingesetzt.

Extraktionszeit

In der Literatur und den Applikations-Empfehlungen des Herstellers werden Extraktionszeiten zwischen 30 min und 4 h erwähnt [41, 42, 43, 51]. Folgende Extraktionszeiten wurden anhand von zwei verschiedenen Abwasserproben auf die resultierenden Peaks im Chromatogramm untersucht: 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min. Für den Ablauf der Nachklärung von Werk U sind die verschiedenen Chromatogramme in **Abb. 16** dargestellt.

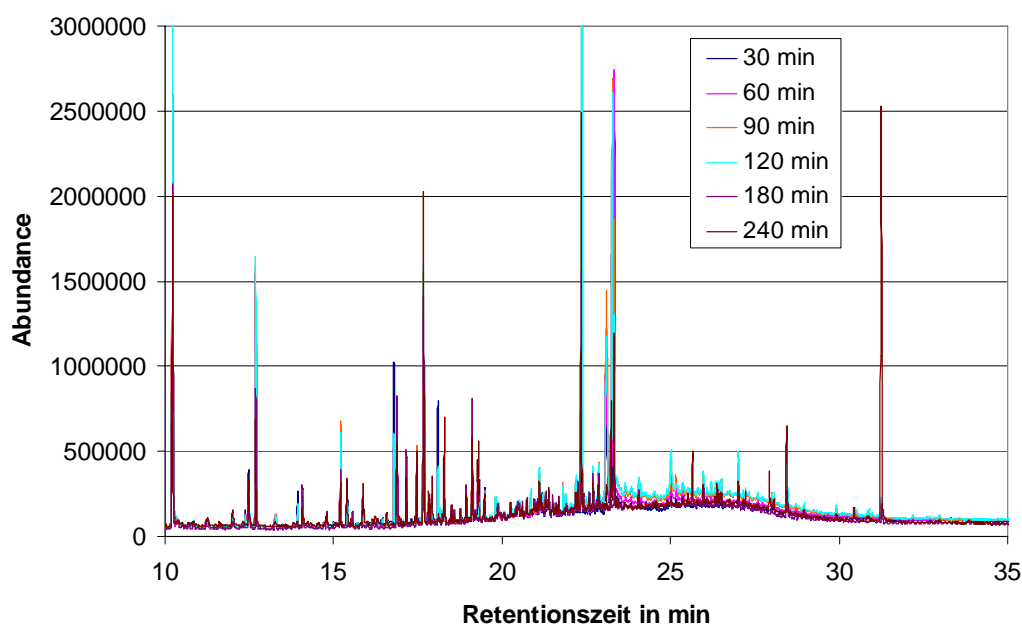


Abb. 16: Ausschnitte aus den Chromatogrammen nach Variation der Extraktionszeit für die Anreicherung der mittel- bis unpolaren Analyten aus dem Ablauf Nachklärung Werk U

Nach Auswertung der Chromatogramme hat sich gezeigt, dass die Extraktionszeit von 120 min (türkisfarbenes Chromatogramm) für viele Substanzen höhere Wiederfindungen der Analyten, erkennbar durch höhere Peaks, bringt. Wie von Kolahgar et al. in [43] beschrieben, hängt die Menge der extrahierten Analyten von der Extraktionszeit ab, allerdings kann sich nach höheren Extraktionszeiten auch der gegenteilige Effekt einer verstärkten Desorption einstellen, z. B. wenn die Konzentration an organischen Stoffen in der Wasserprobe relativ hoch ist und daher Verdrängungsreaktionen in der PDMS-Phase stattfinden. Eine Korrelation im Sinne einer erhöhten Anreicherungsrate bei längeren Extraktionszeiten besteht in der untersuchten Abwasserprobe nicht. Daher wurde in den folgenden Experimenten im Hinblick auf eine effektive Analysendauer eine Extraktionszeit von 120 min gewählt.

Rührgeschwindigkeit

Für die Einstellung der Rührgeschwindigkeit des Magnetrührwerks während der SBSE sind in der Literatur ebenfalls verschiedene Angaben zu finden. Im vorliegenden Fall wurden für zwei Abwasserproben jeweils in Doppelbestimmungen 1.000 U/min, 1.200 U/min und 1.400 U/min untersucht. Dabei gibt es nur geringfügige Unterschiede im Chromatogramm, aber keinen einheitlichen Trend zu höheren Peaks oder mehr identifizierbaren Stoffen in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Untersuchungen mit einer Rührgeschwindigkeit von 1.000 U/min. durchgeführt.

Volumen der Abwasserprobe

Entsprechend den Applikationsberichten des Herstellers und den Publikationen zum Einsatz der SBSE zur Anreicherung von Analyten aus Abwasserproben in [41, 42, 43, 44] wurden Probenvolumina von 10 ml und 20 ml getestet. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede, so dass im folgenden mit 10 ml Abwasserprobe gearbeitet wurde.

Auf der Grundlage der o. g. Ergebnisse wurden alle folgenden Untersuchungen unter folgenden Extraktionsbedingungen durchgeführt:

- Abmessungen des PDMS-Twisters: 10 x 0,5 mm
- Extraktionszeit: 2 h
- Rührgeschwindigkeit: 1.000 U/min
- Volumen der Abwasserprobe: 10 ml

Für die Identifizierung der im Chromatogramm detektierten Stoffe der Abwasserprobe muss zunächst eine Blindwertbestimmung erfolgen. Es ist bekannt, dass aus den konditionierten PDMS-Twistern bei der Thermodesorption Stoffe freigesetzt werden, die im Chromatogramm als Peaks neben den zu untersuchenden Stoffen der Abwasserprobe erscheinen. Dies ist für die Messungen dann wenig kritisch, wenn die Freisetzung dieser Stoffe reproduzierbar ist. Aufgrund der Peakerkennung mittels Massenspektrometer lassen sich diese Peaks relativ schnell und unkompliziert im Chromatogramm erkennen. Auch eine Überlagerung dieser Matrix-Peaks mit denen der Substanzen aus der Abwasserprobe stört nicht, da über die Auswertung einzelner Target-Ionen die Peaks gut zuzuordnen sind. In **Abb. 17** sind die Chromatogramme der Thermodesorption von zwei PDMS-Twistern ohne vorherige Extraktion einer Abwasserprobe dargestellt.

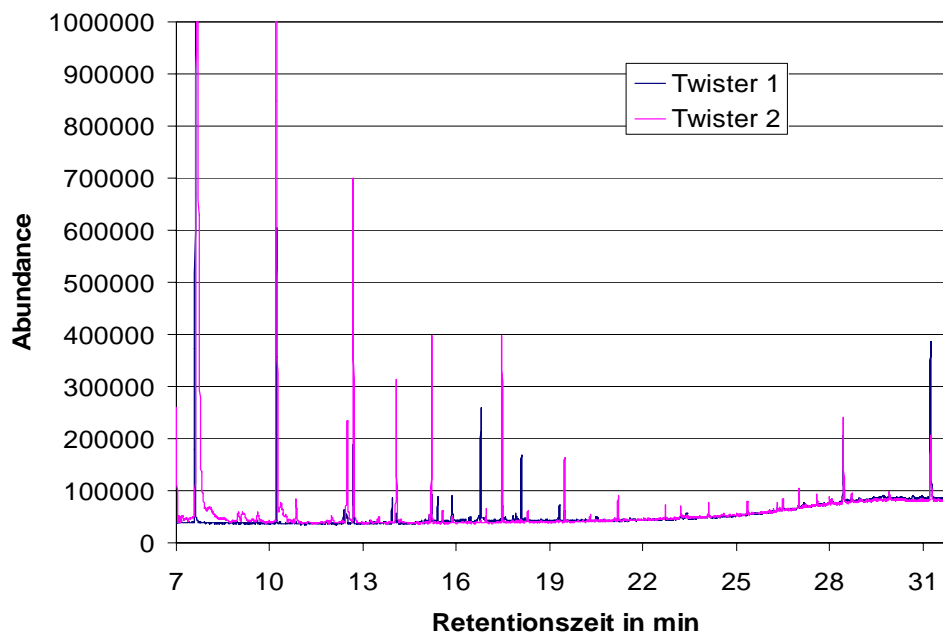


Abb. 17: Blindwertbestimmungen bei Thermodesorption von PDMS-Twistern

Den Peaks konnten mit Hilfe der NIST-Spektrenbibliothek die in der **Tab. 35** genannten Verbindungen zugeordnet werden.

Tab. 35: Freigesetzte Substanzen bei Thermodesorption der PDMS-Twister

Retentionszeit in min	Stoff	Retentionszeit in min	Stoff
7,69	Hexamethylcyclotrisiloxan	16,81	Tetradecan
10,23	Octamethyltetrasiloxan	17,45	Substituiertes Trisiloxan
12,49	Nonanal	18,07	Eicosan
12,68	Decamethylcyclopentasiloxan	19,48	Substituiertes Trisiloxan
14,07	Decanal	28,46	n-Butylphthalat
15,22	Pentaethylcyclopentasiloxan	31,25	Squalen
15,84	Phthalsäureanhydrid	31,28	Substituiertes Silan

In allen folgenden Chromatogrammen, die nach Thermodesorption von PDMS-Twistern aufgenommen wurden, müssen diese Substanzen als „Blindwerte“ unberücksichtigt bleiben, da diese Substanzen nicht eindeutig der Abwasserprobe zuzuordnen sind.

Die Reproduzierbarkeit der gesamten Messmethodik (SBSE mit anschließender Thermodesorption und GC/MS-Analytik) wurde anhand von 8 verschiedenen Abwasserproben untersucht, die jeweils als Doppelbestimmungen auf ihre Inhaltsstoffe analysiert wurden. In den **Abb. 18** und **Abb. 19** sind exemplarisch für einen Kläranlagenzulauf und einen Kläranlagenablauf die Chromatogramme der beiden Messungen übereinander gelegt.

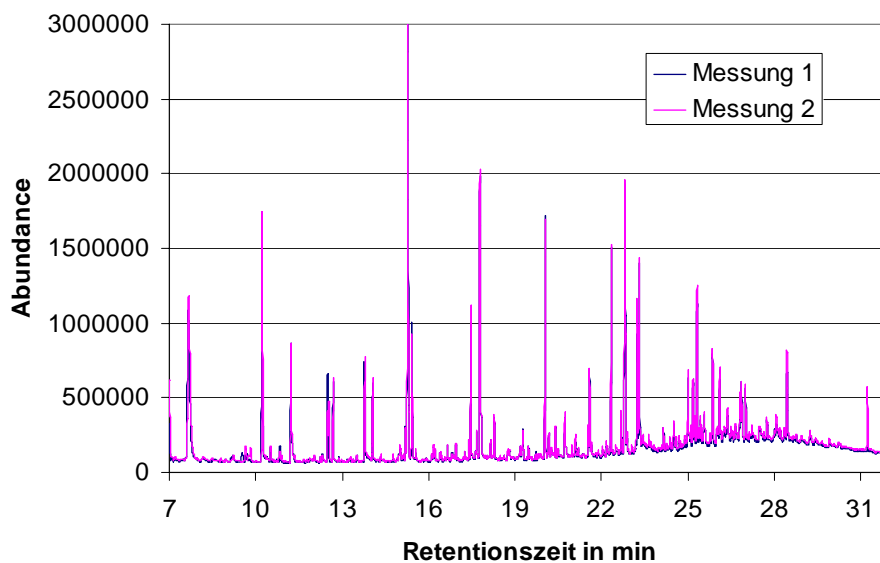


Abb. 18: Chromatogramm einer Abwasserprobe (Zulauf ARA Werk A) nach Doppelbestimmung

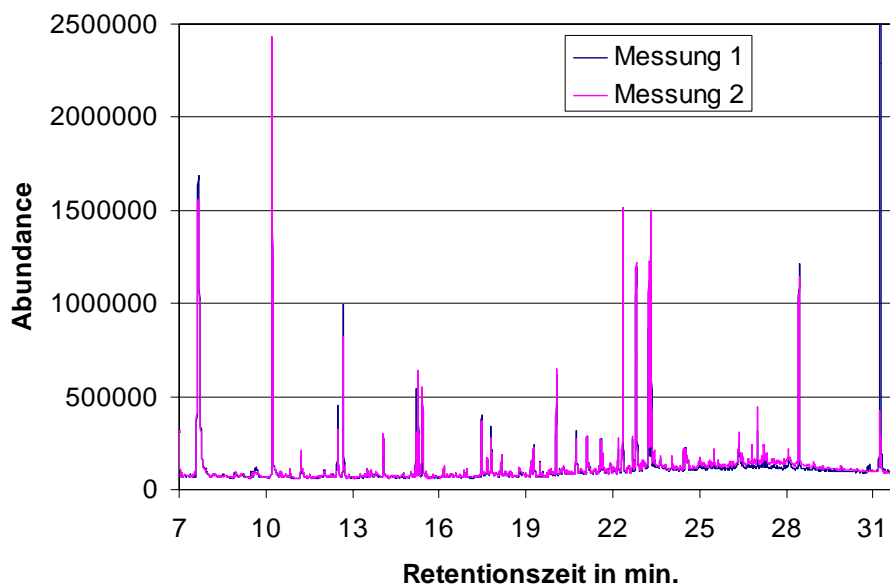


Abb. 19: Chromatogramm einer Abwasserprobe (Ablauf Nachklärung Werk A) nach Doppelbestimmung

Die Übereinstimmung der beiden Chromatogramme ist sowohl bei der qualitativen Auswertung (Retentionszeit der Peaks, Identifizierung der Stoffe mittels Massenspektrum) als auch bei der quantitativen Auswertung (Peakfläche und –höhe) sehr gut. Eine Verschleppung von organischen Substanzen, die aus der Abwasserprobe extrahiert, aber möglicherweise bei der Thermodesorption nicht vollständig wieder desorbiert wurden, konnte nicht nachgewiesen werden. In einigen Ausnahmefällen gab es Differenzen in der Peakhöhe und –fläche einzelner Peaks gegenüber dem anderen Chromatogramm, dies betraf aber in erster Linie Stoffe, die aus der stationären Phase ausbluten (Siloxane, Cyclosiloxane) und keine Analyten aus der Abwasserprobe darstellen.

3.1.3.3 Untersuchung von Abwasserproben der Papierindustrie nach SBSE mit PDMS-Twistern und anschließender Thermodesorption-GC/MS

Nachdem in Abschnitt 3.1.3.1 einige wenige definierte potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe in Abwasserproben der Papierfabriken untersucht worden sind, liegt der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf der Identifizierung bisher nicht bekannter Stoffe mit der im Abschnitt 3.1.3.2 entwickelten Analysenmethode der SBSE mit anschließender Thermodesorption-GC/MS. Dabei soll zunächst ausschließlich eine qualitative Auswertung der Chromatogramme erfolgen (Peakerkennung und Zuordnung von Stoffen mit Hilfe der NIST-Spektrenbibliothek). Eine Kalibrierung mit den möglicherweise identifizierten Einzelstoffen ist zwar möglich, aber sehr aufwändig.

Untersuchung von gereinigten Abwässern aus Papierfabriken verschiedener Sortenbereiche

In den folgenden Untersuchungen werden zunächst die Abläufe der Nachklärung von Papierfabriken, die ähnliche Papiersorten herstellen, verglichen. Die Chromatogramme einer Papiersorte werden in einem Diagramm gemeinsam dargestellt und ausgewertet. **Abb. 20** enthält die Totalionen-Chromatogramme der untersuchten ARA-Abläufe von drei Papierfabriken, die Grafische Papiere herstellen. Es wurden drei Werke mit verschiedenen Faser-

rohstoffen ausgewählt, um mögliche Unterschiede in den Chromatogramme erkennen zu können. **Abb. 21** zeigt eine Ausschnittvergrößerung aus dem Retentionsbereich 7 bis 33 min. und einer maximalen Abundance von 1.000.000, aus der die relevanten Peaks noch deutlicher hervorgehen.

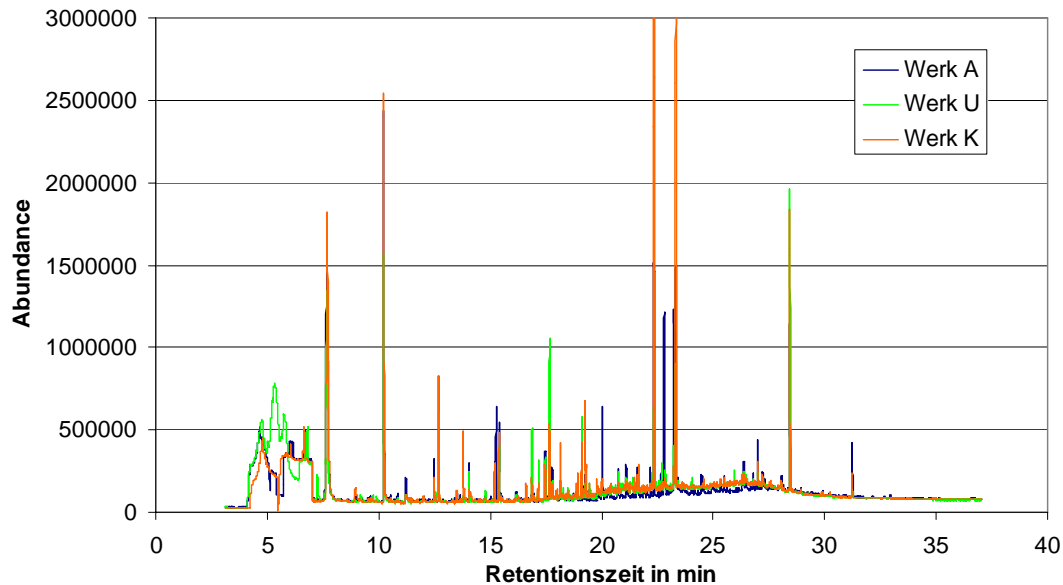


Abb. 20: Totalionenchromatogramme der ARA-Abläufe der drei Werke, die Grafische Papiere herstellen

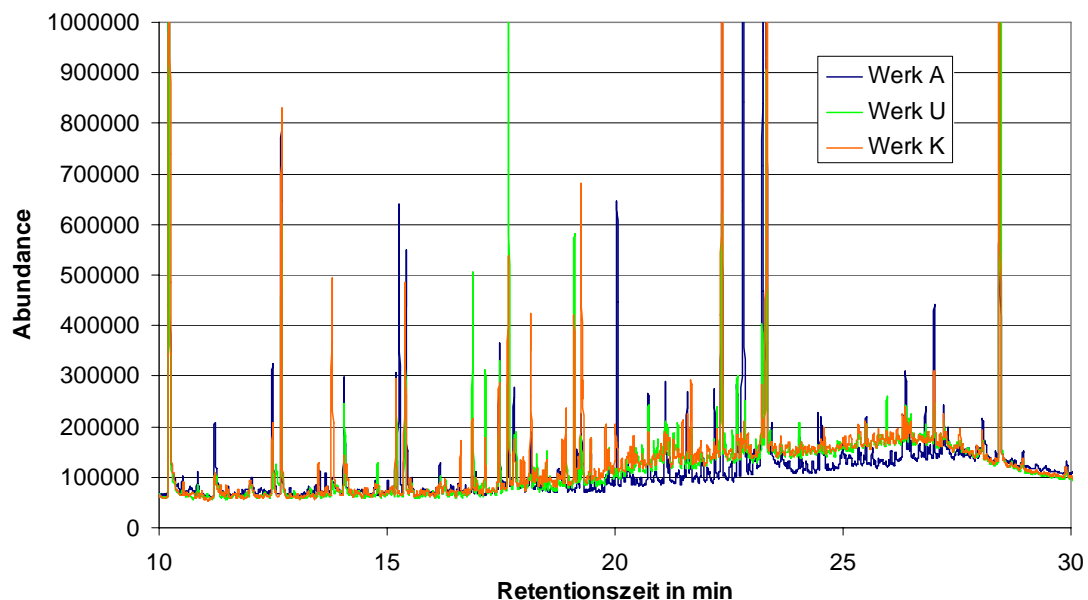


Abb. 21: Ausschnittvergrößerung aus Abb. 20

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen.

- Das Chromatogramm von Werk A (100 % ZS) unterscheidet sich von dem der anderen beiden Werke (Werk U – 100 % AP; Werk K - HS/AP) insbesondere durch viele Substanzen geringer Konzentration, die im Bereich von 18 min bis 28 min Retenti-

onszeit im Chromatogramm aufgenommen werden. Diese Verbindungen sind größtenteils alkylierte Alkohole, Ketone, Aldehyde, aber auch höhere Alkane und Cycloalkane, Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Heterocyclen mit einer Molmasse von 150-250 g/mol. Im Vergleich zu den anderen beiden Werken enthält das gereinigte Abwasser von Werk A deutlich mehr Propionsäureester-Derivate (z. B. bei 15,26 min, 20,04 min und 22,82 min). Auch die Gehalte an längerkettigen Carbonsäuren (n-Tetradecansäure, größter Peak: n-Hexadecansäure) sind im Werk A etwas höher.

- Die Chromatogramme der Abläufe der Werke U und K enthalten neben Spuren einiger Additive und Phthalate, die größtenteils aus dem PDMS-Twister stammen, ebenfalls längerkettige Carbonsäuren, wie Tetra- und Hexadecansäuren. Der Anteil an cyclischen Verbindungen, wie Cyclohexadien-dion-Derivate und substituierte Cyclohexandione ist vor allem im Werk U höher. Hier sind auch einige substituierte Phenole detektiert worden, denen aber keine exakten Stoffnamen zugeordnet werden können. Im Ablauf des Werkes K, in dem auch Holzstoffe verarbeitet werden, können zusätzlich einige Naturstoffe, wie die monocyclischen Monoterpen-Alkohole Menthol und Neoisomenthol detektiert werden.
- In den Chromatogrammen ergaben sich keine Hinweise auf östrogen wirksame Stoffe, die eine höhere Induktionsrate im R-YEA-Test verursachen können. Allerdings konnten nicht alle Peaks eindeutig identifiziert werden.

Die ARA-Abläufe der drei untersuchten Papierfabriken, die Tissue-Papiere produzieren, sind in **Abb. 22** dargestellt. Auch hier ist eine Papierfabrik (Werk Y) beprobt worden, die ausschließlich Zellstoff einsetzt, und zwei Werke, die zu 100 % Altpapier verwenden (Werke X und E).

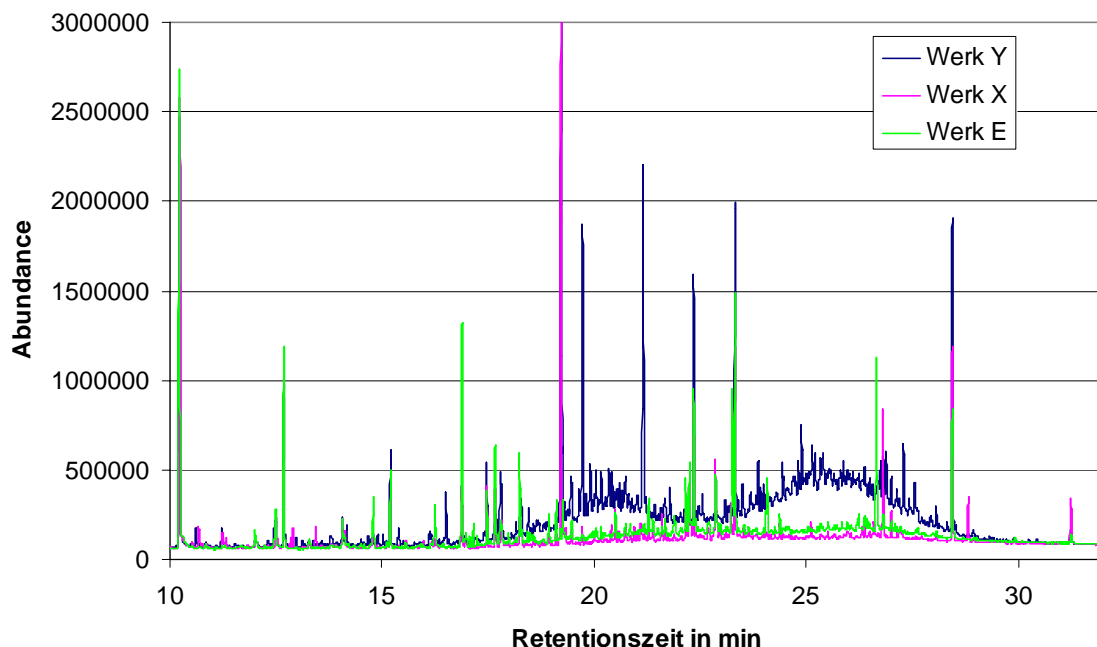


Abb. 22: Ausschnitt der Totalionen chromatogramme der ARA-Abläufe der drei Werke, die Tissue-Papiere herstellen

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Wie schon bei den Werken, die grafische Papiere herstellen, unterscheidet sich das Chromatogramm des Zellstoff verarbeitenden Werkes (dunkelblaue Linie) deutlich von den Chromatogrammen der anderen beiden Fabriken. Auch hier eluieren zwischen 18 und 28 min zahlreiche organische Stoffe im Molmassenbereich 150 – 250 g/mol. Darunter sind sowohl natürlich vorkommende Stoffe, wie die bicyclischen Monoterpene α -Pinen und 3-Caren sowie Vitamin A-Aldehyd und das Sesquiterpen allo-Aromadendren einschließlich des allo-Aromadendrenoxids, als auch verschiedene Lactonderivate, Amide und Cycloalkane. Einige der Verbindungen konnten nicht eindeutig identifiziert werden.
- Die Chromatogramme der anderen beiden Werke sind bis auf einige wenige unterschiedliche Peaks gut vergleichbar. Neben den Spuren einiger Phthalate sind auch alkylierte Benzole, Diisopropylnaphthalin (DIPN) gefunden worden, ebenso N-Butylbenzonsulfonamid, ein (auch natürlich vorkommender) Weichmacher und einige wenige Spuren von chemischen Additiven der Papierherstellung und -verarbeitung.
- Östrogen wirkende Stoffe bzw. solche, von denen diese Wirkung bekannt ist oder vermutet wird, sind in keinem der Chromatogramme detektiert worden.

Für die Papiersorte der Verpackungspapiere sind zwei ARA-Abläufe (Werke mit Code-Nr. L und W) untersucht worden. In beiden Papierfabriken werden 100 % Altpapier zur Papierherstellung verwendet. Der relevante Ausschnitt aus dem Chromatogramm der GC/MS-Untersuchung nach Anreicherung mit den PDMS-Twistern ist **Abb. 23** zu entnehmen.

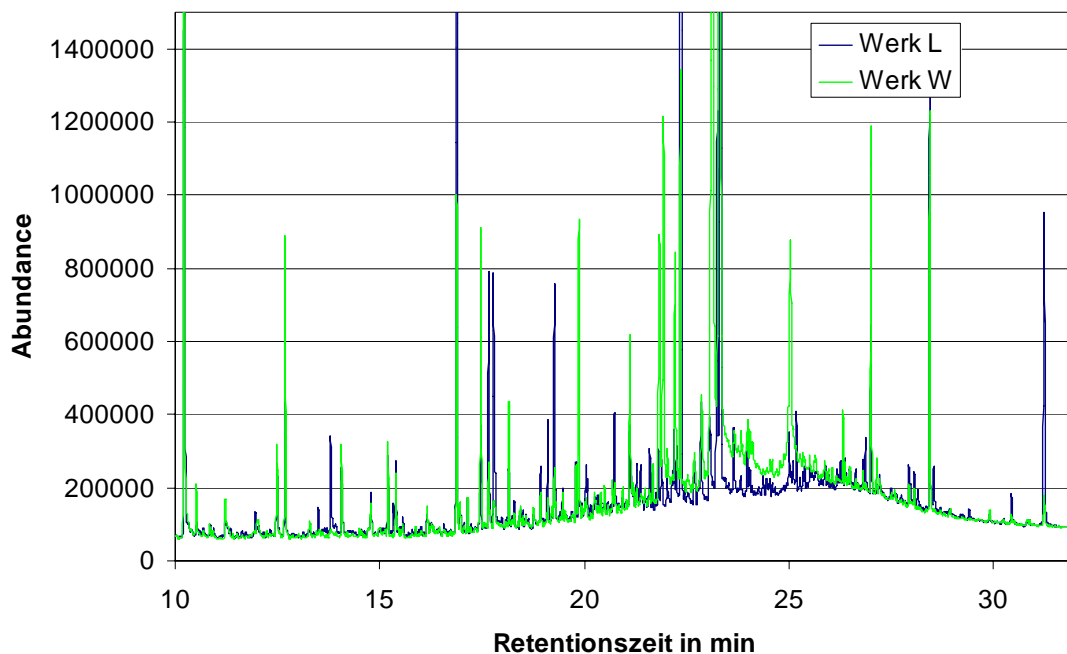


Abb. 23: Ausschnitt der Totalionenchromatogramme der ARA-Abläufe der zwei Werke, die Verpackungspapiere herstellen

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Zusätzlich zu den Peaks, die aus der Elution von chemischen Stoffen aus den PDMS-Twistern resultieren, sind vor allem langkettige organische Säuren, wie Tetra-, Penta- und Hexadecansäure, im Werk W auch Ölsäure, identifiziert worden, darüber hinaus einige wenige Phthalate, die aber nicht eindeutig den Abwasserproben zugeordnet werden konnten. Auch organisch substituierte Phosphate, Alkane, Cycloalkane und Alkoholderivate wurden identifiziert. Einige substituierte Phenole konnten nicht eindeutig einer definierten Verbindung zugeordnet werden.
- Keiner der eindeutig identifizierten Stoffe im biologisch gereinigten Abwasser der Papierfabriken ist östrogen wirksam.

Untersuchung von verschiedenen Abwasserproben einzelner Papierfabriken

Nach dem Vergleich der verschiedenen Abläufe des gereinigten Abwassers unterschiedlicher Papierfabriken soll im folgenden die Zusammensetzung der vier (Ab-)Wasserproben untersucht werden, die an den vier unterschiedlichen Probenahmestellen in einem Werk entnommen wurden.

Zu diesem Zweck wurden die Proben der Probenahmestellen

- Brauchwasser (nach Aufbereitung),
- Zulauf ARA,
- Ablauf erste biologische Reinigungsstufe und
- Ablauf Nachklärung.

entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise mittels der PDMS-Twister extrahiert, die beladenen Twister thermodesorbiert und mit Hilfe der GC/MS analysiert. Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Analysen anhand ausgewählter Papierfabriken diskutiert.

A) Werk K – Herstellung von grafischen Papieren, ARA aerob/aerob

In **Abb. 24** sind die Chromatogramme der vier Proben der Untersuchung mittels GC/MS nach SBSE gegenübergestellt. Im R-YEA-Test zeigten die Proben „Zulauf ARA“, „Ablauf Hochlast-Aerobie“ und „Ablauf Nachklärung“ mit IR von 2,9, 4,8 und 3,0 ein deutliches endokrines Potenzial.

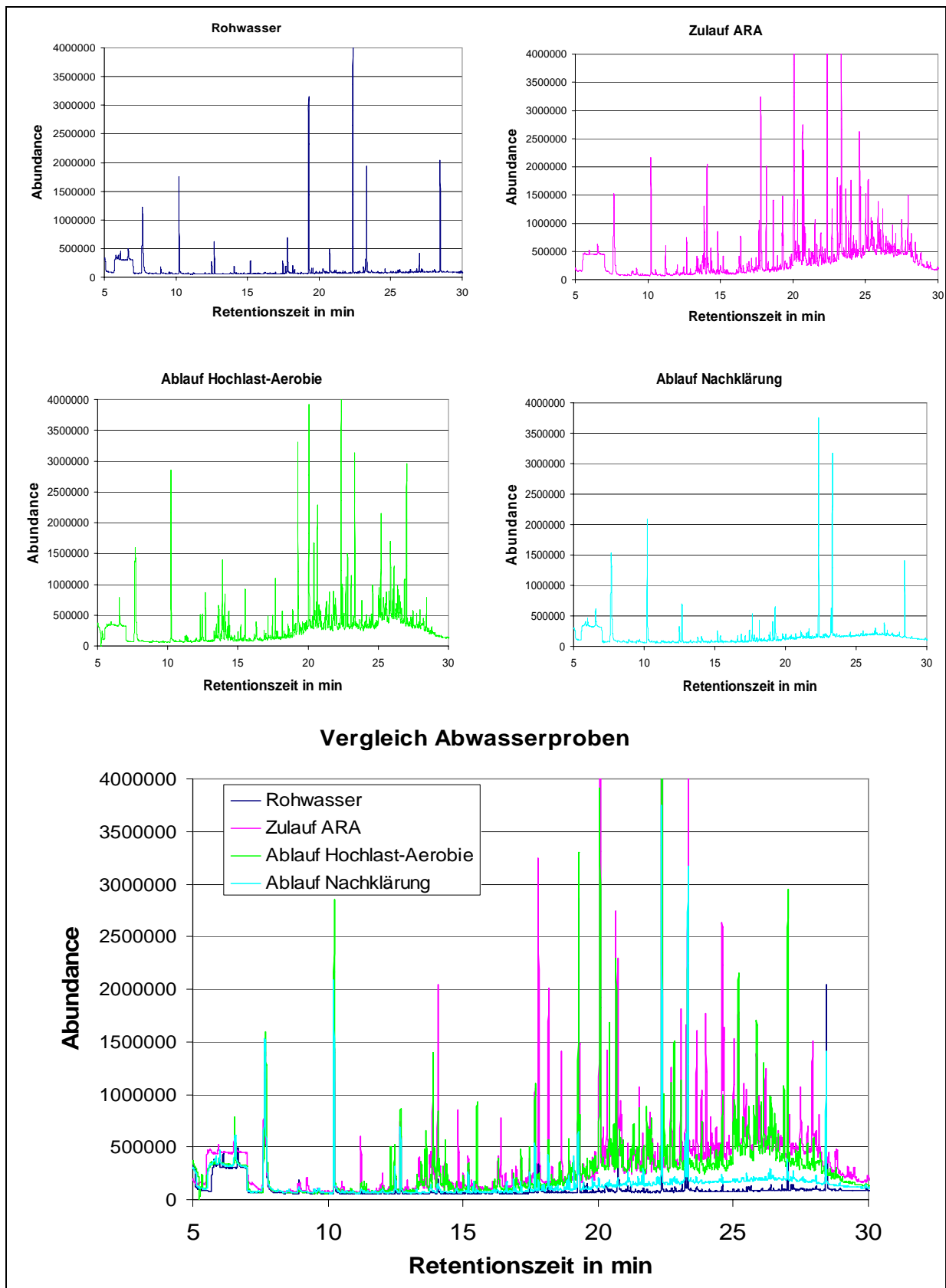


Abb. 24: Ausschnitt der Totalionen chromatogramme der vier (Ab-)Wasserproben von Werk K

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Das Brauchwasser enthält keine Substanzen, die nicht auch in der Blindprobe enthalten sind. Die höchsten Peaks sind einigen Phthalaten zuzuordnen.
- Im Zulauf zur ARA sind vor allem aliphatische und cycloaliphatische Alkohole (z. B. n-Hexanol, Cyclohexenolderivate), Ketone (z. B. Diallylcyclohexanon), Carbonsäuren (z. B. Tetradecansäure, Hexadecansäure), Ester (vor allem substituierte Propionsäureester) und Alkane / Cycloalkane (z. B. Tridecan) zu identifizieren. Außerdem sind Peaks einiger Phthalate und Benzoate erkennbar, die aber größtenteils ebenfalls in den PDMS-Twistern enthalten sind. In Spuren sind auch Fotoinitiatoren, wie das Benzophenon, zu identifizieren, darüber hinaus o-Hydroxybiphenyl, aber auch Naturstoffe wie Menthenol, verschiedene Terpene und Sesquiterpene (z. B. Cadinol) sowie das biologisch sehr aktive Eugenol (zytotoxisch). Auch Derivate des stark östrogen wirkenden Sclareols (Diterpenol – Phytohormon) wurden identifiziert, insbesondere das Sclareol-oxid ergab bei der Retentionszeit von 23,06 min. einen deutlichen Peak.
- Im Ablauf der Hochlast-Aerobie (hellgrünes Chromatogramm) ist ein Teil der im Zulauf zur ARA identifizierten Stoffe nur noch zu einem geringeren Anteil vorhanden oder gar nicht mehr nachweisbar. Einige wenige Peaks sind erstmals im Ablauf der ersten Aerobstufe vorhanden, oder aber höher als im Zulauf. Dies betrifft vor allem einige Ketone (z. B. Heptanonderivate, Bicycloheptanonderivate) und organische Säuren. Auch das bicyclische Monoterpen Caren ist im Ablauf der ersten aeroben Reinigungsstufe identifizierbar. Einige substituierte Hydroxyphenole konnten nicht eindeutig identifiziert werden.
- Im Ablauf der Nachklärung sind zusätzlich zu den genannten Phthalaten N-Benzylbenzolsulfonamid, ebenfalls ein Weichmacher, und Benzophenon in Spuren detektiert worden.
- Eine eindeutige Erklärung der hohen östrogenen Wirkung der drei Abwasserproben im R-YEA-Test konnte durch die Einzelstoff-Identifizierung nicht gegeben werden.

B) Werk E – Herstellung Tissue-Papiere, ARA anaerob/aerob

In **Abb. 25** sind die Chromatogramme der vier Proben der Untersuchung mittels GC/MS nach SBSE dargestellt. Im R-YEA-Test waren sowohl das Rohwasser als auch der Ablauf der Nachklärung endokrin nicht wirksam. Der Zulauf zur ARA und der Ablauf des IC-Reaktors erwiesen sich als stark zytotoxisch.

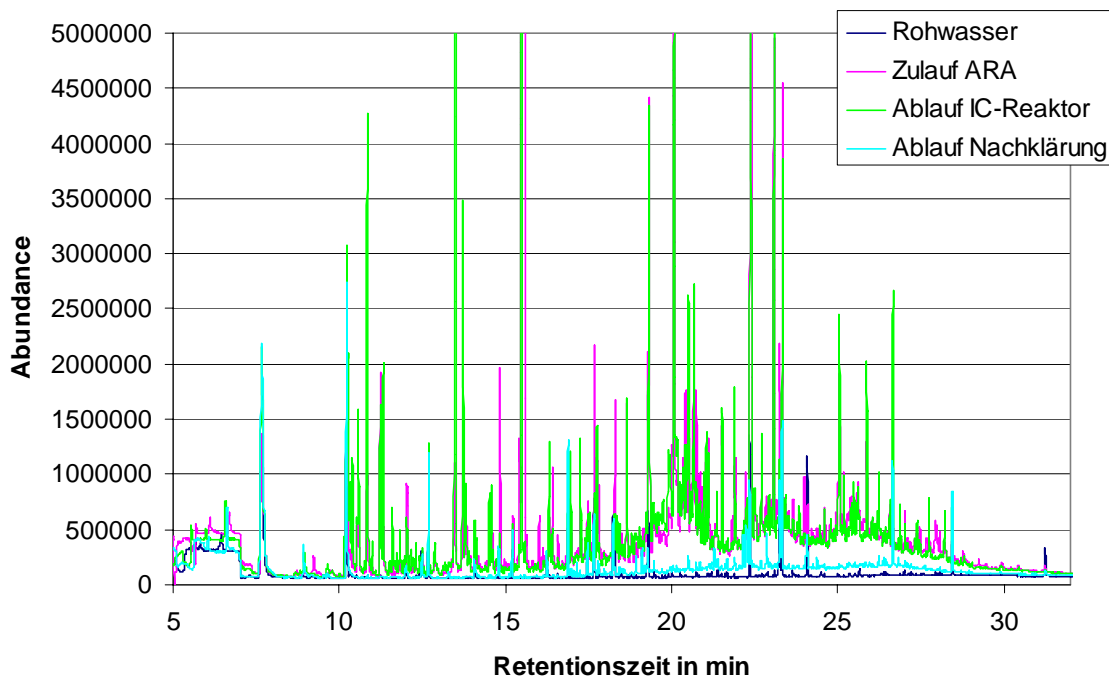


Abb. 25: Ausschnitt der Totalionen chromatogramme der vier (Ab-)Wasserproben von Werk E

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Im Brauchwasser sind nur die Stoffe zu finden, die als Blindwerte (Ausbluten aus dem PDMS-Twister bzw. diffuse Quellen im Labor) anzusehen sind. Dazu gehören verschiedene Siloxanverbindungen und Phthalate (Di-n-butylphthalat, Diisobutylphthalat, Benzylbutylphthalat), aber auch Nonanal und Decanal.
- Im Zulauf zur ARA sind vor allem aliphatische und cycloaliphatische Alkohole (z. B. n-Hexanol, 2-Ethyl-1-hexanol, Cyclohexanolderivate, Tetradecanol), Carbonsäuren (z. B. Hexadecansäure), Ester (vor allem substituierte Propionsäureester) und Alkane / Cycloalkane zu identifizieren. Außerdem sind Peaks einiger Phthalate und Benzoate erkennbar, die aber größtenteils ebenfalls in den PDMS-Twistern enthalten sind. In Spuren sind auch Fotoinitiatoren, wie das Benzophenon, zu identifizieren, darüber hinaus o-Hydroxybiphenyl, Acetophenon, aber auch Naturstoffe wie Menthol und verschiedene Terpene. Für einige substituierte Phenole konnte keine eindeutige Struktur ermittelt werden. Die verschiedenen Isomere des Diisopropyl-naphthalins (DIPN) konnte eindeutig zugeordnet werden. Auch Derivate des stark östrogen wirkenden Sclareols wurden identifiziert, insbesondere das Sclareoloxid ergab bei der Retentionszeit von 23,08 min. ein deutliches Signal. Darüber hinaus wurde Isoborneol, ein einwertiger sekundärer Alkohol aus der Stoffklasse der bicyclischen Monoterpene, sowie der dazugehörige Essigsäureester Isobornylacetat, ebenfalls ein natürlich vorkommender Stoff, nachgewiesen.
- Im Ablauf des IC-Reaktors sind neben den Peaks einiger Phthalate im Bereich zwischen 10,25 min. und 11,82 min. einige Alkylbenzole erkennbar. In Spuren sind Benzophenon, o-Hydroxybiphenyl, Acetophenon, aber auch Naturstoffe wie Menthol und verschiedene Terpene zu identifizieren. Auch Derivate des stark östrogen wirkenden

den Sclareols wurden identifiziert, insbesondere Sclareoloxid. Auch Isoborneol und Isobornylacetat wurden detektiert.

- Der Ablauf der Nachklärung enthält außer den Stoffen aus der Blindprobe einige substituierte Phenole, die nicht näher identifiziert werden konnten.
- Die Chromatogramme der Brauchwasserprobe und des Ablaufs der Nachklärung zeigen zusätzlich zu den Peaks der Blindprobe keine Signale, die auf östrogen wirksame Stoffe hindeuten. Insofern ist das Ergebnis des R-YEA-Testes gut nachvollziehbar. Woher die hohe zytotoxische Wirkung der anderen beiden Proben resultiert, kann mit den detektierten Stoffen nicht erklärt werden.

C) Werk L – Herstellung von Verpackungspapieren, ARA anaerob/aerob

In **Abb. 26** sind die Chromatogramme der vier Proben der Untersuchung mittels GC/MS nach SBSE dargestellt. Die Proben wiesen folgende IR im R-YEA-Test auf: Brauchwasser 1,3; Zulauf ARA 2,6; Ablauf IC-Reaktor zytotoxisch; Ablauf Nachklärung 2,0.

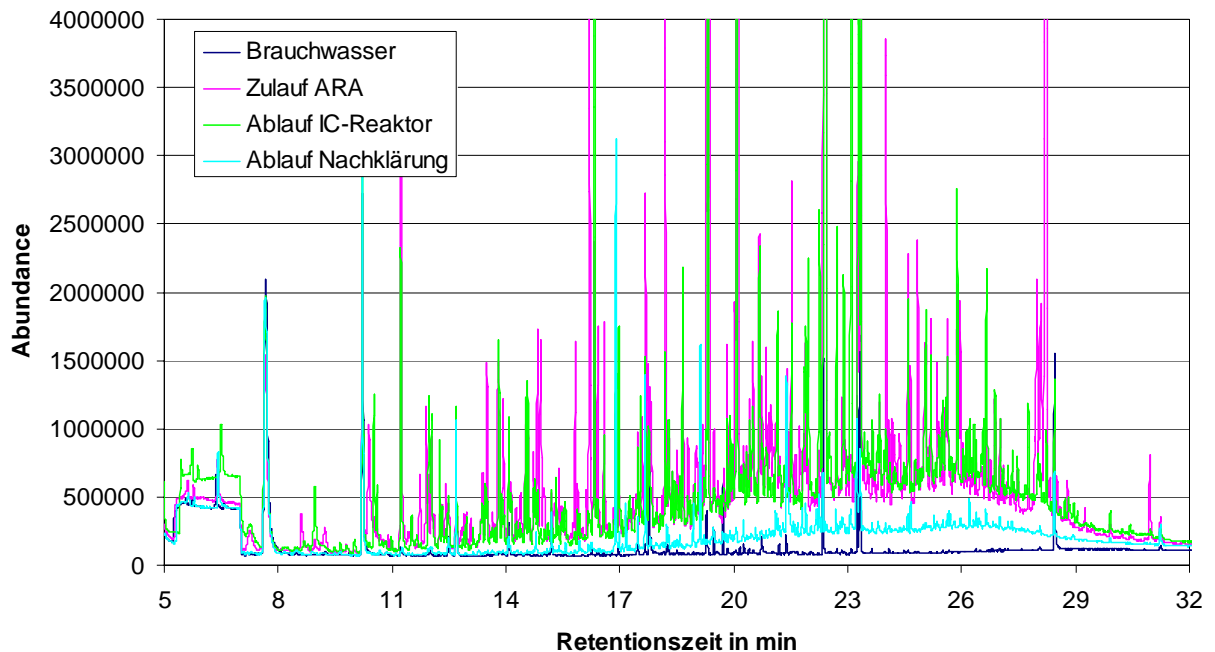


Abb. 26: Ausschnitt der Totalionen chromatogramme der vier (Ab-)Wasserproben von Werk L

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Das Brauchwasser enthält nur geringe Mengen Spurenstoffe (Diethyl- und Dibutylphthalat), die anderen Peaks sind Stoffen zuzuordnen, die aus dem PDMS-Twister eluiert sind.
- Im Zulauf zur ARA sind vor allem aliphatische und cycloaliphatische Alkohole (z. B. n-Hexanol, 2-Ethyl-1-hexanol, Cyclohexanolderivate, substituierte Propanole), Ketone (z. B. 2-Heptanon), Carbonsäuren (z. B. Tetradekansäure, Hexadecansäure), Ester (vor allem substituierte Propionsäureester) und Alkane/Cycloalkane zu identifizieren. Au-

ßerdem sind Peaks einiger Phthalate und Benzoate erkennbar, die aber größtenteils ebenfalls in den PDMS-Twistern enthalten sind. In Spuren sind auch Fotoinitiatoren wie das Benzophenon erkennbar, darüber hinaus o-Hydroxybiphenyl, Acetophenon, aber auch Naturstoffe wie Menthol und verschiedene Terpene. Für einige substituierte Phenole konnte keine eindeutige Struktur ermittelt werden.

- Im Ablauf des IC-Reaktors (hellgrünes Chromatogramm) ist ein Teil der im Zulauf zur ARA identifizierten Stoffe nur noch zu einem geringeren Anteil vorhanden oder gar nicht mehr nachweisbar. Einige wenige Peaks sind erstmals im Ablauf des IC-Reaktors vorhanden, oder aber höher als im Zulauf. Dies betrifft vor allem einige Ketone (z. B. Heptanon, Octanon) und organische Säuren, wie Tetradecan- und Pentadecansäure.
- Im biologisch gereinigten Abwasser (Ablauf Nachklärung) sind nur noch wenige Spurenstoffe enthalten. Neben einigen Vertretern der Phthalate sind dies Spuren von TMDD, einem nichtionischen Tensid, das als Schaumhemmer und Netzmittel eingesetzt wird, nach heutiger Datenlage aber keine endokrine Wirkung zeigt.
- Östrogen wirksame Stoffe wurden in keiner der Proben ermittelt.

3.1.3.4 Methodenentwicklung Acrylat-Twister

Auch bei der Methodenentwicklung für die Untersuchung mit den Acrylat-Twistern wurde zunächst der Blindwert untersucht, der sich bei der Thermodesorption von leeren Twistern unter den vorgegebenen Desorptionsbedingungen ergibt. In **Abb. 27** sind die Chromatogramme bei der Thermodesorption von zwei verschiedenen Twistern dargestellt.

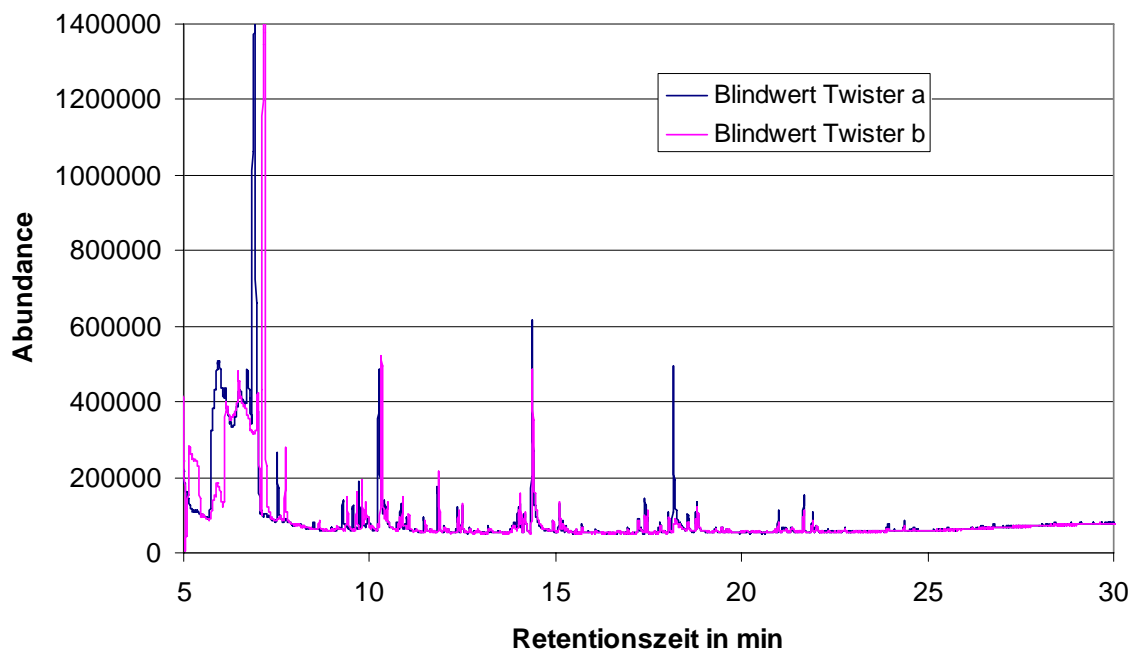


Abb. 27: Totalionenchromatogramme von zwei Acrylat-Twistern nach Thermodesorption

Den Peaks konnten mit Hilfe der NIST-Spektrenbibliothek die in der **Tab. 36** genannten Verbindungen zugeordnet werden.

Tab. 36: Freigesetzte Substanzen bei Thermodesorption der Acrylat-Twister

Retentionszeit in min	Stoff	Retentionszeit in min	Stoff
6,87	1,2-Ethandiol	12,49	Nonanal
7,73	1,2-Ethandiolmonoformiat	14,06	Decanal
9,29	1,4-Dioxalan-2-ol	14,16	Methoxy-ethoxy-ethanolderiv.
9,56	Butyrolacton	14,38	Triethylenglycol
9,80	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol	17,22	Benzoessäureester
10,25	(2, 2'-oxybis)ethanol	18,04	Pentaoxahexadecan-16-ol
11,82	Tetrahydro-2H-Pyran-2-on	18,16	Pentaethylenglycol

3.1.3.5 Untersuchung von Abwasserproben der Papierindustrie nach SBSE mit Acrylat-Twistern und anschließender Thermodesorption-GC/MS

Für die folgenden Untersuchungen zur SBSE mittels Acrylat-Twister ist das gleiche Probenmaterial, wiederum aus den Werken K, E und L (jeweils vier Probenahmestellen), analysiert worden. Aufgrund der unterschiedlich zusammengesetzten stationären Phase der PDMS-Twister im Vergleich zu den Acrylat-Twistern werden in den folgenden Analysen Signale zusätzlicher Verbindungen erwartet, die zwar einen geringen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten aufweisen, dafür aber durch Wasserstoffbrückenbindungen gut an der polaren Acrylat-Phase angereichert werden können. Aufgrund der sehr unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und Konzentrationen der Inhaltsstoffe in den Abwasserproben kann es aber auch zu übereinstimmenden Peaks von Stoffen kommen, die sowohl mit den PDMS-, als auch mit den Acrylat-Twistern hohe Anreicherungsfaktoren aufweisen.

A) Werk K – Herstellung von grafischen Papieren, ARA aerob/aerob

In **Abb. 28** sind die Chromatogramme der Proben aus dem Werk K dargestellt.

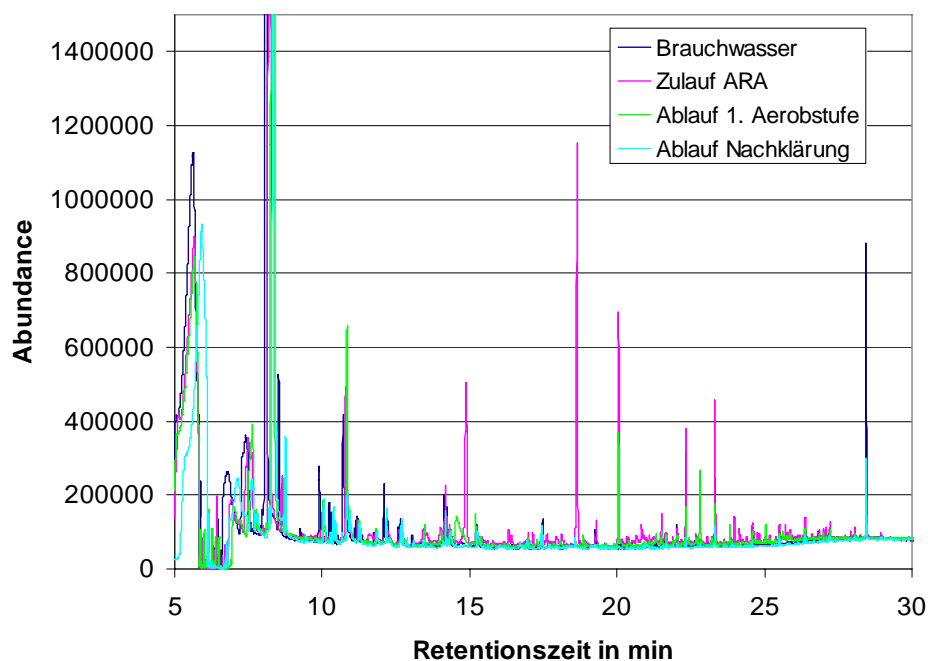


Abb. 28: Chromatogramme der vier verschiedenen (Ab-)Wasserproben im Werk K

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Das Brauchwasser enthält Spuren einiger Substanzen, die nicht in der Blindprobe enthalten sind. Die höchsten Peaks sind einigen Phthalaten zuzuordnen (Di(2-ethylhexyl)phthalat, Diisobutylphthalat, Di-n-butylphthalat). Außerdem sind Spuren von Acetophenon und Naphthalin detektiert worden.
- Zusätzlich zu diesen Peaks enthält das Chromatogramm des Zulaufs zur ARA Peaks, die den Substanzen 3-Propylphenol, o-Hydroxybiphenyl, Benzophenon und Hexadecan zuzuordnen sind.
- Im Ablauf der Hochlast-Aerobie (hellgrünes Chromatogramm) ist ein Teil der im Zulauf zur ARA identifizierten Stoffe nur noch zu einem geringeren Anteil vorhanden oder gar nicht mehr nachweisbar. Der Naturstoff Vanillin sowie Benzoesäure konnten zusätzlich detektiert werden.
- Im Ablauf der Nachklärung konnten nur noch einige Vertreter der Blindprobe nachgewiesen werden.

B) Werk E – Herstellung Tissue-Papiere, ARA anaerob/aerob

Die Chromatogramme von Werk E sind **Abb. 29** zu entnehmen.

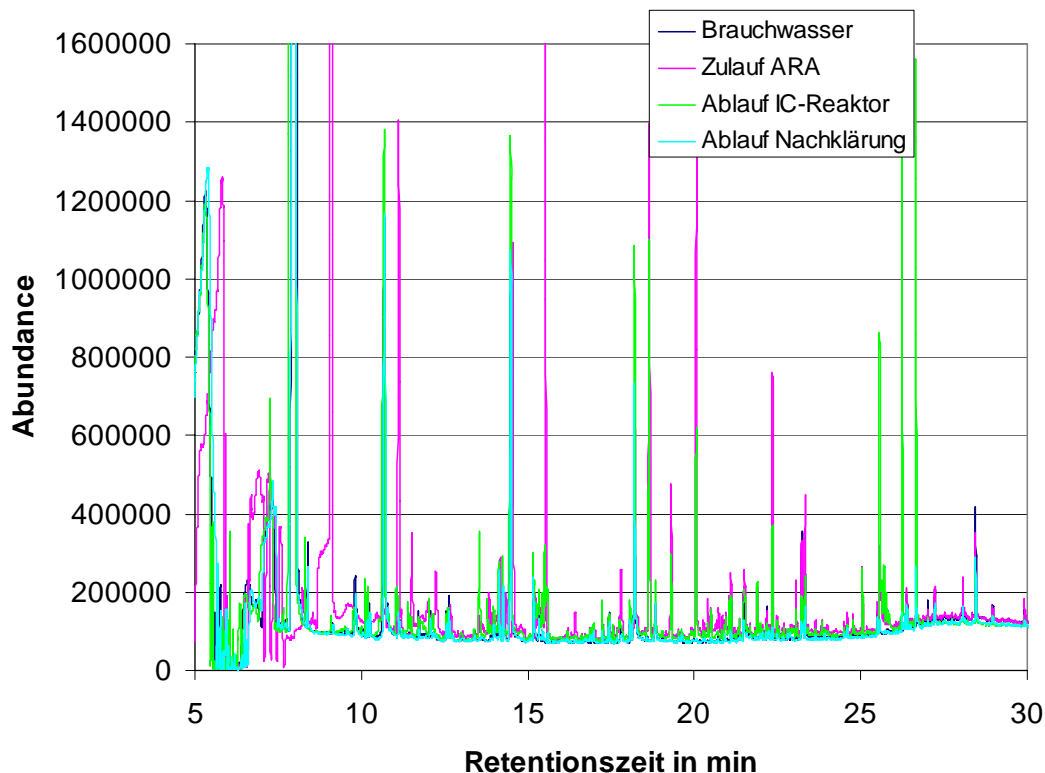


Abb. 29: Chromatogramme der vier verschiedenen (Ab-)Wasserproben im Werk E

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen für die Inhaltsstoffe der Abwasserproben im Werk E ableiten:

- Das Brauchwasser enthält nur Peaks, die auch in der Blindprobe enthalten waren.

- Im Zulauf zur ARA sind zusätzlich einige wenige aliphatische Alkohole (z. B. 2-Ethyl-1-hexanol) und Carbonsäuren (z. B. Essigsäure) zu identifizieren. In Spuren sind auch Fotoinitiatoren, wie das Benzophenon, zu identifizieren, darüber hinaus o-Hydroxybiphenyl, Acetophenon, Diethylphthalat, Bisphenol A, aber auch Naturstoffe wie verschiedene Terpene. Für einige substituierte Phenole konnte keine eindeutige Struktur ermittelt werden. Auch Derivate des stark östrogen wirkenden Sclareols wurden identifiziert, insbesondere das Sclareoloxid. Darüber hinaus wurden Isoborneol, ein einwertiger sekundärer Alkohol aus der Stoffklasse der bicyclischen Monoterpene, sowie der dazugehörige Essigsäureester Isobornylacetat, ebenfalls ein natürlich vorkommender Stoff, nachgewiesen.
- Im Ablauf des IC-Reaktors sind einige zusätzliche Stoffe detektierbar. Dazu gehören z. B. der natürlich vorkommende Campher sowie einige substituierte Phenole. Die o. g. Industriechemikalien sind im Ablauf des IC-Reaktors in deutlich geringeren Konzentrationen enthalten.
- Der Ablauf der Nachklärung enthält, vergleichbar mit dem eingesetzten Brauchwasser, nur noch Peaks von Substanzen, die auch in der Blindprobe enthalten waren. Weder die aromatischen Ketone, noch o-Hydroxybiphenyl, Bisphenol A und die Phthalate sind erkennbar.

C) Werk L – Herstellung von Verpackungspapieren, ARA anaerob/aerob

Abb. 30 zeigt die Chromatogramme der Abwasserproben nach SBSE-Anreicherung mit den Acrylat-Twistern in Werk L.

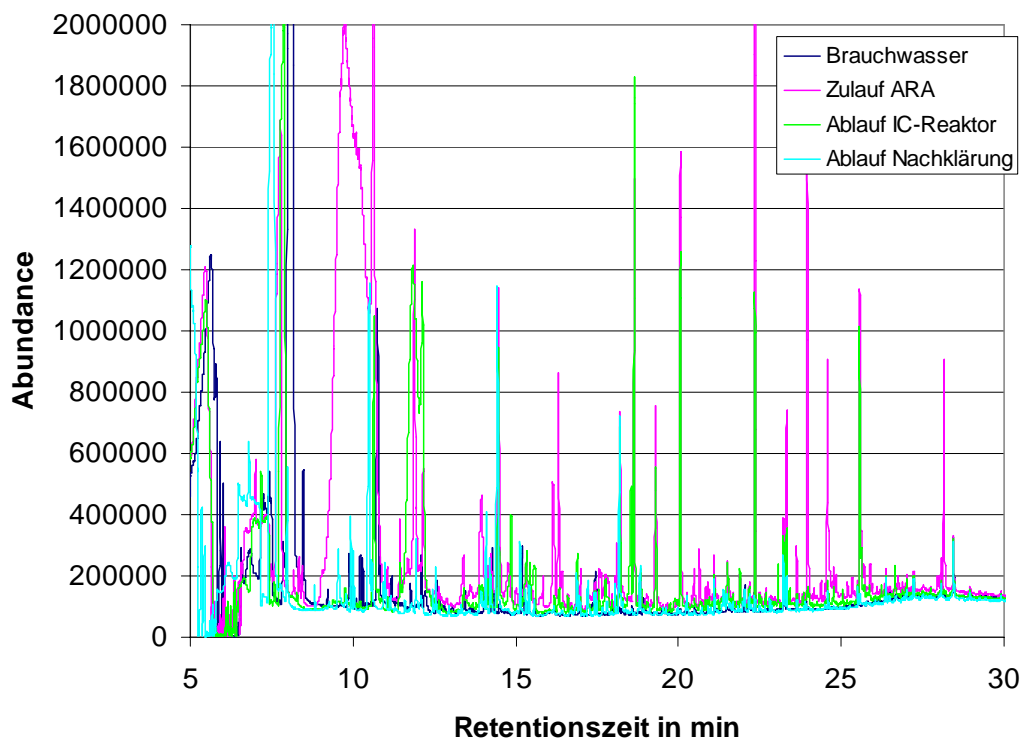


Abb. 30: Chromatogramme der vier verschiedenen (Ab-)Wasserproben im Werk L

Folgende Informationen lassen sich aus den Chromatogrammen ableiten:

- Das Brauchwasser enthält nur Stoffe, die aus den Acrylat-Twistern eluiert wurden.
- Im Zulauf zur ARA sind neben größeren Mengen an Phenol bei Retentionszeiten zwischen 9,7 und 10,7 min einige aromatische Alkohole und Aldehyde detektierbar. Dies sind u. a. 2-Methoxy-4-Methyl-Phenol, p-Hydroxy-Benzylalkohol, p-Hydroxybenzaldehyd, o-Hydroxybiphenyl, Bis(4-hydroxyphenyl)methan und Bisphenol A. Auch Diethylphthalat und Diisobutylphthalat konnten eindeutig zugeordnet werden, ebenso Benzophenon bei einer Retentionszeit von 20,1 min und TMDD. Ebenso konnte Diethylenglycoldibenzoat (Benzoflex 2-45), ein Weichmacher für Klebstoffe, Kunststoffe und Dichtungsmassen, detektiert werden.
- Im Ablauf des IC-Reaktors (hellgrünes Chromatogramm) ist ein Teil der im Zulauf zur ARA identifizierten Stoffe nur noch zu einem geringeren Anteil vorhanden oder gar nicht mehr nachweisbar. Einige wenige Peaks sind erstmals im Ablauf des IC-Reaktors vorhanden, oder aber höher als im Zulauf. Dies betrifft 4-Methylphenol bei Retentionszeiten zwischen 11,6 und 12,2 min sowie 1-Naphthol, ein vielseitig eingesetztes Zwischenprodukt für chemische Synthesen.
- Im biologisch gereinigten Abwasser (Ablauf Nachklärung) sind nur noch Spuren von TMDD (Surfynol 104 - nichtionischen Tensid) enthalten, alle anderen Peaks entstammen dem Anreicherungsmedium.

Bewertung der Ergebnisse der Abwasseruntersuchungen nach SBSE mit Acrylat-Twistern

Mit Hilfe der Acrylat-Twister können Verbindungen, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, im Papierfabrikationsabwasser sehr empfindlich im ng/l-Bereich nachgewiesen werden. Die Ergebnisse belegen, dass die Qualität und Reinheit des Brauchwassers, aber auch des gereinigten Abwassers, sehr hoch sind. In allen drei untersuchten Papierfabriken wird Altpapier zur Papierherstellung eingesetzt. Daher finden sich in den verschiedenen Stufen der Abwasserreinigung auch Chemikalien, die durch das Altpapier in das Prozesswasser gelangen (UV-Fotoinitiatoren, Weichmacher, Bisphenol A). Mit Hilfe der sehr nachweisstarken Analysemethode konnte die Effizienz der biologischen Abwasserreinigung auf die Entfernung von Spurenstoffen im Abwasser sehr gut dokumentiert werden. Endokrin wirksame Stoffe sind in keinem der untersuchten Abläufe der Papierfabriken nachweisbar.

3.2 Untersuchungen von Abwasserproben aus Abbautests (aerob/anaerob)

Wie im Abschnitt 3.1.1 beschrieben, verändert sich die endokrine Wirkung der Abwasserproben im Verlauf der biologischen Abwasserreinigung. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden im folgenden in insgesamt sechs verschiedenen Papierfabriken Zuläufe zu den Abwasserreinigungsanlagen entnommen und sowohl einem genormten aeroben Abbau als auch einem anaeroben Abbau unterzogen.

3.2.1 Untersuchungen zum aeroben Abbau von ARA-Zuläufen mittels Zahn-Wellens-Test

Für den aeroben Abbau wurde ein statisches Testverfahren, der Zahn-Wellens-Test (ZWT) entsprechend ISO 9888:1999-06 [52], eingesetzt. Die Zuläufe wurden jeweils soweit ver-

dünnt, dass sie einen CSB-Wert zwischen 800 und ca. 1.000 mg/l aufwiesen. Zusätzlich zu der nach der Norm vorgesehenen Untersuchung des CSB-Wertes nach 3 h, 24 h, 48 h, 96 h, 120 h und 168 h wurden aus den Reaktionsgefäßen jeweils 100 ml Probe entnommen und zur Untersuchung auf endokrine Wirkung mittels R-YEA-Test eingefroren. Die Tests zum aeroben biologischen Abbau wurden jeweils in Doppelbestimmung (zwei Reaktionsansätze) einschließlich Kontroll- und Blindwertbestimmung durchgeführt. Als Inokulum wurde der Belebtschlamm der Papierfabrik L verwendet. Im folgenden sollen diese Untersuchungen anhand von Abwasserreinigungsanlagen von drei Papierfabriken unterschiedlicher Papiersorten diskutiert werden.

In **Abb. 31** ist am Beispiel des Zulaufes zur ARA in Papierfabrik E (Herstellung von Tissue aus 100 % AP) der Verlauf der CSB-Werte aus dem ZWT dargestellt.

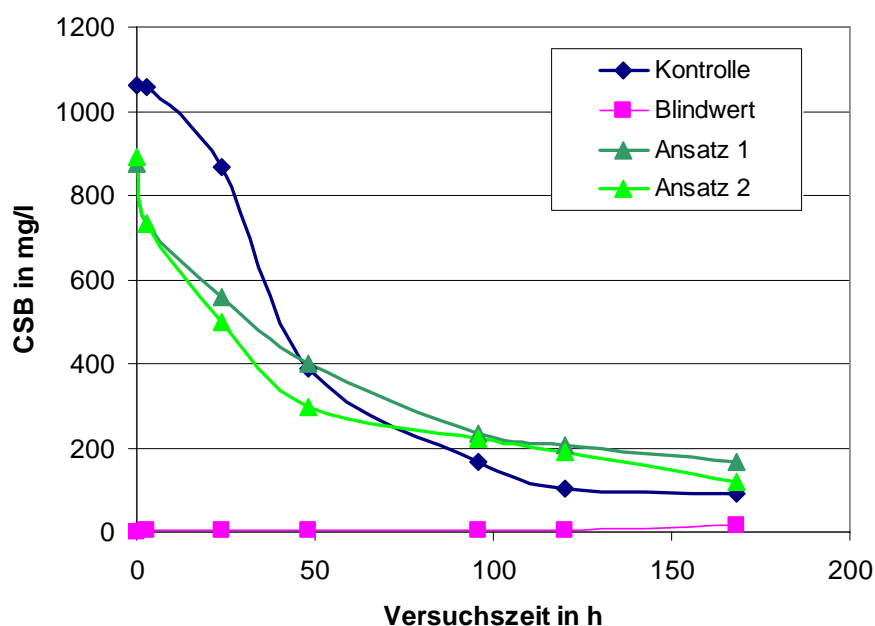


Abb. 31: Verlauf CSB-Abbau im ZWT Werk E

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Proben auf endokrine Wirkung im R-YEA sind in **Tab. 37** gegenübergestellt.

Tab. 37: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk E

Versuchszeit in h	Induktionsraten IR in unverdünnter Probe	
	Ansatz 1	Ansatz 2
0	stark zytotoxisch	stark zytotoxisch
3	stark zytotoxisch	stark zytotoxisch
24	stark zytotoxisch	0,84
48	0,83	1,15
96	1,21	1,19
120	0,73	0,94
168	1,32	1,19

Die Auswertung dieser Ergebnisse zeigt, dass in den beiden Ansätzen sowohl der CSB-Abbau als auch die Induktionsraten der β -Galaktosidase im R-YEA-Test ähnliche, wenn auch nicht identische, Verläufe annehmen. Nach 24 h ist im Ansatz 1 die Zytotoxizität noch derartig groß, dass nur 40 % der Zellen gewachsen sind, daher ist keine Auswertung möglich. Im Ansatz 2, in dem nach 24 h entsprechend Abb. 31 der CSB-Abbau schon etwas stärker abgelaufen ist, ist dagegen keine Zytotoxizität mehr feststellbar. Eine östrogenen Wirkung der Abwasserproben lag zu keinem Zeitpunkt des biologischen Abbaus vor. Ein Anstieg der östrogenen Wirkung während des aeroben Abbaus, wie in Abschnitt 3.1.1 in einigen Werken festgestellt wurde, trat hier nicht auf.

In einem weiteren Test aus dieser Serie wurde der Zulauf der ARA aus Papierfabrik K (Herstellung von grafischen Papieren aus AP/HS) dem ZWT unterzogen. In **Abb. 32** ist der CSB-Abbau im ZWT dargestellt.

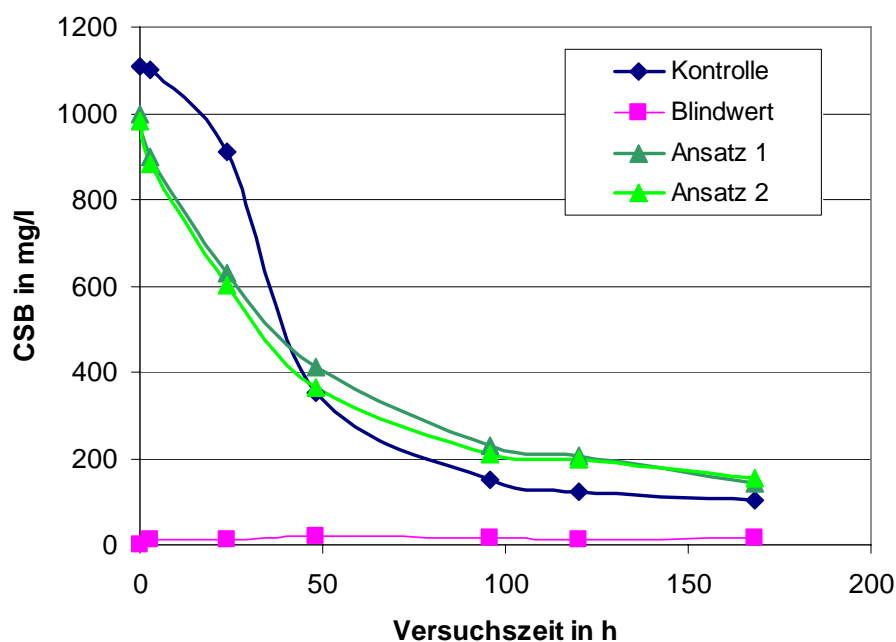


Abb. 32: Verlauf CSB-Abbau im ZWT Werk K

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Proben auf endokrine Wirkung im R-YEA sind **Tab. 38**: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk K zu entnehmen.

Tab. 38: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk K

Versuchszeit in h	Induktionsraten IR in unverdünnter Probe	
	Ansatz 1	Ansatz 2
0	stark zytotoxisch	stark zytotoxisch
3	stark zytotoxisch	stark zytotoxisch
24	stark zytotoxisch	0,89
48	0,77	0,88
96	1,21	1,19
120	0,95	1,08
168	0,65	0,41

Die Auswertung der Ergebnisse von Werk K zeigt analog zu Werk E, dass in den beiden Ansätzen sowohl der CSB-Abbau als auch die Induktionsraten der β -Galaktosidase im R-YEA-Test ähnlich ablaufen. Erstaunlicherweise sind auch hier nach 24 h aerobem Abbau starke Unterschiede in der Zytotoxizität vorhanden, die aber in den später entnommenen Proben nicht mehr auftreten. Eine östrogene Wirkung der Proben aus der aeroben Abwasserreinigung wurden nicht festgestellt. Allerdings sind bei Abbruch des Testes nach 7 Tagen in beiden Ansätzen sehr geringe Induktionsraten ermittelt worden, die möglicherweise auf eine Blockade des Östrogenrezeptors hindeuten oder aber eine antiöstrogene Wirkung signalisieren könnten.

Die hier untersuchte Abwasserprobe (Zulauf ARA Werk K) ist identisch mit der in Tab. 27 beschriebenen Probe. Für den Zulauf zur ARA stimmen die Messergebnisse für beide Serien gut überein (beide stark zytotoxisch). Die im Ablauf der Hochlast-Aerobstufe aus dem Werk K entnommene Probe (siehe Tab. 27) ist ebenfalls noch stark zytotoxisch (bei einem CSB-Wert der Probe von 1.110 mg/l). Dagegen zeigen die Werte in Tab. 38 nach 24 bzw. 48 h aeroben Abbau im ZWT eine starke Abnahme der Zytotoxizität. Ein Vergleich des realen CSB-Abbaus mit dem im ZWT ist schwierig, da die Probe für den ZWT vor Beginn des Testes entsprechend den Vorschriften der Norm auf einen CSB-Wert von ca. 1.000 mg/l verdünnt werden musste. Unter diesen Bedingungen ist bereits nach 24 bzw. 48 h, also bei einem CSB-Wert von ca. 400 mg/l (Ansatz 1) bzw. ca. 600 mg/l (Ansatz 2) die Zytotoxizität so gering, dass ein normales Wachstum der Hefezellen im R-YEA-Test beobachtet wurde.

In einem weiteren Test aus dieser Serie wurde der Zulauf der ARA aus Papierfabrik L (Herstellung von Wellpappenrohpaper aus 100 % AP) dem ZWT unterzogen. **Abb. 33** zeigt den CSB-Abbau im ZWT.

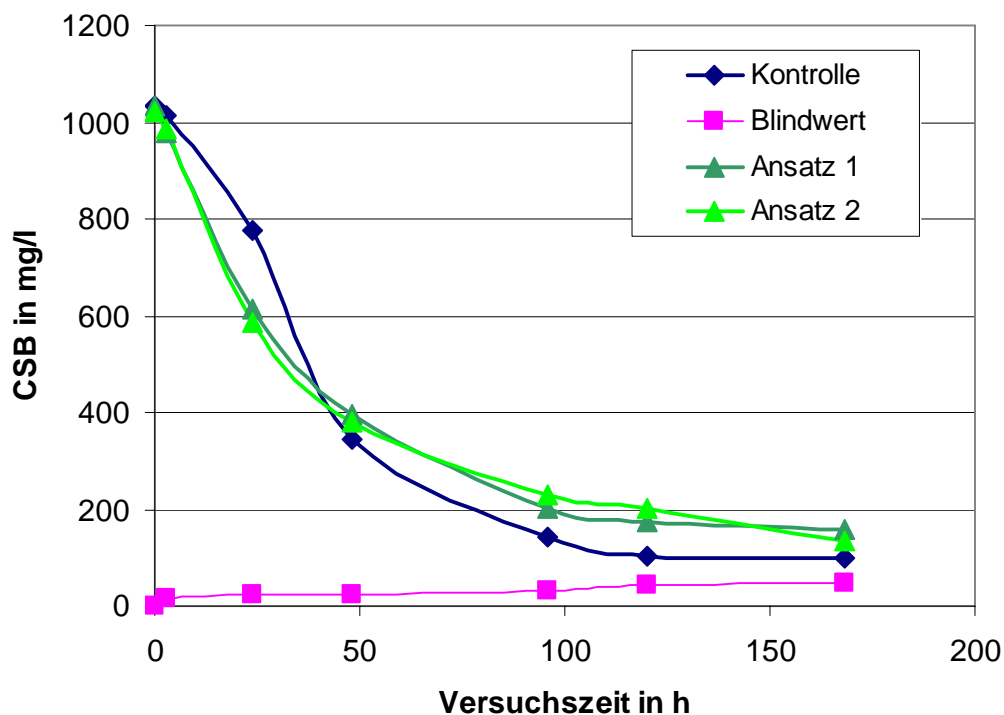


Abb. 33: Verlauf CSB-Abbau im ZWT Werk L

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Proben auf endokrine Wirkung im R-YEA sind **Tab. 39** zu entnehmen.

Tab. 39: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk L

Versuchszeit in h	Induktionsraten IR in unverdünnter Probe	
	Ansatz 1	Ansatz 2
0	zytotoxisch	zytotoxisch
3	1,57	1,07
24	3,69	1,40
48	2,69	1,33
96	1,05	1,16
120	0,95	1,11
168	0,88	1,25

In Abweichung zu den bisherigen Ergebnissen zeigen die beiden Ansätze für den ZWT vom Zulauf zur ARA im Werk L unterschiedliche Verläufe. Der CSB-Abbau stimmt in beiden Ansätzen gut überein, so dass von einem vergleichbaren Abbau der organischen Stoffe in den beiden Gefäßen ausgegangen werden kann. Dennoch belegen die Ergebnisse aus dem R-YEA-Test eine stark unterschiedliche endokrine Wirkung der Proben aus dem ZWT nach 3 h, 24 h und 48 h. Beide Proben sind beim Ansatz des Testes zytotoxisch, so dass keine Auswertung hinsichtlich der endokrinen Wirkung vorgenommen werden konnte. Danach steigt die östrogene Wirkung der Proben im Ansatz 1 bis zu einem Maximum nach 24 h stark an (IR=3,69, sehr stark östrogene Wirkung), im weiteren Verlauf nimmt die IR wieder ab, so dass nach 96 h Versuchszeit und in den Proben der darauf folgenden Tage keine östrogene Wirkung mehr auftritt. Im Ansatz 2 ist zwar auch eine leichte Erhöhung der IR zu erkennen, aufgrund der Spezifik des Testes und der Aussagen der Zahlenwerte (siehe Abschnitt 2.3.3.1) ist dies allerdings nicht relevant.

Die Analysen mit den Abwässern aus den Werken D, X und W, die analog zu den o. g. Untersuchungen durchgeführt worden sind, ergeben ähnliche Ergebnisse wie in den Werken K und E. Eine endokrine Wirkung wurde in keiner der Abwasserproben aus dem ZWT ermittelt. Die zunächst in allen Zuläufen zu den ARAs ermittelte Zytotoxizität nahm nach 24 bis 48 Stunden soweit ab, dass das Zellwachstum nicht mehr beeinträchtigt wurde. Die Verläufe in den beiden parallelen Ansätzen des ZWT sind gut vergleichbar. Insofern ist die große Abweichung der R-YEA-Ergebnisse des ZWT von Werk L (siehe Tab. 39) als Ausnahme zu betrachten. Die stark erhöhten Werte für die IR nach 24 h und 48 h im ZWT im Ansatz 1 von Werk L könnten allerdings ein Hinweis sein, dass die deutliche Zunahme der endokrinen Wirkung nach der Hochlast-Aerobstufe, die während der Untersuchungen zum Abwasserscreening in den Werken X, A, K und N ermittelt wurde (siehe Tab. 9, Tab. 10, Tab. 12, Tab. 16), auch im ZWT auftreten können. Welche chemischen Stoffe diese Erhöhung der IR im R-YEA-Test im Einzelfall bewirken, konnte im Rahmen des vorliegenden Projekts nicht geklärt werden.

3.2.2 Untersuchungen zum anaeroben Abbau von ARA-Zuläufen mittels PTS-Prüfmethode PTS-WA 003/07

Die Versuche zum Anaerobabbau wurden nach der PTS-Prüfmethode PTS-WA 003/97 „Bestimmung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit“ durchgeführt. Dazu wurden die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Abwasserproben aus sechs verschiedenen Papierfabriken (Zuläufe ARA) verwendet (jeweils 700 ml) und gemeinsam mit dem Anaerobschlamm (Werk L) in eine 1 l – Laborflasche mit Schraubverschluss und zwei Schlauchableitungen gefüllt, so wie in der angegebenen Prüfmethode beschrieben. Um das Abbauverhalten und die endokrine Wirkung der Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die Proben für den Anaerobtest im gleichen Verhältnis mit Wasser verdünnt wie für den Aerobtest (ZWT). In **Abb. 34** ist der prinzipielle Versuchsaufbau dargestellt.

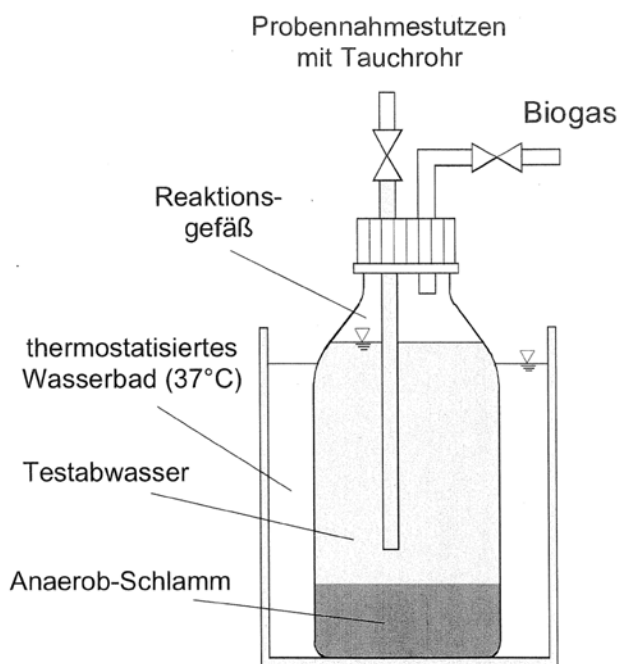


Abb. 34: Aufbau des Reaktionsansatzes zur Prüfung des Anaerobabbaus von Papierfabrikabwässern (entsprechend PTS-Prüfmethode PTS-WA 003/97)

Ähnlich der Versuchsdurchführung des ZWT wurden jeweils zwei Ansätze zum Anaerobabbau je Abwasserprobe angesetzt und diese, unter Mitführung von Blindwert und Referenzansatz, über einen Zeitraum von 7 Tagen im Trockenschrank bei einer Temperatur von 37°C belassen. Die Probenahmen zur CSB-Wert-Bestimmung und zum R-YEA-Test erfolgten nach 0, 24, 48 und 168 h. In den **Tab. 40** bis **Tab. 42** sind die Verläufe des CSB-Abbaus mit den dazugehörigen Induktionsraten aus dem R-YEA-Test für die Werke E, K und L dargestellt.

Tab. 40: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk E

Versuchszeit in h	Ansatz 1		Ansatz 2	
	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)
0	855	stark zytotoxisch	881	stark zytotoxisch
24	502	stark zytotoxisch	445	stark zytotoxisch
48	288	stark zytotoxisch	251	1,25
168	134	1,04	108	0,98

Tab. 41: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk K

Versuchszeit in h	Ansatz 1		Ansatz 2	
	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)
0	993	stark zytotoxisch	994	stark zytotoxisch
24	589	stark zytotoxisch	544	stark zytotoxisch
48	356	stark zytotoxisch	324	stark zytotoxisch
168	132	1,04	104	0,98

Tab. 42: Ergebnisse R-YEA im ZWT Werk L

Versuchszeit in h	Ansatz 1		Ansatz 2	
	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)	CSB in mg/l	IR (unverdünnte Probe)
0	1032	stark zytotoxisch	1023	stark zytotoxisch
24	546	stark zytotoxisch	521	stark zytotoxisch
48	302	1,38	266	1,22
168	100	1,13	91	0,87

Die Ergebnisse belegen, dass die zytotoxische Wirkung der Proben auch unter definierten anaeroben Abbaubedingungen erst unter einem CSB-Gehalt von ca. 200 – 300 mg/l soweit abnimmt, dass das Wachstum der Hefezellen im R-YEA-Test nicht mehr beeinträchtigt wird. Damit stimmen die Ergebnisse der anaeroben Abbaubersuche mit den Ergebnissen aus dem Abwasserscreening (siehe Abschnitt 3.1.1.1) gut überein. Hier waren 5 von 7 untersuchten Abläufen aus IC-Reaktoren stark zytotoxisch. Dadurch wird die Anwendbarkeit des R-YEA-Testes für diese Proben stark eingeschränkt.

Eine signifikante Zunahme der IR über einen Wert von 1,5 wurde in den standardisierten Abbaubersuchen nicht beobachtet.

3.3 Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von chemischen Additiven für die Papierherstellung

Zunächst werden im Abschnitt 3.3.1 die wesentlichen Gruppen chemischer Additive auf ihre mögliche endokrine Wirkung im biologisch gereinigten Abwasser von Papierfabriken bewertet. Ausgewählte Additive wurden dann mit dem in vitro-Testsystem R-YEA auf ihre endokrine Wirkung untersucht. Diese Untersuchungen werden im Abschnitt 3.3.2 beschrieben.

3.3.1 Auswahl relevanter Additive

Im Zusammenhang mit den Untersuchungsergebnissen in den bereits abgeschlossenen Projekten [9, 10, 11, 38] ergab sich die Frage, ob ausgewählte chemische Additive für die Papierherstellung Ursache der östrogenen Wirkung einiger biologisch gereinigter Abwässer von Papierfabriken sein können. Eine erste stichpunktartige Untersuchung von Additiven aus dem Werk L ist bereits im INFOR-Projekt 70 [11] vorgestellt worden. Die hier untersuchte Mischung unterschiedlicher Retentionsmittel und Entschäumer ergab keine östrogene Wirkung im R-YEA-Test.

Im folgenden sollen systematisch wesentliche Gruppen von chemischen Additiven für die Papiererzeugung auf ihr mögliches Potenzial, östrogene Wirkungen im gereinigten Abwasser hervorzurufen, bewertet werden. Dazu müssen neben den Informationen zur chemischen Zusammensetzung der Additive insbesondere deren Verbleib bei der Papierherstellung (Verbleib im Papier, in Rejekten und Schlämmen, Übergang in das Prozesswasser etc.) sowie im Falle des Übergangs in die Wasserphase die biologische Abbaubarkeit der Additive geklärt werden. Wesentliche Informationen dazu wurden dem Buch „Chemical Additives for the Production of Pulp and Paper“, herausgegeben vom Zellcheming-Fachausschuss „Chemische Additive“ (CHAD) [53] entnommen. Einzelne Fakten zur Zusammensetzung und zum Einsatz von verschiedenen Stärkederivaten und anderen Additiven wurden in dem Buch „Papermaking Chemistry“, herausgegeben von der „Finnish Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy“ [54] recherchiert.

Retentionsmittel

Retentionsmittel sind für die Einstellung der Produktionsgeschwindigkeit und der Qualität in der Papierherstellung unentbehrlich. Sie sind unterschiedlicher chemischer Natur:

- anorgan. Verbindungen (z. B. Aluminiumsulfat, Polyaluminiumchlorid, Bentonite),
- modif. Naturstoffe (z. B. kationisch modifizierte Stärke, Carboxymethylcellulose),
- synthetische organische Polymere (z. B. Polyacrylamide, Polyethylenimine, polyDADMAC, Polyvinylamine, Polyethylenoxide).

Retentionsmittel sind immer sehr faseraffine Verbindungen. Für Polyacrylamide und Polyethylenimine, die am meisten eingesetzten organischen Polymere, sind Untersuchungen zum Verbleib während des Papierherstellungsprozesses durchgeführt worden [53, 55]. Danach kann davon ausgegangen werden, dass diese Retentionsmittel zu mehr als 98 % im Papier verbleiben und weniger als 2 % in das Kreislaufwasser gelangen. In der ARA werden sich diese Retentionsmittel vorrangig an den Schlamm anlagern, so dass im gereinigten Abwasser eine Konzentration „nahe 0“ zu erwarten ist. Wenn Polyacrylamide in Form einer Emulsion verwendet werden, gelangen zusätzlich zu den polymeren Verbindungen

noch Tenside und Mineralöle in geringen Konzentrationen in die Papiermaschine. Diese wenig faseraffinen Begleitstoffe gelangen zu ca. 90 % ins Prozesswasser. Wegen ihrer guten biologischen Abbaubarkeit konnten aber auch diese Stoffe im gereinigten Abwasser der Papierfabriken nicht mehr detektiert werden [53].

Leimungsmittel

Leimungsmittel stellen im Rahmen der Spezialchemikalien für die Papierherstellung nach den Bindemitteln für die Streichfarben die mengenmäßig größte Gruppe dar. Je nach Applikation gibt es Leimungsmittel für den Oberflächenauftrag (meist Polymerleimungsmittel PSA) und Leimungsmittel zum Einsatz in der Masse (Harzleim, Alkylketendimer AKD, Alkenylbernsteinsäureanhydrid ASA). Oberflächenleimungsmittel sollten aufgrund der Applikation nicht in die Wasserphase übergehen. Bestandteile der Oberflächenleimungsmittel können lediglich gebunden an die festen Reststoffe ausgetragen werden. Der Verbleib der Masseleimungsmittel liegt bei Einhaltung wesentlicher Prozessparameter bei 70-90 %, der Rest kann in das Prozesswasser übergehen. Über die biologische Abbaubarkeit dieser Stoffe gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Es wird aber davon ausgegangen, dass weniger als 1 % der Einsatzmenge im gereinigten Abwasser der Papierfabrik verbleibt.

Fixiermittel zur Störstoffbekämpfung

Fixiermittel sind relativ niedermolekulare Polymere unterschiedlicher chemischer Basis mit kationischer Ladung. Bei konventioneller Fixierung im Stoff verbleiben die Polymere im Papier, ein nennenswerter Übergang in die Wasserphase findet nicht statt. Andere Fixiermittel werden gemeinsam mit den anionischen Störstoffen über die Rejekte ausgetragen. Aufgrund der hohen Faseraffinität der Fixiermittel ist bei Normbetrieb der Papiermaschine eine nahezu quantitative Absorption an Faser- und Füllstoffen zu erwarten.

Flockungsmittel zur Prozesswasserreinigung

Flockungsmittel werden zur Unterstützung der Feststoffabtrennung durch Druckentspannungsflotation bzw. Scheibenfilter eingesetzt. Die meisten Flockungsmittel sind Polyacrylamide, teilweise mit Koagulantien kombiniert. Untersuchungen haben gezeigt, dass über 99 % des Flockungsmittels mit den Rejekten ausgetragen wird und nur ca. 0,5 % in das Abwasser übergehen.

Entschäumer/Entlüfter

Durch chemische Entlüftung und Schaumhemmung in der Faserstoffsuspension kann die Effektivität von Refineranlagen und Pumpen erhöht und die Entwässerung auf den Papiermaschinen Sieben und in der Trockenpartie verbessert werden. Auch die Laufeigenschaften und die Qualität der Papiere werden positiv beeinflusst. Darüber hinaus ist für die optimale Wirkung anderer chemischer Additive, z. B. der Retentionsmittel, die Reduzierung des Gaseintrages in die Faserstoffsuspension auf ein Minimum notwendig.

Entschäumer und Entlüfter sind substituierte Kohlenwasserstoffe mit unterschiedlichen polaren Gruppen (-OH, -COOH, -SO₃H, -NR₂). Entschäumer sind eher hydrophob, Entlüfter amphiphil. Bezüglich der Polarität und Hydrophilie liegen diese Stoffe zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffen und den stark schäumenden Tensiden. Sie haben die Tendenz, sich an den Grenzflächen Gas/Wasser oder den hydrophoben Faseroberflächen zu konzentrieren und destabilisieren so die Gasblasen. Die Wirkstoffe, die häufig in Form von 25-30 %igen wässrigen Emulsionen angeboten werden, sind hauptsächlich höhere

Fettalkohole, Fettsäuren, Fettsäureester und ihre Ethoxylate. Aufgrund ihrer geringen Faseraffinität gehen Entschäumer/Entlüfter zu einem großen Teil in die Wasserphase über. Entsprechende Modellrechnungen in [53] gehen von ca. 70-75 % aus, von denen ca. 90 % biologisch abbaubar sind. Demnach können im biologisch gereinigten Abwasser noch ca. 7 % der ursprünglich eingesetzten Menge vorhanden sein. Bei einer angenommenen Einsatzmenge von 100 g Wirkstoff (Trockenmasse) pro Tonne Papier und einer spezifischen Abwassermenge von ca. 15 m³ Abwasser pro Tonne Papier resultieren ca. 0,5 g/m³ (= 0,5 mg/l) Wirkstoff im gereinigten Abwasser. Octyl- oder Nonylphenoethoxilate und ihre Derivate, die als endokrin wirksame Verbindungen bekannt und mittlerweile einem Verwendungsverbot unterliegen, werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder als Entschäumer noch für andere Zwecke in der Papierindustrie eingesetzt.

Dispergiermittel für Füllstoffe und Streichfarbepigmente

Dispergiermittel bestehen im wesentlichen aus Polyacrylaten und Polyacrylsäuresalzen. Der Hauptteil dieser Stoffe verlässt den Produktionsprozess mit den im Papier befindlichen Füllstoffen und Streichfarbepigmenten. Von dem im Abwasser befindlichen Anteil werden die Stoffe mit geringer Molmasse (<3.000 g/mol) gut biologisch abgebaut. Die höhermolekularen Verbindungen werden an Füllstoffen und Streichfarbepigmenten im Schlamm der ARA fixiert.

Komplexbildner

Für die Bleiche von Faserstoffen und im Deinkingprozess von Altpapier werden häufig Komplexbildner aus der Gruppe der Polyaminocarbonsäuren (DTPA und EDTA) eingesetzt, da sie sehr wirksam Bleichmittel zersetzende Schwermetall-Ionen maskieren. Die Komplexbildner gehen aufgrund ihrer geringen Faseraffinität nahezu vollständig in die Wasserphase über. Ihre biologische Abbaubarkeit in der ARA ist im allgemeinen nicht gut, obwohl Untersuchungen gezeigt haben, dass unter optimalen Bedingungen (hoher pH-Wert, Einfluss von UV-Licht, gut adaptierte Bakterien) eine EDTA-Abbaurrate von ca. 90 % erreicht werden kann. Dennoch verbleibt ein Teil der Komplexbildner im gereinigten Abwasser und gelangt von dort in die Oberflächengewässer. Aufgrund ihres hohen Metallbindungsvermögens sind die Polyaminocarbonsäuren in der Lage, Schwermetalle aus dem Sediment wieder zu remobilisieren. Endokrine Wirkungen sind für diese Stoffe aber nicht bekannt. Außerdem können die Wirkungen dieser Stoffe mittels R-YEA nicht untersucht werden, da Komplexbildner die Farbreaktion mit den Cu-Ionen stören, die per UV-VIS-Spektralphotometrie die Grundlage für die quantitative Auswertung des R-YEA bilden.

Stärke

Stärke nimmt unter den chemischen Additiven für die Herstellung und Veredelung von Papier eine wichtige Rolle ein. Stärke ist sowohl für die Applikation in der Masse als auch für Oberflächenanwendungen geeignet, außerdem wird es als Bindemittel beim Streichen eingesetzt. Der durchschnittliche Wert für den Stärkezusatz liegt bei allen Papier- und Kartonqualitäten bei 17 kg/t. Für die Herstellung von Verpackungspapieren (Liner, Wellstoff) werden für die Erzielung der gewünschten Festigkeitseigenschaften ca. 40 kg/t Stärke verwendet. Dazu kommen noch weitere ca. 25 kg Stärke pro Tonne Wellpappe, die zur Verklebung im nachfolgenden Verarbeitungsschritt benötigt werden. Dadurch gelangen erhebliche Mengen an Stärke ungewollt über das Altpapier wieder in den Herstellungsprozess. Diese Stärke kann analytisch nicht von der im jeweiligen Werk eingesetzten Stärke unterschieden werden.

Neben den nativen Stärketypen (meistens Weizen-, Mais- oder Kartoffelstärke) gibt es zahlreiche Stärkederivate, die aus der natürlichen Stärke durch unterschiedliche chemische Reaktionen mit mono-, bi- oder polyfunktionellen Reagenzien hergestellt werden. In Abhängigkeit von Art und Anzahl der eingefügten Substituenten und deren Verteilung innerhalb der Polymerkette entstehen Stärkederivate für verschiedene Einsatzzwecke (z. B. anionische Stärke, kationische Stärke, oxidierte Stärke, enzymatisch abgebaute Stärke).

In [53] sind Untersuchungen zum Verbleib der eingesetzten Stärke zum einen bei der Herstellung von Verpackungspapieren, zum anderen bei der Herstellung von holzfreien, gestrichenen Feinpapieren beschrieben. Bei den in diesen Untersuchungen eingesetzten Verpackungspapieren wurde sowohl anionische Maisstärke, als auch native Kartoffelstärke mit Poyvinylamin versetzt. Dabei entstehen Polymerkomplexe, die zusammen mit dem Faserstoff sehr stabile, adsorptive Bindungen eingehen. Dieser Stärke-Polymer-Komplex, der zur Applikation in der Masse vorgesehen ist, verbleibt in Abhängigkeit von der Wirksamkeit des Retentionsmittels zu ca. 80 % im Papier. Die nicht retenierte Stärke geht, wie auch der Großteil der mit dem Altpapier eingetragenen Stärke, in das Kreislaufwasser über. In der biologischen Kläranlage wird die Stärke nahezu vollständig abgebaut.

Im Falle der gestrichenen Feinpapiere wird die Stärke sowohl als Massenstärke zu Verfestigungs- und Retentionszwecken eingesetzt, als auch zur Oberflächenleimung. Die Mengenzahl an einer ausgewählten Papiermaschine ergab, dass weit über 90 % der eingesetzten Stärke im Faserverbund verbleiben und mit dem Papier die Fabrik verlassen. Auch hier geht ein geringer Teil der Stärke vor allem bei der Blattbildung durch unzureichende Retention verloren, gelangt ins Prozesswasser und wird der biologischen Kläranlage zugeführt, wo die Stärke wiederum größtenteils abgebaut wird.

Biozide

Das Prozesswasser der Papierherstellung ist aufgrund der Temperatur, des Nahrungsangebotes und des kontinuierlichen Eintrages von Mikroorganismen über Luft, Wasser, Faserrohstoffe und Additive eine nahezu optimale Umgebung für mikrobiologisches Wachstum. Durch Biofimbildung, aber auch planktische, frei bewegliche Mikroorganismen, kann es zu Störungen in der Produktion, aber auch zu Qualitätsproblemen der Produkte kommen. Daher gibt es verschiedene Strategien, Mikroorganismen in den Wasserkreisläufen der Papiermaschine zu bekämpfen. In zahlreichen Papierfabriken werden dafür, neben anderen verfahrenstechnischen Maßnahmen, Biozide eingesetzt. Dabei kommen sowohl nicht-oxidative, zunehmend aber auch oxidative Biozide, Biodispersatoren und andere Wirkstoffe zum Einsatz. Wegen ihrer bioziden Wirkung können diese Stoffe mit dem R-YEA-Test allerdings nicht auf eine mögliche endokrine Wirkung untersucht werden.

3.3.2 Untersuchungen ausgewählter Additive mit R-YEA-Testverfahren

Aufgrund der oben diskutierten Relevanz unterschiedlicher chemischer Additive in Bezug auf die Einsatzmenge, die in das Prozesswasser übergehenden Anteile und die biologische Abbaubarkeit der Stoffe haben sich die folgenden Untersuchungen auf endokrine Wirkung auf folgende Additivklassen konzentriert:

- Retentionsmittel,
- Entschäumer,

- Flockungsmittel,
- Stärke.

Die Additivmuster für diese Untersuchungen wurden sowohl von den Papierfabriken als auch von den Herstellern zur Verfügung gestellt. Die Auswahl der beteiligten Papierfabriken erfolgte auf der Grundlage der Ergebnisse der Abwasserproben im R-YEA-Test. Dabei wurden für die Bemusterung nur Werke ausgewählt, bei denen im vorliegenden und in bereits abgeschlossenen Projekten im Ablauf der Nachklärung mindestens an zwei verschiedenen Probenahmen eine endokrine Wirkung des biologisch gereinigten Abwassers ermittelt wurde (Werke D, E, L). Durch diese Vorgehensweise sollte einerseits geklärt werden, ob die untersuchten Additive für eine mögliche endokrine Wirkung im Ablauf dieser ARAs verantwortlich sein könnten, andererseits sollte durch die Bemusterung durch die Hersteller der Additive eine möglichst große Bandbreite an Additiven untersucht werden.

Für die Berechnung der Konzentration der Additive in der zu untersuchenden Probe wurden die vom Werk angegebenen spezifischen Einsatzmengen der Additive in kg/t Papier und die spezifische Abwassermenge in m³ Abwasser/t Papier zugrunde gelegt. Aus diesen Angaben und den in Abschnitt 3.3.1 angegebenen prozentualen Übergängen der Additive in das Prozesswasser wurde näherungsweise ermittelt, wie hoch die Konzentration des Additivs im Zulauf der ARA sein kann. Mit den weiteren Daten zur biologischen Abbaubarkeit lässt sich dann abschätzen, welche Gehalte des jeweiligen Wirkstoffs im biologisch gereinigten Abwasser enthalten sein können. Im Zweifelsfall wurde die Konzentration in der Probe eher etwas höher angesetzt, da durch die entsprechenden Verdünnungen im R-YEA-Test ohnehin die Wirkungen der verdünnten Proben ermittelt werden. Bei den Mustern, die vom Hersteller geliefert wurden, wurden die empfohlenen spezifischen Einsatzmenge des Additivs und die durchschnittlichen spezifischen Abwassermengen der jeweiligen Papiersorten als Berechnungsgrundlage herangezogen.

Retentionsmittel

Es wurden insgesamt 12 verschiedene Retentionsmittel untersucht. Darunter waren zwei Muster auf der Basis von Carboxymethylcellulose, fünf Polyacrylamide, vier Polyethylenimine und ein Muster auf der Basis von polyDADMAC. Auf die Untersuchung von anorganischen Retentionsmitteln (Aluminiumsulfat, Polyaluminiumchlorid, Bentonite u. a.) wurde verzichtet, da diese in den untersuchten Papierfabriken nicht zum Einsatz kommen und aufgrund ihrer Zusammensetzung auch keine potenziell endokrin wirksamen Stoffe enthalten. Die Untersuchungen zur kationischen Stärke werden gemeinsam mit den anderen Stärkederivaten weiter unten beschrieben. Die genannten Additive wurden für die zu untersuchenden Muster mit Leitungswasser auf eine Konzentration von 2 mg/l eingestellt (siehe Abschnitt 3.3.1). Da sich diese Stoffe im Verlauf der Abwasserreinigung mehr an den Schlamm anlagern sollten, sind die Verdünnungen im R-YEA-Test mit den realen Konzentrationen im biologisch gereinigten Abwasser gut vergleichbar. In **Tab. 43** sind die Untersuchungsergebnisse der Proben im R-YEA-Test (Verdünnungsstufe 1,5 gemäß Tab. 6) zusammengefasst.

Tab. 43: Ergebnisse R-YEA-Test Retentionsmittel

Muster Nr.	Wirkstoff	IR	Muster Nr.	Wirkstoff	IR
1	Carboxymethylcellulose A	0,9	7	Polyacrylamid E	1,1
2	Carboxymethylcellulose B	1,1	8	Polyethylenimin A	0,8
3	Polyacrylamid A	0,8	9	Polyethylenimin B	1,0
4	Polyacrylamid B	0,9	10	Polyethylenimin C	0,9
5	Polyacrylamid C	1,0	11	Polyethylenimin D	1,0
6	Polyacrylamid D	1,2	12	polyDADMAC	1,1

Weder in diesen Proben noch in den stärker verdünnten Proben wurde eine endokrine Wirkung ermittelt. Damit kann ein nennenswerter Beitrag der untersuchten Retentionsmittel auf die endokrine Wirkung von Papierfabriksabwässern, auch in den Werken D, E und L, ausgeschlossen werden.

Entschäumer

Es wurden insgesamt 10 verschiedene Entschäumer einzeln auf ihre Wirkung im R-YEA-Test untersucht. Von den Entschäumern wurden jeweils 1 mg/l Lösungen mit Leitungswasser hergestellt. Durch die entsprechenden Verdünnungen im R-YEA-Test (siehe Tab. 6) sind auch die Ergebnisse der stärker verdünnten Proben bekannt. Nicht von allen Entschäumern lagen Angaben zur chemischen Zusammensetzung vor. Insbesondere für die sieben Muster, die in den Werken D, E und L eingesetzt wurden, konnten nur wenige Informationen zur chemischen Basis recherchiert werden. Bei den drei Entschäumern, die direkt vom Hersteller bezogen worden sind, sind die Angaben in **Tab. 44** vermerkt.

Tab. 44: Ergebnisse R-YEA-Test Entschäumer

Muster Nr.	Wirkstoff	IR	Muster Nr.	Wirkstoff	IR
1	Nicht bekannt	1,2	6	Nicht bekannt	0,9
2	Nicht bekannt	1,1	7	Nicht bekannt	1,2
3	Nicht bekannt	1,0	8	Nichtionogene Fettderivate	1,1
4	Aliphat. Hydroxyverbindungen	0,8	9	Gemisch aus Fettsäureestern und höheren Kohlenwasserstoffen	1,0
5	Mineralöl und Fettsäureester	0,9	10	Wässrige Emulsion von Estern aliphatischer Carbonsäuren	1,1

Flockungsmittel

Alle 6 untersuchten Flockungsmittel basieren auf Polyacrylamiden. Sie werden größtenteils bei der Prozesswasserreinigung eingesetzt, ein geringerer Teil auch zur Abtrennung von Feststoffen in der Abwasserreinigung. Die Konzentration beim Ansatz der Proben zur Untersuchung mittels R-YEA beträgt 3 mg/l. Zwei der untersuchten Flockungsmittel werden im Werk D, zwei im Werk E eingesetzt, die anderen beiden Flockungsmittel wurden vom Hersteller zur Verfügung gestellt. In **Tab. 45** sind die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen mit den Flockungsmitteln in der Verdünnungsstufe 1,5 dargestellt.

Tab. 45: Ergebnisse R-YEA-Test Flockungsmittel

Muster Nr.	Wirkstoff	IR	Muster Nr.	Wirkstoff	IR
1	Polyacrylamide	1,1	4	Nicht bekannt	1,0
2	Polyacrylamide + polyDADMAC	0,8	6	Polyacrylamid mit Polyamin	1,0
3	Polyacrylamide	0,9	6	Mischung versch. Polyacrylamide	1,2

Auch die untersuchten Flockungsmittel weisen keine endokrine Wirkung im R-YEA-Test auf.

Stärke

Wie im Abschnitt 3.3.1 bereits erläutert, ist Stärke mengenmäßig das am meisten eingesetzte chemische Additiv für die Herstellung unterschiedlicher Papiersorten. Insbesondere im Bereich der Herstellung von Wellpappenrohpa-pieren wird es in erheblichen Mengen (bis zu 40 kg/t Papier) zur Verfestigung der Papiere eingesetzt. Zusätzlich werden in der Papierverarbeitung (Verklebung) von Wellpappenverpackungen größere Mengen unterschiedlicher Stärken verwendet. Da für die Produktion von Verpackungspapieren zum großen Teil braune Altpapiersorten eingesetzt werden, die noch einen zusätzlichen (schwer quantifizierbaren) Eintrag an Stärke in das Prozesswasser leisten, sollte die Stärke in diesem Projekt ebenfalls auf ihre endokrine Wirkung untersucht werden. Die biologische Abbaubarkeit der verschiedenen Stärkederivate ist sehr hoch, so dass im gereinigten Abwasser der Papierfabriken nur noch Spuren an Stärke vorhanden sein sollten. Dennoch soll geklärt werden, inwieweit im Abwasser enthaltene Stärke einen Einfluss auf das Ergebnis der in vitro-Untersuchungen, z. B. auch im Zulauf zur ARA, hat.

Mit diesem Ziel wurden zunächst drei verschiedene native Weizenstärken unterschiedlicher Hersteller, die im Werk L eingesetzt werden, auf ihre endokrine Wirkung untersucht. Dazu wurden jeweils 1 %-ige Stärke-Lösungen mit Leitungswasser angesetzt. Für die Berechnung der Konzentration an Stärke in der Lösung wurden folgende vereinfachte Annahmen zugrunde gelegt:

- Spezifische Einsatzmenge in Papierfabrik: bis zu 40 kg/t
- Spezifischer Eintrag durch stärkehaltiges Altpapier: bis zu 65 kg/t (durch Zusatz von Stärke auch bei Verarbeitung und Verklebung der Wellpappenpapiere)
- Spezifische Abwassermenge: 10 m³/t
- Übergang von Stärke in Prozesswasser: ca. 50 % (vor allem Stärke aus dem eingesetzten Altpapier, aber auch bis zu 20 % der im Werk eingesetzten, nicht retinierten Stärke)

Aus obigen Annahmen resultieren Gehalte von bis zu 5 g/l im nicht gereinigten Prozesswasser. Durch Verdünnung der Proben durch die zugesetzten Testmedien im R-YEA-Test wurden Stärke-Proben in Konzentrationen von 10 g/l für den worst case-Fall angesetzt. Die weiteren Verdünnungsreihen im R-YEA-Test geben dann die Untersuchungsergebnisse für die weniger stärkehaltigen Proben an.

Nach diesen ersten Untersuchungsergebnissen wurden in einer zweiten Probenserie zusätzliche Stärkederivate von zwei weiteren Herstellern getestet. Die Untersuchungsergebnisse sind in **Tab. 46** dargestellt.

Tab. 46: Ergebnisse R-YEA-Test Stärke-Proben

Probenummer	Art der untersuchten Stärke	Hersteller	IR in Verdünnungsstufe 1,5
Erste Untersuchungsserie			
1	Native Weizenstärke, Werk L	1	2,4
2	Native Weizenstärke, Werk L	2	1,7
3	Native Weizenstärke, Werk L	3	2,1
Zweite Untersuchungsserie			
4	Kartoffelstärke, kationisch	4	2,0
5	Oxydierte Kartoffelstärke, anionisch	4	1,5
6	Native Kartoffelstärke	4	1,8
7	Kartoffelstärke, kationisch	5	1,6
8	Maisstärke, anionisch	5	1,0
9	Native Weizenstärke	5	2,1

Mit Ausnahme der Probe Nr. 8 wurden für alle anderen Stärke-Proben Induktionsraten von $> 1,5$ ermittelt, die einer deutlichen endokrinen Wirkung entsprechen würden. Weitere Recherchen haben ergeben, dass Stärken, vor allem Getreidestärken, mit dem Mykotoxin Zearalenon verunreinigt sein können. Dieses Toxin wird von speziellen *Fusarium species* gebildet und kann in Nutzpflanzen, insbesondere Mais, Weizen, Gerste und anderen Getreidesorten, enthalten sein. Zearalenon wirkt sehr stark östrogen. Diese Wirkung wurde sowohl mit in vitro-, als auch mit in vivo-Untersuchungen eindeutig nachgewiesen. Seine Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor ist zwar 10-20fach geringer als die des 17- β -Östradiols, aber um viele Zehnerpotenzen höher als die von Bisphenol A, Phthalaten und anderen Industriechemikalien. Wegen der starken östrogenen Wirkung, auch auf den menschlichen Organismus, hat die European Food Safety Authority (EFSA) einen maximal zulässigen Gehalt von 50 μg Zearalenon je kg Getreideerzeugnis festgelegt. Allerdings ist selbst in Getreide für Lebens- und Futtermittel der Gehalt an Mykotoxinen von Schimmelpilzen wie Zearalenon (ZEA, ZON) nur schwer zu bestimmen, da die Verteilung dieser Mykotoxine unregelmäßig und nestartig ist [56]. Entsprechend können auch bei der Weiterverarbeitung des Getreides zu Stärke sehr unterschiedliche Chargen bezüglich des Zearalenon-Gehaltes entstehen. Die Gehalte an Zearalenon in Getreide schwanken stark, da der Befall mit dem Pilz *Fusarium* klimatisch beeinflusst wird. In Deutschland wurden in den letzten Jahren Werte von 0 – 2 mg Zearalenon / kg Getreide ermittelt [57].

Da Kartoffeln von den o. g. *Fusarium species* nicht befallen werden, lassen sich aber zumindest die hohen Induktionsraten für die untersuchten Kartoffelstärke-Produkte nicht durch mögliche Zearalenon-Kontamination erklären. Allerdings kann Kartoffelstärke eine Reihe von Phytohormonen enthalten, die ebenfalls östrogen wirken können (z. B. β -Sitosterol, Tryptophan, Luteolin, Stigmasterol).

Neben einer möglichen Querkontamination durch andere Proben gibt es aber weitere Erklärungen für die eventuell falsch positiven Werte. Insbesondere durch die Viskosität und

die Trübung der Stärke-Proben kann es zu einer entscheidenden Beeinflussung des Testverlaufs und vor allem der spektralphotomerischen Messung (optische Dichte) im R-YEA-Test kommen. Durch die starke Eigentrübung der Proben konnte das Wachstum der Zellen nicht gut beobachtet werden. Da die Hefen auch in der Lage sind, Stärke abzubauen, kann wahrscheinlich auch nicht davon ausgegangen werden, dass sich die Trübung der Probe und die Trübung der Hefen nach 18 h Inkubation noch additiv verhalten. Die Untersuchungen wurden daher mit einigen Industriestärken, später auch mit Lebensmittelstärken, wiederholt. In **Abb. 35** sind die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen denen der ersten Untersuchungen gegenübergestellt (jeweils IR für Verdünnungsstufe 1,5). Die angegebenen Werte für G_{EH} entsprechen dabei der ersten Verdünnungsstufe, die im Test keine östrogene Wirkung ergeben hat (siehe Übersicht zu Verdünnungsstufen in Tab. 6).

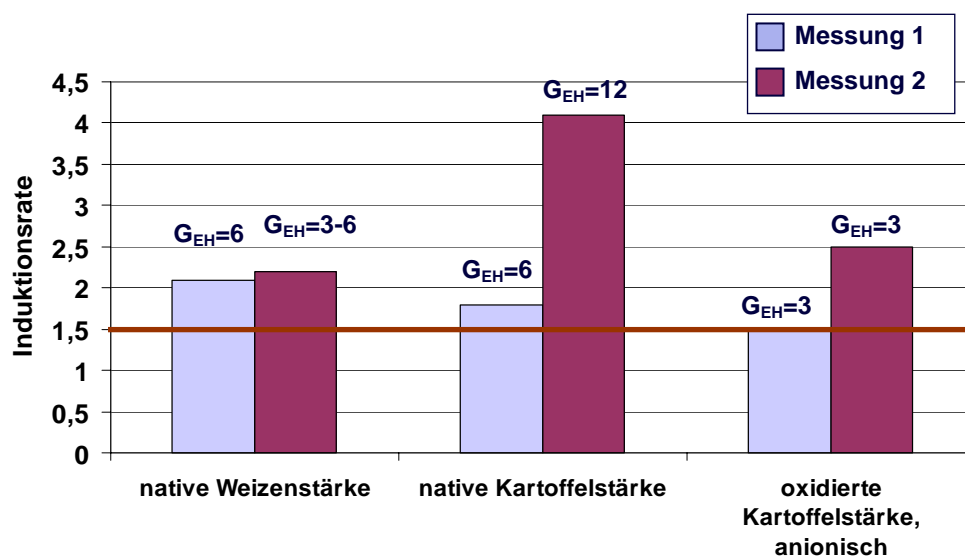


Abb. 35: Ergebnisse der Wiederholungsmessungen von Stärke-Proben im R-YEA-Test

In diesen Untersuchungen wurden die Ergebnisse der ersten Messungen im Wesentlichen bestätigt. Eine weitere Untersuchungsserie mit verschiedenen handelsüblichen Lebensmittelstärken ergab die in **Tab. 47** dargestellten Ergebnisse.

Tab. 47: Ergebnisse R-YEA-Test Lebensmittelstärken

Probe	IR bei $G_{EH}=1,5$	Erste Verdünnungsstufe ohne östrogene Wirkung
Feine Speisestärke Mais – Hersteller 1	3,8	$G_{EH} = 12$
Feine Speisestärke Mais – Hersteller 2	2,7	$G_{EH} = 6$
Soßenbinder (Stärke, Milchezucker, Reismehl, Maltodextrin)	2,9	$G_{EH} = 6-12$
Pfeilwurzelsstärke	1,7	$G_{EH} = 3$

Auch diese Untersuchungsserie ergab ähnlich hohe Induktionsraten für die Stärke-Proben. Aufgrund der Erkenntnisse zu den Stärke-Arten, in denen eine Zearalenon-Kontamination möglich ist, und der großen Zahl an untersuchten Proben, die eine hohe IR im R-YEA

aufweisen, ist eher davon auszugehen, dass durch die spezifischen Eigenschaften der Stärke-Proben, vor allem durch die Trübung und die hohe Viskosität der R-YEA-Test hier keine belastbaren Ergebnisse liefert.

Um die Durchführung des Testes an die Spezifik der Proben anzupassen, sind durch die Fa. INCOS BOTÈ verschiedene Varianten getestet worden. So wurden unter anderem, zusätzlich zu dem vorgeschriebenen Testablauf, für die Bestimmungen der optischen Dichte bei 600 nm und bei 420 nm probenabhängige Blindwerte ermittelt. Den Einfluss dieser zusätzlichen Blindwerte auf das Testergebnis zeigt **Tab. 48**. Für diese Untersuchungen wurde eine oxidierte Kartoffelstärke (anionisch) als 1 %ige Lösung verwendet, die in den bisherigen Tests eine IR von 1,5 bzw. 2,5 bei der Wiederholungsmessung aufwies.

Tab. 48: Ergebnisse R-YEA-Test (Probe: Oxidierte Kartoffelstärke, anionisch) mit Berücksichtigung probenabhängiger Blindwerte

	Blindwert	OD 600	%-Zellen	OD 420	Blindwert	Aktivität	IR	G_{EH}
Negativkontrolle	0,059	0,470	100	0,259	0,075	448	1,00	NK
G _{EH} = 3	0,200	0,513	109	0,348	0,173	399	0,89	3
G _{EH} = 6	0,200	0,522	111	0,259	0,131	287	0,64	6
G _{EH} = 12	0,200	0,471	100	0,241	0,098	361	0,81	12
G _{EH} = 24	0,200	0,523	111	0,275	0,091	405	0,90	24
G _{EH} = 48	0,200	0,478	102	0,259	0,080	440	0,98	48
PK 15 ng/l	0,059	0,406	86	0,514	0,075	1184	2,65	PK 15
PK 30 ng/l	0,059	0,438	93	0,914	0,075	2273	5,08	PK 30

Unter Berücksichtigung dieser Verfahrensänderung sind die ermittelten Induktionsraten in allen Verdünnungsstufen bei < 1,0. Die Probe wäre damit als östrogen nicht wirksam einzustufen. Nach diesem Auswertungsalgorithmus sind weitere bereits untersuchte Proben ein weiteres Mal getestet worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Tab. 49** zusammengefasst.

Tab. 49: Ergebnisse R-YEA-Test mit Berücksichtigung probenabhängiger Blindwerte für weitere Stärke-Proben

Probe	IR ohne BW	IR mit BW G_{EH}=1,5	IR mit BW G_{EH}=3	IR mit BW G_{EH}=6
Native Weizenstärke	2,2	1,10	1,00	0,74
Native Kartoffelstärke	4,1	1,68	1,54	1,30
Oxid. Kartoffelstärke, anionisch	2,5	0,98	0,89	0,64
LM-Stärke (Feine Maisstärke), Hersteller 1	3,8	2,41	1,51	1,41
LM-Stärke (Feine Maisstärke), Hersteller 2	2,7	2,02	1,74	1,44
Soßenbinder (Stärke, Milchezucker, Reismehl, Maltodextrin)	2,9	1,41	1,01	1,00
Pfeilwurzelstärke	1,7	1,05	1,00	0,97

Nach Korrektur der Messdaten um die zusätzlich ermittelten probenabhängigen Blindwerte ergibt sich bei einigen Proben eine Induktionsrate $< 1,5$, bei anderen dagegen ist trotz der Korrektur in der unverdünnten Probe eine deutliche östrogene Wirkung messbar. Inwieweit es sich hier um weitere probenspezifische Faktoren handelt, die Einfluss auf das Messergebnis haben, kann nicht endgültig festgestellt werden.

Die bisher untersuchten Proben wurden auf der Grundlage einer worst case-Abschätzung zur Stärke-Konzentration im Zulauf zur ARA hergestellt. Stärke wird unter den Bedingungen der biologischen Abwasserreinigung sehr gut abgebaut. Die Ablaufkonzentrationen sollten daher wesentlich geringer sein. Daher wurden die in Tab. 46 untersuchten 9 Stärke-Produkte, die in unterschiedlichen Mengen und Applikationen in der Papierindustrie Verwendung finden, in einer Konzentration von 100 mg pro Liter Wasser (entspricht 100facher Verdünnung der bisher untersuchten Proben) noch einmal getestet. Die Ergebnisse sind in **Tab. 50** ersichtlich.

Tab. 50: Ergebnisse R-YEA-Test Industriestärken 100 mg/l

Probenummer	Art der untersuchten Stärke	Hersteller	IR in Verdünnungsstufe 1,5
Erste Untersuchungsserie			
1	Native Weizenstärke, Werk L	1	0,9
2	Native Weizenstärke, Werk L	2	1,0
3	Native Weizenstärke, Werk L	3	0,9
Zweite Untersuchungsserie			
4	Kartoffelstärke, kationisch	4	1,1
5	Oxidierte Kartoffelstärke, anionisch	4	1,1
6	Native Kartoffelstärke	4	1,0
7	Kartoffelstärke, kationisch	5	1,2
8	Maisstärke, anionisch	5	0,8
9	Native Weizenstärke	5	1,0

Keine der Stärke-Proben zeigt in der Konzentration von 100 mg/l eine östrogene Wirkung. Die Konzentrationen in den Abläufen der ARA sind in Abhängigkeit von den eingesetzten AP-Sorten, der hergestellten Papiersorte, dem Stärke-Einsatz in der Fabrik und der Konfiguration der verschiedenen Stufen der biologischen Abwasserreinigung noch wesentlich geringer. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die im Ablauf der ARA möglicherweise noch vorhandenen Restmengen unterschiedlicher Stärke-Produkte keine östrogen Wirkung ergeben.

Additivmischungen

Da in der Literatur immer wieder Hinweise gegeben werden, dass sich die Wirkung einzelner endokrin aktiver Stoffe gegenseitig verstärken kann (additiv oder sogar exponentiell) wurden zum Abschluss dieses Arbeitspaketes auch Mischungen der Additive der Werke D, E und L hergestellt. Dazu wurden die chemischen Additive eines Werkes nacheinander jeweils in der berechneten Endkonzentration im biologisch gereinigten Abwasser in einen 1 l-Messkolben gegeben und dieser hinterher mit Leitungswasser auf 1 l Probe aufgefüllt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den **Tab. 51** bis **Tab. 53** zu entnehmen.

Tab. 51: Ergebnisse R-YEA-Test Additivmischung Werk D

	NK	48	24	12	6	3	1,5	15 PK	30 PK
β-gal/zellld.	321	305	322	335	379	356	350	967	2181
+/-	38	30,8	25,4	32,0	72,4	58,4	41,8	46,0	420,3
+/- in %	11,8	10,1	7,9	9,5	18,4	15,4	12,0	4,8	19,3
Induktionsrate	1,0	0,9	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	3,0	5,9
%-Zellen	100,0	100,7	103,1	101,2	96,8	96,2	94,6	96,7	101,2
OD (595 nm)	0,561	0,565	0,578	0,567	0,542	0,535	0,532	0,499	0,522
+/-	0,013	0,007	0,015	0,013	0,028	0,007	0,032	0,003	0,025
OD (405 nm)	0,225	0,220	0,234	0,232	0,243	0,231	0,228	0,558	1,107
+/-	0,017	0,012	0,011	0,014	0,023	0,021	0,020	0,032	0,169

Tab. 52: Ergebnisse R-YEA-Test Additivmischung Werk E

	NK	48	24	12	6	3	1,5	15 PK	30 PK
β-gal/zellld.	511	532	538	511	563	428	355	1161	2921
+/-	214	52,5	175,2	54,1	168,4	69,6	34,2	97,7	218,5
+/- in %	41,9	9,9	32,5	10,6	30,4	16,3	9,7	8,2	7,8
Induktionsrate	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	0,9	0,9	2,3	5,8
%-Zellen	100,0	114,2	112,0	112,7	115,1	113,9	110,4	97,2	102,8
OD (595 nm)	0,342	0,390	0,382	0,385	0,393	0,389	0,377	0,332	0,351
+/-	0,048	0,012	0,021	0,013	0,023	0,015	0,014	0,001	0,015
OD (405 nm)	0,212	0,242	0,250	0,241	0,262	0,221	0,195	0,410	0,959
+/-	0,044	0,016	0,067	0,017	0,066	0,025	0,022	0,030	0,119

Tab. 53: Ergebnisse R-YEA-Test Additivmischung Werk L

	NK	48	24	12	6	3	1,5	15 PK	30 PK
β-gal/zellld.	452	355	371	406	380	376	448	1066	1935
+/-	114	29,8	30,5	55,3	90,2	46,6	44,2	92,7	58,5
+/- in %	25,3	8,4	8,5	13,6	23,7	12,4	9,9	8,6	2,9
Induktionsrate	1,0	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	1,0	2,3	5,5
%-Zellen	100,0	105,8	111,6	123,4	102,3	102,9	96,3	92,5	97,2
OD (595 nm)	0,447	0,473	0,499	0,552	0,457	0,460	0,422	0,481	0,505
+/-	0,015	0,023	0,031	0,023	0,228	0,244	0,171	0,011	0,026
OD (405 nm)	0,249	0,226	0,228	0,244	0,221	0,229	0,256	0,603	0,978
+/-	0,042	0,009	0,021	0,021	0,047	0,048	0,042	0,038	0,011

In keinem der drei untersuchten Werke ist eine endokrine Wirkung der Additivmischung ermittelt worden. Auch eine zytotoxische Wirkung und eine antiöstrogene Wirkung ($IR < 0,7$) wurde weder in den Additivmischungen noch in den Einzelproben gemessen. Es kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die untersuchten chemischen Additive in diesen Werken nicht die Ursache für die im R-YEA-Test gemessene endokrine Wirkung der biologisch gereinigten Abwässer sind.

3.4 Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von Faserstoffen (Primär- und Sekundärfaserstoffen)

Ein wichtiger Eintragspfad für potenziell endokrin wirksame Stoffe in den Prozess der Papierherstellung stellen die Faserstoffe dar. Die bisherigen Untersuchungen in den Abschnitten 3.1 bis 3.3 haben ergeben, dass weder die für die Produktion eingesetzte Rohwässer noch die chemischen Additive einen nennenswerten Beitrag zur endokrinen Wirkung des Abwassers leisten. Daher ist die Frage zu klären, inwieweit durch die Faserstoffe möglicherweise Phytohormone oder, im Falle von Altpapieren, auch Chemikalien aus der Papierverarbeitung, der Bedruckung, der Verklebung, der Beschichtung und ähnliches, einen Einfluss auf das endokrine Potenzial der wässrigen Probe haben.

Für diese Untersuchung sind insgesamt 24 verschiedene Holzstoffe und Altpapiersorten nach Standard-Desintegration (Probenvorbereitung siehe Abschnitt 2.3.1.2) und Filtration mittels R-YEA getestet worden. Die Ergebnisse sind in **Tab. 54** zusammengefasst. Auf die Untersuchung von Marktzellstoffen wurde verzichtet, da sich diese Faserstoffe in zahlreichen früheren Untersuchungen mit dem R-YEA-Test als nicht endokrin wirksam erwiesen haben.

Tab. 54: Untersuchung von Papierextrakten - Ergebnisse R-YEA-Test

Probe	IR bei $G_{EH} = 1,5$	Bemerkung
<i>Holzstoffe</i>		
TMP, Probe 1, Werk K, ungebleicht	0,4	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
TMP, Probe 1, Werk K, gebleicht	0,6	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
TMP, Probe 2, Werk K, ungebleicht	0,5	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
TMP, Probe 2, Werk K, gebleicht	0,6	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
Holzschliff, Probe 1, Werk a, ungebleicht	0,7	Keine östrogene Wirkung
Holzschliff, Probe 1, Werk a, gebleicht	0,6	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
Holzschliff, Probe 2, Werk a, ungebleicht	0,6	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
Holzschliff, Probe 2, Werk a, gebleicht	0,4	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
<i>Altpapiere (Einzelproben)</i>		
Schreibpapier, gestrichen, 100 % Zellstoff, 80 g/m ²	1,1	Keine östrogene Wirkung
Zeitungsdruckpapier, 100 % AP	0,8	Keine östrogene Wirkung
Telefonbuchpapier, 100 % AP	0,9	Keine östrogene Wirkung
Gestrichenes Rollendruckpapier, 100 % AP	1,1	Keine östrogene Wirkung
Farbiges Büropapier, gemischt, 80 g/m ² , holzfrei	1,2	Keine östrogene Wirkung
Recyclingpapier, 100 % AP, 80 g/m ²	1,1	Keine östrogene Wirkung
Tissue-Papier, weiß, 100 % Zellstoff	0,8	Keine östrogene Wirkung

<i>Altpapiere (Altpapiersorten von Papierfabriken)</i>		
AP 1.02: Mischpapier, Werk L, Probe 1	1,2	Keine östrogene Wirkung
AP 1.02: Mischpapier, Werk L, Probe 2	1,0	Keine östrogene Wirkung
AP 1.04: Kaufhausaltpapier, Werk L, Probe 1	2,9	Stark östrogene Wirkung
AP 1.04: Kaufhausaltpapier, Werk L, Probe 2	2,1	Stark östrogene Wirkung
AP 1.02: Mischpapier, Werk E, Probe 1	1,0	Keine östrogene Wirkung
AP 1.04: Kaufhausaltpapier, Werk E, Probe 1	0,9	Keine östrogene Wirkung
AP 1.04: Kaufhausaltpapier, Werk E, Probe 2	1,3	Keine östrogene Wirkung
AP 2.05 Sort. Büroaltpapier, Werk E	1,2	Keine östrogene Wirkung
AP 2.06 Bunte Akten, Werk E	1,1	Keine östrogene Wirkung

Die Ergebnisse fallen für die Holzstoffe und für die Altpapiere sehr unterschiedlich aus. Für sämtliche Holzschliff- und TMP-Proben sind die IR im R-YEA-Test deutlich kleiner als 1,0. Dies gilt sowohl für die gebleichten, als auch für die ungebleichten Proben. Die Wirkung dieser Proben im Test kann nicht mehr mit „keine östrogene Wirkung“ beschrieben werden. Induktionsraten $< 0,7$, also geringere Werte als die der Negativkontrolle, bedeuten eine antiöstrogene Wirkung. Vergleichbare Ergebnisse für die Untersuchung von Holzstoffen im R-YEA-Test wurden auch bereits in [11] beschrieben. Welche Stoffe letztlich für diese antiöstrogene Wirkung verantwortlich sind und wo diese Stoffe verbleiben, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht detailliert untersucht werden.

Demgegenüber zeigen die Altpapiere zum ganz überwiegenden Teil mit Induktionsraten zwischen 0,8 und 1,3 keine östrogene Wirkung. Zwei der untersuchten Kaufhausaltpapierproben, die aus dem AP-Eingang im Werk L entnommen wurden, weisen dagegen eine deutliche endokrine Wirkung auf. Diese Ergebnisse wurden nach Wiederholung des R-YEA-Testes mit den Rückstellproben bestätigt. Auch hier konnten keine eindeutigen Ursachen für die endokrine Wirkung ermittelt werden. Die Frage, inwieweit der höhere Stärkeanteil in den Kaufhausaltpapieren (hoher Anteil an Wellpappenverpackungen) ursächlich sein könnte, ist durch die Untersuchungen von Stärke-Proben mit dem R-YEA-Test (siehe Abschnitt 3.3.2) nicht eindeutig zu beantworten.

3.5 Untersuchungen zur endokrinen Wirkung und Inhaltsstoffen von Papieren

Auf der Grundlage der Erkenntnisse von Vinggaard et al. [2] sowie Gehring et al. [3,4,5] besteht die Frage, ob aufgrund der Inhaltsstoffe in Papieren und der in einigen ARA-Abläufen gemessenen östrogenen Wirkung im Abwasser nicht auch die Extrakte von Papieren, insbesondere von Papieren auf Altpapier- und/oder Holzstoffbasis, östrogen wirksam sein können. Daher wurden sowohl die östrogene Wirkung von Kaltwasserextrakten von Papieren als auch einzelne Inhaltsstoffe in Papieren mittels Thermodesorption-GC/MS untersucht.

3.5.1 Untersuchungen mittels R-YEA

Wie in Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben, wurden aus verschiedenen Papieren Kaltwasserextrakte hergestellt und diese mittels R-YEA auf ihre endokrine Wirkung untersucht. Insgesamt wurden 25 verschiedene Papiere aller Papiersorten, sowohl Frischfaser-, als auch altpapierhaltige Papiere untersucht. In **Tab. 55** sind die Ergebnisse des R-YEA-Tests zusammengefasst.

Tab. 55: Untersuchung von Papierextrakten - Ergebnisse R-YEA-Test

Probe	IR bei $G_{EH} = 1,5$	Bemerkung
<i>Verpackungspapiere</i>		
Wellpappenrohpaper 90 g/m ² , Werk L (5 g/250 ml)	0,9	Keine östrogene Wirkung
Wellpappenrohpaper 90 g/m ² , Werk L (10 g/250 ml)	0,8	Keine östrogene Wirkung
Wellpappenrohpaper 110 g/m ² , Werk L (5 g/250 ml)	1,0	Keine östrogene Wirkung
Wellpappenrohpaper 110 g/m ² , Werk L (10 g/250 ml)	0,3	IR erniedrigt gegenüber NK, antiöstrogen
Wellpappenkarton 1	0,7	Keine östrogene Wirkung
Wellpappenkarton 2	1,1	Keine östrogene Wirkung
Eierkarton, Israel, 100 % AP	1,2	Keine östrogene Wirkung
Eierkarton, Finnland, 80 % AP	0,9	Keine östrogene Wirkung
Graukarton, Deutschland, 100 % AP, geschlossener Wasserkreislauf	0,7	Keine östrogene Wirkung
Duplexkarton, Deutschland, 100 % AP, geschlossener Wasserkreislauf	1,1	Keine östrogene Wirkung
Faltschachtelkarton 1, 70 % AP	0,9	Keine östrogene Wirkung
Faltschachtelkarton 2, 80 % AP	1,0	Keine östrogene Wirkung
<i>Grafische Papiere</i>		
Schreibpapier, gestrichen, 100 % Zellstoff, 80 g/m ²	1,1	Keine östrogene Wirkung
Zeitungsdruckpapier, 100 % AP	0,7	Keine östrogene Wirkung
Telefonbuchpapier, 100 % AP	0,9	Keine östrogene Wirkung
Gestrichenes Rollendruckpapier, 100 % AP	1,1	Keine östrogene Wirkung
Farbiges Büropapier, gemischt, 80 g/m ² , holzfrei	1,2	Keine östrogene Wirkung
Recyclingpapier, 100 % AP, 80 g/m ²	1,1	Keine östrogene Wirkung

<i>Tissue-Papiere</i>		
Tissue-Papier, weiß, 100 % Zellstoff	0,8	Keine östrogene Wirkung
Grüne Papierhandtücher, 100 % AP	1,1	Keine östrogene Wirkung
Toilettenpapier, weiß, 100 % AP, Hersteller 1	0,8	Keine östrogene Wirkung
Toilettenpapier, weiß, 100 % AP, Hersteller 2	1,0	Keine östrogene Wirkung
Papiertaschentücher, bunt, 100 % Zellstoff	0,9	Keine östrogene Wirkung
Industriereinigungstücher, grau, 100 % AP	0,9	Keine östrogene Wirkung
Servietten, gelb, 100 % AP	1,2	Keine östrogene Wirkung

Alle untersuchten Papiere sind östrogen nicht wirksam, die Induktionsraten liegen deutlich unterhalb von 1,5. In einem Wellpappenrohpaper ist eine IR von 0,3 gemessen worden, die auf eine antiöstrogene Wirkung schließen lassen könnte. Da allerdings aus dieser Papierfabrik weitere, sehr ähnlich zusammengesetzte Papiere mit einer IR um 1,0 getestet worden sind, handelt es sich hier möglicherweise um einen Ausreißer.

3.5.2 Einzelstoff-Untersuchungen mittels Thermodesorption-GC/MS

Im vorliegenden Projekt sind insgesamt 12 verschiedene AP haltige Papiere mittels Thermodesorption-GC/MS auf flüchtige Substanzen nach den Vorschriften der RAL-UZ 14 untersucht worden (siehe Abschnitt 2.3.4.3). In **Abb. 36** sind exemplarisch die Chromatogramme von drei Papierproben dargestellt. Durch Auswertung der Massenspektren der einzelnen Peaks ist die Identifizierung der einzelnen Stoffe in vielen Fällen eindeutig möglich. Für die in **Abb. 36** dargestellten Proben sind ausgewählte Ergebnisse der Einzelstoff-Identifizierung in den **Tab. 56** bis **Tab. 58** angegeben.

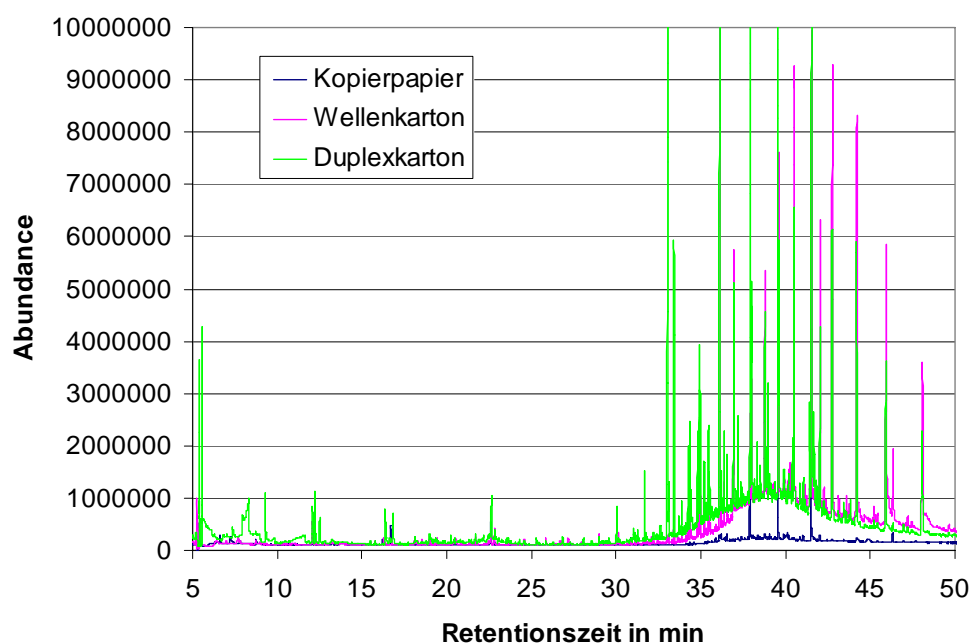


Abb. 36: Chromatogramme von drei Papiermustern nach Thermodesorption-GC/MS nach RAL-UZ 14

Tab. 56: Einzelstoff-Identifizierung Kopierpapier

RT in min	Substanz	RT in min	Substanz
4,34	Kohlendioxid	25,86	Decanal
4,67	2-Methyl-1-propen	30,89	Alkyl. Undecadienon
6,43	Trimethylamin	31,13	Butoxyethoxyethanol
6,61	Ameisensäure	34,13	Cyclotetradecan
7,24	Hydroxyacetaldehyd	34,59	Tetradecyloxiran
8,73	1-Hydroxypropanon	36,09 u. a.	Phthalat
12,09	Hexanal	36,17 u. a.	Eicosan
16,23	2 (5H) Furanon	36,21	1-Hexadecanol
16,30	Butyrolacton	37,40	Tetradecadien
16,71	2-Hydroxycyclo-pentenon	37,89	3-Eicosen

Tab. 57: Einzelstoff-Identifizierung Wellenkarton

RT in min	Substanz	RT in min	Substanz
4,37	Kohlendioxid	28,99	Chloranilin
4,49	Ethylendiamin	30,13	Vanillin
4,71	Acetaldehyd	32,08	p-(Methylsulfonyl)toluol
5,20	Aceton	33,11	Hexadecan
7,71	Essigsäure	33,65	Tributylphosphat
12,09	Hexanal	33,84	Benzophenon
16,28	2 (5H) Furanon	34,13	Cyclotetradecan
18,12	Benzaldehyd	34,25 u. a.	Diisopropyl-naphthalin
20,52	Benzyalkohol	35,32 u. a.	Biphenyl-derivate
21,69	Acetophenon	35,45	Pentadecan
22,82	Nonanal	36,12 u. a.	Phthalate
25,86	Decanal	37,19	Hexadecan

Tab. 58: Einzelstoff-Identifizierung Duplexkarton

RT in min	Substanz	RT in min	Substanz
4,37	Kohlendioxid	24,58	2-Nonenal
5,39	Essigsäure	25,86	Decanal
9,05	1-Hydroxy-2-propanon	28,08	Tridecan
9,43	Propionsäure	28,99	Dichloranilin
12,35	2,3-Butandiol	29,58	2,6,10-Trimethyldodecan
13,24	3-Furaldehyd	30,04	Tetradecan
15,07	2-Cyclopenten-1,4-dion	30,14	Vanillin
16,29	2 (5H) Furanon	32,56	Trichloranilin
16,76	Cyclohexanon	33,11	Hexadecan
18,13	Benzaldehyd	33,85	Benzophenon
18,99	2-Pentylfuran	34,25 u. a.	Diisopropyl-naphthalin
20,24	2-Ethyl-1-hexanol	34,38	Pentadecan
21,69	Acetophenon	35,34	4-Methylbenzophenon
22,03	6-Dodecen	36,12 u. a.	Phthalate

Die in den einzelnen Papieren nachweisbaren Stoffe sind in ihrer Menge und Zusammensetzung nicht identisch. Dennoch können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Ein großer Teil der in den Chromatogrammen nach Thermodesorption der Papiere identifizierten Stoffe sind Alkane, Alkene, Cycloalkane, aliphatische und aromatische Aldehyde und Ketone, die zum Teil aus dem eingesetzten Altpapier stammen, zum anderen Teil als Naturstoffe vorkommen und durch den Ausgangsstoff Holz in den Faserverbund gelangen.
- In keiner der untersuchten Papierproben sind endokrin wirksame Stoffe in relevanten Konzentrationen identifiziert worden. Alle Proben emittieren Spuren einiger weniger Phthalate, die aus dem eingesetzten Altpapier resultieren. Einige Phthalate sind schwach östrogen wirksam. Durch die schwache Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor können sie allerdings im R-YEA-Test in diesen Konzentrationen keine östrogene Wirkung hervorrufen.
- Die Ergebnisse der Einzelstoff-Analyse stimmen mit den Ergebnissen des R-YEA-Testes gut überein, da für alle untersuchten Papiere im Kaltwasserextrakt keine endokrine Wirkung festgestellt wurde.

4 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen

Die Forschungsergebnisse sollen kleine und mittlere Unternehmen in dem Bestreben unterstützen, ihrer Produktverantwortung gerecht zu werden und ihren Produktionsprozess nachhaltig und Ressourcen schonend zu gestalten. Im Rahmen des vorliegenden Projekts konnte erstmals ein umfassender Überblick über das endokrine Potenzial von Rohstoffen, Produkten und Abwässern der Papierindustrie gegeben werden. Aufgrund der komplexen Aufgabenstellung, die sowohl Kenntnisse und Erfahrungen aus den Bereichen Papieringenieurwesen, Abwasserreinigung, Chemie, Biologie und Toxikologie als auch kostenintensive Messungen zur Beurteilung der Auswirkungen erfordert, ist es vor allem für die kmU nicht möglich, diese Thematik unternehmensintern zu bearbeiten. Der dadurch entstehende Wettbewerbsnachteil, der sich insbesondere im Verhältnis zu den weltweit organisierten Konzernen mit ihren eigenen Forschungsabteilungen darstellt, kann nur durch gemeinsame werksübergreifende Forschungsarbeiten kompensiert werden.

4.1 Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse

Entsprechend den vorgegebenen Kriterien sind die angestrebten Forschungsergebnisse vorwiegend den Fachgebieten Umwelttechnik und Verfahrenstechnik zuzuordnen. Darüber hinaus ist eine Nutzung auch in den Fachgebieten Rohstoffe und Chemie möglich. Von den Ergebnissen wird in erster Linie der Wirtschaftszweig „Papier-, Verlags- und Druckgewerbe“ profitieren.

Die Forschungsergebnisse können vor allem von den in den jeweiligen Arbeitspaketen in die Untersuchung einbezogenen Papierfabriken direkt und unmittelbar genutzt werden. Ihnen werden durch die Ergebnisse der Analysen von Ausgangsstoffen, Papierproben, Proben aus den unterschiedlichen Stufen der Abwasseraufbereitung und den Abläufen in die Oberflächengewässer oder Kanalsysteme direkt Daten zur Verfügung gestellt, die es ihnen

erlauben, ihre Produkte und ihren Produktionsprozess bezüglich der Wirkungen endokriner Substanzen zu beurteilen.

Aufgrund der Vielzahl der beprobten Fabriken mit ihren vielfältigen Ausgangsstoffen (Faserrohstoffen, chemischen Additiven, Brauchwasser), Papierprodukten und Abwasseraufbereitungstechnologien ist es im Ergebnis des Forschungsprojektes möglich, einen Überblick über den derzeitigen Stand des Wissens zu endokrin wirksamen Substanzen in der Papierindustrie in Deutschland einschließlich der möglichen Quellen und Senken dieser Stoffe im Prozess zu geben.

Die Untersuchungen in diesem Projekt haben gezeigt, dass sowohl die chemischen Additive der Papierherstellung, als auch die hergestellten Papierprodukte keine endokrine Wirkung im *in vitro*-Test aufweisen und daher nachzeitigem Kenntnisstand für die Beschäftigten in der Papiererzeugung und insbesondere für die Verbraucher der Papiere kein gesundheitliches Risiko darstellen. In den *in vivo*-Untersuchungen der gereinigten Papierfabriksabwässer wurde keine endokrine Wirkung auf aquatische Organismen (*Danio rerio*) festgestellt.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde eine hochempfindliche Analysenmethode zur Bestimmung von mittel- bis unpolaren Abwasserinhaltsstoffen und von Stoffen, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, entwickelt. Diese Analysenmethode, die auf der Stir Bar Sorptive Extraction mit PDMS- und Acrylat-Twistern beruht, wurde erstmals in Abwässern der Papierindustrie getestet. Durch Nutzung dieser Untersuchungsmethode können Papierhersteller künftig die Qualität und Reinheit ihrer Roh-, Prozess- und Abwässer untersuchen. Auch die gezielte Bestimmung von kritischen Inhaltsstoffen und von Stoffen, die den Produktionsablauf beeinträchtigen können, wird dadurch möglich.

Da die im Rahmen dieses Forschungsprojektes erarbeiteten Ergebnisse für jede Papierfabrik unter Berücksichtigung der eingesetzten Rohstoffe, der Verfahrensstufen zur Altpapieraufbereitung und Papierherstellung, des Wassermanagements und der Technologie der Abwasseraufbereitung angepasst werden müssen, bieten das Vorhaben auch Potenzial für Beratungsunternehmen, Ingenieurbüros und Laboratorien.

4.2 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Vorgaben zur Abwasserqualität bezüglich des Gehaltes an endokrin wirksamen Substanzen sind (noch) nicht in die Umweltgesetzgebung auf EU-, Bundes- und Landesebene eingegangen. Einige der möglicherweise endokrin wirksamen Stoffe sind Bestandteile der aktuellen Liste der prioritären Stoffe des Anhanges X der EU-Wasserrahmenrichtlinie und müssen zumindest mittel- bis langfristig in den aquatischen Systemen in ihrer Konzentration deutlich verringert werden. Entsprechende Maßnahmen zur Umsetzung dieser Forderung für die Einleitung von Abwässern einzelner Industriebetriebe sind in Vorbereitung. Aufgrund der Komplexität dieser interdisziplinären Fragestellung ist es für KMU unmöglich, mit vertretbarem Aufwand und im angemessenen Zeitrahmen Strategien zur Reduzierung bzw. Vermeidung endokrin wirksamer Substanzen durch optimale Betriebsführung ihrer Abwasserbehandlungsanlage zu entwickeln.

Die bereits heute bestehende Produktverantwortung der Hersteller für die im Unternehmen hergestellten Erzeugnisse wird sich in Zukunft im Zuge der Umsetzung der Novellierung der europäischen Chemikalienpolitik (REACH-Verordnung) weiter verschärfen. Grundlegende Kenntnisse des Anlagenbetreibers über Inhaltsstoffe seiner Produkte und deren Wirkungen auf die menschliche Gesundheit sowie über mögliche Umweltauswirkungen seiner Produktion sind in Zukunft unerlässlich, aber gerade für KMU häufig schwierig und nur kostenintensiv zu beschaffen. Auch in diesem Punkt soll das vorliegende Projekt die KMU der Papierindustrie unterstützen.

Für die Wettbewerbsfähigkeit der KMU der deutschen Papierindustrie ist es außerdem von enormer Bedeutung, ihre Absatzmärkte insbesondere in der Konkurrenz zu anderen Materialien und Werkstoffen zu sichern und auszubauen. Insbesondere auf dem Gebiet der Verpackungsmaterialien muss sich das Papier gegenüber anderen Materialien, vor allem Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol und anderen Kunststoffen, behaupten. Durch die hohe Altpapiereinsatzquote in den Papierfabriken in Deutschland, die in erhöhtem Maße zur Ressourcenschonung bei der Papierherstellung beiträgt, besteht bei einigen Kunden der Verdacht, dass sich kritische Stoffe im Altpapier anreichern könnten und daher zu einem Qualitäts- und/oder Gesundheitsrisiko beim Gebrauch von Recyclingpapierprodukten führen. Neben anderen Projekten, die von der Forschungsstelle in diesem Zusammenhang im Auftrag des Verbandes Deutscher Papierfabriken e. V. (VDP) durchgeführt wurden und werden, soll auch dieses Projekt durch gezielte Forschungsarbeiten und Untersuchungen der endokrinen Wirkung von Papierprodukten auf Primär- und Altpapierbasis zu einer Versachlichung der oft kontrovers geführten Diskussion beitragen.

5 Veröffentlichungen und Vorträge, Ergebnistransfer

Auf folgenden internationalen Vortragsveranstaltungen wurden Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens präsentiert (alle Veranstaltungen mit entsprechenden schriftlichen Tagungsbänden):

- Kersten, A.; Öller, H.-J.:
Endokrine Substanzen-noch ein Thema? In: Von der Gewinnung und dem Umgang mit Analysedaten zur Problemlösung (2008). S. 9.1 - 9.14
- Hamm, U.; Kersten, A.; Öller, H.-J.:
Neue Erkenntnisse zu endokrinen Wirkungen in Papierfabrikationsabwässern. In: Betrieb biologischer Abwasserreinigungsanlagen – Anaerobtechnologie und Betrieb von Anaerobanlagen (2008), S. 10.1 – 10.9

Eine Gesamtübersicht über die Forschungsergebnisse wird der gesamten Branche und anderen Untersuchungsstellen, die sich mit der Thematik Abwasserreinigung beschäftigen, am 10./11.11.2009 anlässlich des PTS-Wasser- und Umweltsymposiums in München vorgestellt. Der Vortrag der Autoren Antje Kersten und Dr. Udo Hamm unter dem Titel „Endokrine Wirkung von Papierfabriksabwässern – Gibt es Entwarnung?“ ist von den Veranstaltern bereits bestätigt worden.

Darüber hinaus wurden erste Untersuchungsergebnisse in folgender Veröffentlichung vorgestellt:

Schabel, S.; Hamm, U.:

Comparison of the endocrine effects of treated wastewaters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells. *Water Science and Technology* 55 (2007) 6, S. 213 – 221.

Die Ergebnisse des vorliegenden Forschungsprojekts sind durch die Projektleiterin direkt in die Erarbeitung des DWA-Merkblattes M 731 „Abwasser und Abfälle aus der Papierherstellung“ eingeflossen, das bei der Sitzung des Fachausschusses IG 2 der DWA am 10.11.2009 abschließend beraten wird. Dieses Merkblatt wird nach dem endgültigen Beschluss der DWA allen interessierten Unternehmen, Verbänden und Einzelpersonen zugänglich sein.

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens wurden außerdem seit 2006 einmal jährlich dem wissenschaftlichen Beirat des Verbandes Deutscher Papierfabriken e. V. (VDP) im Rahmen der turnusmäßig stattfindenden Informationsveranstaltung („AiF-Tag“) präsentiert. Den Mitgliedern des VDP (derzeit 102 Unternehmen, die ca. 90 % des Umsatzes der deutschen Papierindustrie repräsentieren) wurde in der jährlich erscheinenden VDP-Forschungsreportübersicht bereits während der Bearbeitung des Projekts Einblick in Zielstellung und Zwischenergebnisse gegeben. Nach Abschluss des Projektes werden die Ergebnisse (Schlussbericht) über die Homepage des VDP publiziert, so dass alle Mitgliedsunternehmen dieses Industrieverbandes Zugriff auf die Ergebnisse haben.

Die Mitarbeiter der IfP-gGmbH und des PMV der TU Darmstadt werden, wie bereits in der Vergangenheit praktiziert, durch die Mitwirkung in zahlreichen branchenspezifischen Arbeitskreisen laufend über die Ergebnisse ihrer Forschungstätigkeiten berichten (z. B. VDP-Ausschuss Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände, Zellcheming-Fachausschüsse und -Unterausschüsse, Akademischer Papieringenieurverein Darmstadt). Der Abschlussbericht dieses Vorhabens wird in die Technische Informationsbibliothek (TIB) der TU Hannover und der branchenspezifischen Bibliothek des PMV der TU Darmstadt eingestellt und ist damit für die gesamte Fachwelt zugänglich. Durch die enge Verknüpfung von Forschung und Lehre am PMV der TU Darmstadt ist gewährleistet, dass die Forschungsergebnisse unmittelbar und zeitnah in die akademische Lehre und die praktische Ausbildung der Studierenden der Fachrichtung Papieringenieurwesen an der TU Darmstadt einfließen.

6 Danksagung

Das Forschungsvorhaben (AiF 15181 N) wurde aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) gefördert. Dafür sei an dieser Stelle gedankt. Unser Dank gilt weiterhin den Projektbegleitern aus der Industrie und allen weiteren Vertretern der untersuchten Papierfabriken für ihre Unterstützung.

7 Literatur

- 1 Borton, D. L.; Hall, T. J.; Fisher, R. P.; Thomas, J. F. (Hrsg.);
Pulp & Paper Mill Effluent Environmental Fate & Effects; DEStech Publications, Inc.,
Lancaster, 2004, 578 S.
- 2 Vinggaard, A. M.; Körner, W.; Lund, K. H.; Bolz, U.; Petersen, J. H.;
Identification and Quantification of Estrogenic Compounds in Recycled and Virgin Paper For
Household Use as Determined by an in Vitro Yeast Estrogen Screen and Chemical Analysis;
Chem. Res. Toxicol. (13) 2000, pp. 1214-1222
- 3 Gehring, M. et al.;
Altpapier und Kunststoffe als Quellen für Bisphenol A im kommunalen Klärschlamm.
In: Bilitewski, B.; Werner, P. (Hrsg.): Endokrin wirksame Substanzen in Abwasser und
Klärschlamm. Workshop am 22./23.04.2002 in Dresden, Schriftenreihe des Institutes
für Abfallwirtschaft und Altlasten der TU Dresden, S. 160-171
- 4 Gehring, M.; Tennhardt, L.; Vogel, D.; Weltin, D.; Bilitewski, B.;
Altpapier als Quelle für hormonell wirksame Schadstoffe in Abwasser und Klärschlamm;
Müll und Abfall 1/2005, S. 33 - 38
- 5 Gehring, M. et al.;
Belastung von Recycling-Toilettenpapier aus verschiedenen Ländern mit 2,4,7,9-Tetramethyl-
5-decin-4,7-diol (TMDD) und den endokrin aktiven Stoffen Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol,
technischem 4-Nonylphenol und Pentachlorphenol.
In: Bilitewski, B. et al. (Hrsg.): Endokrin wirksame Substanzen in Abwasser, Klärschlamm und
Abfällen. Tagungsband zum 4. Dresdner Symposium am 25.03.2009, Beiträge zu Abfallwirt-
schaft / Altlasten der TU Dresden, S. 91 - 105
- 6 European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection,
European Union Risk Assessment Report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol,
Final report, United Kingdom, 2002
- 7 European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection,
European Union Risk Assessment Report: 4, 4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A),
Final report, United Kingdom, 2003
- 8 N. N.;
Risk Assessment of Bisphenol-A; Update of assessment for thermal paper recycling,
United Kingdom, February 2005
- 9 Hamm, U.; Öller, H.-J.;
Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie. Abschlussbericht zum
INFOR-Projekt 45. Darmstadt/München 2004, 89 S.
- 10 Hamm, U.; Öller, H.-J.; Kuwan, K.;
Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie.
Teil 1: ipw-Das Papier 1/2005,T15-T18
Teil 2: ipw-Das Papier 2/2005,T19-T21
- 11 Hamm, U.; Kersten, A.; Öller, H.-J.; Kuwan, K.;
Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie, Teil 2. Abschlussbericht zum
INFOR-Projekt 70. Darmstadt/München 2008, 92 S.

- 12 European Commission, Environment DG;
European Workshop on Endocrine Disruptors (Aronsborg, Sweden, 18-20 June 2001, Workshop Report). Quelle:
http://www.europa.eu.int/comm/environment/chemicals/pdf/workshop_report.pdf
- 13 Moltmann, J. F.; Liebig, M.; Knacker, T.; Keller, M.; Scheurer, M.; Ternes, T.;
Gewässerrelevanz endokriner Stoffe und Arzneimittel. Abschlussbericht zum UBA-Projekt
FKZ 205 24 205, Dessau, März 2007, 129 S.
- 14 Thorpe, K. L.; Hutchinson, T. H.; Hetheridge, M. J. et al.;
Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using
vitellogenin induction in juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental
Science and Technology* (35) 2001, pp. 2476-2481
- 15 Vethaak, A. D.; Lahr, J.; Schrap, S. M. et al.;
An integrated assesment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic
environment of The Netherlands. *Chemosphere* (59) 2005, pp. 511-524
- 16 Sheahan, D. A.; Brighty, G. C.; Daniel, M. et al.;
Reduction in the estrogenic activity of a treated sewage effluent discharge to an English river
as a result of a decrease in the concentration of industrially derived surfactants. *Environ.
Toxicol. Chem.* (21) 2002, pp. 515-519
- 17 OECD: Detailed review paper on fish screening assays for the detection of endocrine active
substances OECD Series on Testing und Assessment No. 46. Paris 2004, 106 S.
- 18 Kuwan, K.;
Endokrine Substanzen in Abwässern der Papier- und Zellstoffindustrie. Diplom-
arbeit 2003, Universität Koblenz-Landau, durchgeführt am PMV der TU Darmstadt
- 19 Möbius, C. H.;
Abwasser der Papier- und Zellstoffindustrie, 3. Auflage, November 2002,
Revision Dezember 2008; Quelle: <http://www.cm-consult.de>, Datei
AbwasserCM_308.pdf, 322 S.
- 20 Spörl, R.; Wagenknecht, A.; Demel, I.;
Charakterisierung und Verminderung der Rest-CSB-Konzentration in Abwässern AP-
verarbeitender Betriebe (BMWi 632/97). PTS-Forschungsbericht PTS-FB 02/99;
München, 1999, 58 S.
- 21 Gulyas, H.; Reich, M.; Eickhoff, H.-P.; Holst, H.; Sekoulov, I.;
Identifizierung organischer Einzelsubstanzen in Abläufen biologischer Kläranlagen;
GWF, Wasser-Abwasser (134) 1993, S. 486-491
- 22 Franta, J.; Helmreich, B.; Pribyl, M. et al.;
Advanced Biological Treatment of Papermill Wastewaters; Effects of Operation Condi-
tions on COD Removal and Production of Soluble Organic Compounds in Activated
Sludge Systems; *Water Sci. Tech.* 39 (1994) 3; pp. 199 - 207
- 23 Kiprarissis.; Hughes, R.; Metcalfe, C. D.; Ternes, T.;
Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. &
Technol.* (35) 2001, pp. 2423-2427

- 24 European Commission, Environment DG;
Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption – preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Final report (2000). Quelle:
http://www.europa.eu.int/comm/environment/docum/bkh_main.pdf
- 25 European Commission, Environment DG;
Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brüssel 14.06.2001; Quelle:
http://europa.eu.int/eur-lex/com/cnc/2001/com2001_0262en01.pdf
- 26 European Commission, Environment DG;
Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters – a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Brüssel 28.10.2004;
Quelle: http://europa.eu.int/comm/environment/endocrine/documents/sec_2004_1372_en.pdf
- 27 Öller, H.-J.;
Endokrine Stoffe in Papierfabriksabwässern – wie geht es weiter?; Vortrag anlässlich der PTS-Analytik-Tage 01./02.03.2006 in München
in: Weinberger, G.; Öller, H.-J. (Hrsg.): Problemlösungsorientierte Kreislaufwasser- und Abwasseruntersuchungen; PTS-Manuskript: PTS-MS 622, München 2006
- 28 Svenson, A.; Allard, A.-S.;
In vitro Androgenicity in Pulp and Paper Mill Effluents; *Environ. Toxicol.* 19 (2004); pp. 510-517
- 29 Berryman, D.; Houde, F.; DeBlois, C.; O'Shea, M.;
Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life; *Chemosphere* 56 (2004) pp. 247-255
- 30 Sattelberger, R.;
Hormonell wirksame Substanzen in der aquatischen Umwelt-analytische Ergebnisse und Überblick; Umweltbundesamt Österreich, Monographien, Band 161, Wien, 2002
- 31 Leisewitz, A.; Schwarz, W.;
Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A; Dibutylphthalat/Benzylbutylphthalat; Nonylphenol/Alkylphenoethoxylate); Forschungsbericht 106 01 076 im Auftrag des Umweltbundesamtes, Dezember 1997
- 32 Routledge, E. J; Sumpter, J. P.;
Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.* (156) 1999, pp. 241-248
- 33 Staples, C. A.; Dorn, P. B., Klecka, G. M. et al.;
A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A, *Chemosphere* (36) 1998, pp. 2149-2173

- 34 Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R. et al.;
A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* (105) 1997, pp. 802-811
- 35 Harris, C. A.; Henttu, P.; Parker, M. G.; Sumpter, J. P.;
The estrogenic activity of phthalate esters in vitro.; *Environ. Health Perspect.* (103) 1995, pp. 582-587
- 36 Fahlenkamp, H.; Hannich, C. B.; Möhle, E.; Nöthe, T.; Ries, Th.;
Eintrag und Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen;
Chemie Ingenieur Technik 2004, 76, No. 8, S. 1179 – 1188
- 37 Coors, A.;
Estrogene Aktivität im Abwasser – Nachweis mit Hilfe eines biologischen Wirktests und Erfassung der Elimination bei weitergehender Abwasserreinigung, Dissertation an RWTH Aachen, April 2004
- 38 Hamm, U.; Kersten, A.; Öller, H.-J.;
Entwicklung von Analysenverfahren zur Aufschlüsselung des Rest-CSB in biologisch gereinigten Abwässern. Abschlussbericht zum INFOR-Projekt 58. Darmstadt/ München 2005, 94 S.
- 39 N. N.;
Richtlinie 2000/60/EG zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik vom 23.10.2000 (EU-Wasserrahmenrichtlinie)
- 40 DIN EN 645:1994-01 „Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln; Herstellung von Kaltwasserextrakten“
- 41 Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.;
Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles, *J. Microcolumn Separations.* 11(10) 1999; pp. 737-747
- 42 Penalver, A. et al.;
Stir Bar Sorptive Extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples. *J. Chromatogr. A.* 1007, 2003, pp. 1-9
- 43 Kolahgar, B. et al.;
Application of stir bar sorptive extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *J. Chromatogr. A.* 963, 2002, pp. 225-230
- 44 León, V. M. et al.;
Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry I. Method optimization. *J. Chromatogr. A.* 985, 2003, pp. 221-232
- 45 Kleine-Benne; E.; Wagner-Dittrich, J.; Gil, C.; Lerch, O.;
Polare Phase für den Gerstel-Twister. Erster Überblick. Präsentation, am 23.06.2009 von der Fa. Gerstel übermittelt

-
- 46 N. N.;
Vergabegrundlagen für das Umweltzeichen „Blauer Engel“, RAL-UZ 14 „Recyclingpapier“, Ausgabe Februar 2009
 - 47 Waldmann P.;
Bericht: Östrogene Potenziale in Abwässern der Papierindustrie
Arbeitskreis Molekulare Mechanismen Umweltbedingter Genotoxizität, Mainz, 2003, 10 S.
 - 48 Handel, A.;
Ermittlung des östrogenen und androgenen Potentials verschiedener Substanzen mit den rekombinanten Hefetests R-YES und R-YAS.
Diplomarbeit 2003, Fachhochschule Bingen, Fachbereich Verfahrenstechnik, Studiengang Biotechnologie, 111 S.
 - 49 DIN EN ISO 15088:2009 „Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*)“ [ISO 15088:2007, deutsche Fassung EN ISO 15088:2008]
 - 50 Stahlschmidt-Allner, P.; Allner, B.; Römbke, J.; Knacker, T.;
Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Enviro Sci. Pollut. Res. Int.* (4) 1997, pp. 155-162.
 - 51 Ochiai, N.; Kikuo, S.; Kanda, H.; Pfannkoch, E.;
A Novel Extraction Procedure for Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE): Sequential SBSE for Uniform Enrichment of Organic Pollutants in Water Samples. *Gerstel AppNote 12/2008*, recherchiert am 14.06.2009 unter <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2008-12corrected.pdf>
 - 52 ISO 9888:1999-06: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wässrigen Medium – Statischer Test (Zahn-Wellens-Test)
 - 53 Chemical Additives for the Production of Pulp & Paper, Functionally Essential – Ecologically Beneficial. ZELLCHEMING Technical Committee “Chemical Additives (CHAD)” (Hrsg.). Deutscher Fachverlag, Frankfurt/Main 2008, ISBN 978-3-86641-120-3, 427 S.
 - 54 Papermaking Chemistry. Book 4 of the book series „Paper Science and Technology“. Edited by Alén, R., 2nd edition (2007). Published by Finnish Paper Engineers’ Association / Paperi ja Puu Oy, ISBN 978-952-5216-24-0, 255 p.
 - 55 Auhorn, W. J.;
Retention Aids and Deaerators in Printing Papers Containing Wood, as an example. *Das Papier* 51 (1997), 6A, S. V91-V127
 - 56 Ritzmann, M.;
Spezielle Untersuchungen beim Schwein. In: Kraft, W. (Hrsg.), Dürr, U. M. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 6. aktualisierte Auflage, Schattauer GmbH (2005), ISBN 3-7945-2308-3, 552 S.
 - 57 Adam, G.;
Entwicklung und Erprobung von Hefe-Bioassays für Fusarium-Mykotoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon). Abschlussbericht zum BMLFUW-Forschungsprojekt 1199, Wien, Oktober 2002, 19 S.