

**UNTERSUCHUNGEN ZUM  
REGIOSPEZIFISCHEN ABBAU VON TOXAPHEN  
UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. chem. Steffen Ruppe  
geboren am 6. April 1975 in Erfurt

Jena 2003

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Vetter
2. Prof. Dr. B. Luckas
3. Prof. Dr. M. Oehme

Tag der Doktorprüfung: 22.05.2003

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.06.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 ALLGEMEINER UND THEORETISCHER TEIL</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Allgemeine Eigenschaften von technischem Toxaphen</b>	<b>4</b>
2.1.1 Zusammensetzung, Herstellung und Anwendung	4
2.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
2.1.3 Toxizität	8
<b>2.2 Identifizierte Einzelkomponenten des technischen Toxaphens</b>	<b>10</b>
2.2.1 Struktur und Nomenklatur	10
2.2.2 Möglichkeiten für die Gewinnung von CTT-Einzelstandards	12
2.2.3 Kommerziell und nicht kommerziell erhältliche CTTs	13
<b>2.3 Toxaphenrückstände in der Umwelt</b>	<b>14</b>
2.3.1 Rückstände in biologischen Proben	14
2.3.2 Rückstände in Böden, Schlämmen und Sedimenten	16
<b>2.4 Mikrobielle Dehalogenierung chlororganischer Verbindungen</b>	<b>19</b>
2.4.1 <i>Dehalospirillum multivorans</i>	21
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	24
<b>2.5 Abiotischer Abbau von Toxaphen</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Analytik von Toxaphenrückständen</b>	<b>27</b>
2.6.1 CTT-Bestimmung durch Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD)	27
2.6.2 CTT-Bestimmung durch Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS)	28
2.6.2.1 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach Elektronenstoßionisierung (GC/EI-MS)	29
2.6.2.2 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-MS)	30

---

2.6.3	Strukturaufklärung von CTTs mittels Protonenresonanzspektroskopie ( <sup>1</sup> H-NMR)	31
2.6.4	Enantioselektive Bestimmung von CTTs mittels Gaschromatographie	32
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenmaterial</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Geräteparameter</b>	<b>36</b>
3.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	36
3.2.2	Gaschromatographie gekoppelt mit einem Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD) oder einem Flammenionisationsdetektor (GC/FID)	36
3.2.3	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-MS)	37
3.2.4	Gaschromatographie mit hochauflösender massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-HRMS)	38
3.2.5	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach Elektronenstoßionisation (GC/EI-MS)	39
3.2.6	Verwendete Kapillarsäulen	40
3.2.7	Protonenresonanzspektroskopie ( <sup>1</sup> H-NMR)	40
3.2.8	Weitere Geräte	40
<b>3.3</b>	<b>Isolierung verschiedener CTTs aus komplexen Gemischen</b>	<b>41</b>
3.3.1	Flüssigchromatographische Trennverfahren	41
3.3.1.1	Umkehrphasen- Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)	41
3.3.1.2	Normalphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (NP-HPLC)	43
3.3.2	Kalibrierung des B7-1473-Isolates mittels GC/FID	44
3.3.3	Bestimmung des GC/ECD Responsefaktors von B7-1473	45
<b>3.4</b>	<b>Anaerobe Dechlorierung von Toxaphen mit Hilfe von Bakteriensuspensionen</b>	<b>46</b>
3.4.1	Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen	46
3.4.2	Versuchsdurchführung	47
3.4.2.1	Standardverfahren	47
3.4.2.2	Ansätze zur Qualitätssicherung	48
3.4.2.3	Toxischer Einfluss der CTT-Gehalte auf <i>D. multivorans</i>	48

3.4.2.4 Probenaufarbeitung	49
<b>3.5 Abiotische Dechlorierung von Toxaphen</b>	<b>50</b>
3.5.1 Vitamin B <sub>12</sub> (CCA) und Dicyanocobinamid (DCC)	50
3.5.1.1 Präparation der eingesetzten Lösungen	50
3.5.1.2 Herstellung von Ti(III)-citrat	50
3.5.2 Reaktionen von CTTs mit methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung	51
<b>3.6 Qualitätskontrollen</b>	<b>51</b>
<b>3.7 Herkunft und Qualität der eingesetzten Chemikalien</b>	<b>53</b>
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Validierung des Probenaufbereitungsverfahrens</b>	<b>55</b>
4.1.1 Wiederfindung und Kontrolle ohne Bakterien am Beispiel des Abbaus von B8-1414	55
4.1.2 Überprüfung der Vollständigkeit der CTT-Extraktion durch erneute Extraktion	57
4.1.3 Reagenzienblindwert	57
4.1.4 Reproduzierbarkeit der Experimente am Beispiel von B9-1025	57
4.1.5 Vergleich des CTT-Abbaus durch lebende und abgetötete Zellen von <i>Dehalospirillum multivorans</i>	59
4.1.6 Langzeit-Dechlorierungsversuche von CTTs mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	60
4.1.7 Toxikologische Effekte von Melipax auf <i>Dehalospirillum multivorans</i>	61
4.1.8 Kontrolle des Temperatureinflusses auf den CTT-Abbau	62
4.1.9 Ergebnisse der Methodvalidierung	64
<b>4.2 Anaerober Abbau des technischen Gemisches Melipax</b>	<b>64</b>
<b>4.3 Regiospezifische Untersuchungen des anaeroben Abbaus von CTT-Einzelstandards mit <i>Dehalospirillum multivorans</i></b>	<b>69</b>
4.3.1 Abbau von Chlorbornanen mit geminalen Chloratomen an primären und sekundären Kohlenstoffen	69
4.3.1.1 Inkubation von B8-806 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	69
4.3.1.2 Einsatz eines Gemisches aus B8-806 und B8-809	75
4.3.1.3 Inkubation von B9-1025 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	77

4.3.2	Abbau von CTTs mit geminalen Chloratomen an primären Kohlenstoffen	79
4.3.2.1	Inkubation von B9-1679 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	79
4.3.2.2	Inkubation von B8-1412 und B8-1414 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	80
4.3.2.3	Inkubation von B7-1453 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	81
4.3.3	Untersuchung des Abbauverhaltens von Chlorbornanen ohne geminale Chloratome am Toxaphengrundgerüst	83
4.3.3.1	Inkubation von B7-1001 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	83
4.3.3.2	Inkubation von B6-923 mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	87
4.3.4	Inkubation eines Einzelenantomers mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	91
4.3.5	Auswertung des regiospezifischen Abbaus von CTTs mit <i>Dehalospirillum multivorans</i>	92
<b>4.4</b>	<b>Abiotischer Abbau von Toxaphen</b>	<b>93</b>
4.4.1	Untersuchung des Abbaus von CTTs mit Dicyanocob(I)inamid (DCC <sub>s</sub> )	93
4.4.2	Untersuchung des Abbau von CTTs mit Cyanocob(I)inamid (CCA <sub>s</sub> )	95
4.4.3	Auswertung des abiotischen Melipaxabbaus mit superreduziertem DCC und CCA	96
<b>4.5</b>	<b>Vergleich der Abbauraten von Toxaphen durch <i>Escherichia coli</i> und <i>Dehalospirillum multivorans</i></b>	<b>96</b>
<b>4.6</b>	<b>Relevanz der Ergebnisse bezogen auf Umweltproben</b>	<b>98</b>
4.6.1	Sedimentprobe aus dem Ontario-See	99
4.6.2	Sedimentproben aus dem Großen Sklaven-See	100
4.6.3	Invertebraten aus dem Kanadischen Becken	102
4.6.4	Abbauxperiment mit den Organochlorrückständen aus Skuaeiern	105
<b>4.7</b>	<b>Umweltrelevanz der mit <i>Dehalospirillum multivorans</i> erhaltenen Ergebnisse</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	

**ANHANG**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADI	Tolerierbare tägliche Aufnahme
ΣDDT	Summe der Gehalte von o,p'-DDT, o,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-DDD, und p,p'-DDE
α-PDHCH	Perdeuteriertes α-Hexachlorcyclohexan
ADI	Tolerierbare tägliche Aufnahme ( <i>Acceptable Daily Intake</i> )
ASE	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion ( <i>Accelerated Solvent Extraction</i> )
CCA	Cyanocobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )
δ	chemische Verschiebung
CKW	Chlorierte Kohlenwasserstoff
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CSP	Chirale stationäre Phase
CTTs	Verbindung(en) des technischen Toxaphens
d	Dublett
DCC	Dicyanocobinamid
DCE	Dichlorethen
dd	Doppeltes Dublett
DDD	p,p'-Dichlordiphenyldichlorethan
ddd	dreifaches Dublett
DDE	p,p'-Dichlordiphenyldichlorethen
DDT	p,p'-Dichlordiphenyltrichlorethan
d <sub>f</sub>	Filmdicke der stationären Phase
D. m.	<i>Dehalospirillum multivorans</i>
DMB	5,6-Dimethylbenzimidazol
E	Enantiomer
Eh	Dr. Ehrenstorfer
ECD	Elektroneneinfangdetektor ( <i>Electron Capture Detector</i> )
ECNI	Negative chemische Ionisierung ( <i>Electron Capture Negative Ion</i> )
EI	Elektronenstoßionisation ( <i>Electron Impact Ionisation</i> )
ε	Extinktionskoeffizient
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GSL	Großer Sklaven-See
H.	Hersteller
HCH	Hexachlorcyclohexan
HF	Hauptfraktion
HP	Hewlett-Packard
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HR	Hoch auflösend
I	Relative Intensität
i.d.	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Kopplungskonstante
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
K <sub>ow</sub>	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LD	Letale Dosis

LB	<i>Luria Broth</i>
M	Multiplizität
m	Multipllett
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
m/z	Masse/Ladung
MS	Massenspektrometrie
NCA	Norpseudovitamin B <sub>12</sub>
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NP	Normalphase
OD	Optische Dichte
P	LGC Promochem
PBDEs	Polybromierte Biphenylether
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PCDDs	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine
PCDFs	Polychlorierte Dibenzofurane
PCE	Tetrachlorethen
PFK	Perflourkerosin
PFTBA	Perflourtributylamin
POPs	Persistente organische Schadstoffe ( <i>Persistent Organic Pollutants</i> )
ppm	<i>parts per million</i>
PR	Probenahme
R	Auflösung
r	Reduziertes Kobalt (Co <sup>II</sup> )
RDA	Retro-Diels-Alder
RP	Umkehrphase ( <i>Reversed Phase</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minuten
RRI	Relative Retentionszeitindice
s	Superreduziertes Kobalt (Co <sup>I</sup> )
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCE	Trichlorethen
Temp.	Temperatur
TIC	Total Ion Chromatogramm
t <sub>r</sub>	Retentionszeit
UN	Vereinte Nationen ( <i>United Nations</i> )
UV	Ultraviolett
v	Volumenanteil
VIS	Sichtbare Licht
w	Gewichtsanteil

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1</b>	Physikalisch-chemische Daten von technischem Toxaphen	<b>8</b>
<b>Tab. 2</b>	LD <sub>50</sub> -Werte (mg/kg) verschiedener Organochlorpestizide bei oraler Verabreichung an Ratten	<b>9</b>
<b>Tab. 3</b>	Axiale Liganden und spektrale Eigenschaften der besprochenen Corrinnoide	<b>26</b>
<b>Tab. 4</b>	Intensive Masse- zu Ladungs-Verhältnisse (m/z) der [M-Cl] <sup>-</sup> - Fragmentionen von ausgewählten chlorierten Bornanen und Bornenen	<b>30</b>
<b>Tab. 5</b>	Typische Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen bei der <sup>1</sup> H-NMR von polychlorierten Bornanen	<b>32</b>
<b>Tab. 6</b>	Kapillarsäulen	<b>40</b>
<b>Tab. 7</b>	Retentionszeit der Hauptfraktion (HF) von B6-923, B7-1001, B7-1473 und B8-1414 an den verwendeten Säulen und die dabei gewonnenen Mengen	<b>43</b>
<b>Tab. 8</b>	Kalibrierung einer B7-1473-haltigen Lösung durch B7-1001 anhand der GC/FID-Signale mit anschließender Bestimmung des ECD-Responsefaktors von B7-1473	<b>45</b>
<b>Tab. 9</b>	Zeitpunkt der Probenahmen (PR) von den untersuchten CTTs mit den eingesetzten CTT- und Proteingehalten in der Bakteriensuspension, <i>D. multivorans</i> ( <i>D. m.</i> )	<b>49</b>
<b>Tab. 10</b>	Abbau von B8-1414 (50 ng) durch <i>D. multivorans</i> mit der Angabe der Wiederfindung an α-PDHCH, der Kontrollen ohne Bakterien (K-B8-1414) über einen Zeitraum von sieben Tagen	<b>56</b>
<b>Tab. 11</b>	Vergleich zweier Abbaueversuche von B9-1025 (145 ng) mit <i>D. multivorans</i>	<b>58</b>
<b>Tab. 12</b>	CTT-Gehalte beim Abbau von technischem Toxaphen (55 µg) durch <i>D. multivorans</i>	<b>66</b>
<b>Tab. 13</b>	<sup>1</sup> H-NMR-Daten von B7-1473 und zum Vergleich von B6-923	<b>74</b>
<b>Tab. 14</b>	Relative Retentionsindices (RRI) von fünf CTTs, Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten	<b>84</b>
<b>Tab. 15</b>	CTT-Belastung von Sedimentproben aus dem Großen Sklaven-See	<b>102</b>
<b>Tab. 16</b>	Strukturen und Retentionszeiten der beim Abbau von Einzel-CTTs detektierten Verbindungen an sechs verschiedenen Säulen	<b>110</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abb. 1</b>	Struktur von p,p'-DDT (a), seinem Abbauprodukt p,p'-DDE (b) und dem Chlordanmetaboliten Oxychlordan (c)	<b>4</b>
<b>Abb. 2</b>	GC/ECD-Chromatogramme (GC Ia, vgl. Kap. 3.2.2) der technischen Gemische Melipax (a) und Hercules 3956 <sup>®</sup> (b)	<b>5</b>
<b>Abb. 3</b>	Mechanismus der Darstellung polychlorierter Bornane aus Camphen über die Zwischenstufe 2- <i>exo</i> ,10-Dichlorbornan	<b>6</b>
<b>Abb. 4</b>	Bornangerüst mit der Nummerierung der C-Atome nach IUPAC-Regeln [58] (a) und Struktur von 2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Heptachlorbornan (B7-1001 (b)	<b>10</b>
<b>Abb. 5</b>	GC/ECNI-MS-Chromatogramm ( $\beta$ -BSCD) des CTT-Rückstandsmusters in einem belasteten Marschland in Georgia, USA	<b>16</b>
<b>Abb. 6</b>	CTTs, die beim Abbau von B8-810 und B9-1046 gefunden wurden; B7-515 konnte nicht beobachtet werden	<b>18</b>
<b>Abb. 7</b>	Mikroskopische Aufnahme von <i>D. multivorans</i>	<b>21</b>
<b>Abb. 8</b>	Strukturformel (a) der Cobyrynsäure und (b) des Cyanocobalamins (CCA, Vitamin B <sub>12</sub> )	<b>22</b>
<b>Abb. 9</b>	Modell der reduktiven Dechlorierung von PCE durch die PCE-Dehalogenase von <i>D. multivorans</i>	<b>23</b>
<b>Abb. 10</b>	Hypothetische Reaktionsmechanismen beim reduktiven PCE-Abbau durch PCE-Dehalogenase	<b>24</b>
<b>Abb. 11</b>	Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme von <i>E. coli</i>	<b>24</b>
<b>Abb. 12</b>	Massenspektrum von B7-1001 nach GC-Trennung und a) EI-MS sowie und b) ECNI-MS	<b>28</b>
<b>Abb. 13</b>	Schematische Darstellung von $\beta$ -Cyclodextrin	<b>32</b>
<b>Abb. 14</b>	GC/ECD-Chromatogramm der Enantiomerentrennung von sieben CTTs an einer chemisch gebundenen Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Phase ( $\beta$ -PMCD)	<b>33</b>
<b>Abb. 15</b>	Karte von Nordamerika (nur Kanada und USA) mit den Probeentnahme gebieten	<b>35</b>
<b>Abb. 16</b>	GC/HRMS-Instrument der Firma Kratos Concept	<b>39</b>
<b>Abb. 17</b>	Isolierung von B7-1473	<b>42</b>
<b>Abb. 18</b>	Verwendete Hauptfraktionen der HPLC-Isolate von B6-923, B7-1001, B8-1414	<b>43</b>
<b>Abb. 19</b>	B7-1001 Verdünnungsreihe zur Kalibrierung des B7-1473-Isolates	<b>44</b>

<b>Abb. 20</b>	GC/ECNI-MS-SIM-Chromatogramme (Hexa- bis Octachlorbornane) der B8-806 Abbauprodukte nach einem Tag an einer achiralen HP-5- und an der chiralen $\beta$ -BSCD (i)-Säule	<b>52</b>
<b>Abb. 21</b>	Abbauprofil von B8-1414 und dessen Metabolit B7-1001 beim Einsatz von (a) <i>D. multivorans</i> ( <i>D. m.</i> ), b) hitzebehandelte Zellen von <i>D. multivorans</i> , c) Hitze- und Sauerstoffbehandlung, d) Hitzebehandlung und chemische Oxidation mit TCA über einen Zeitraum von vier Tagen	<b>59</b>
<b>Abb. 22</b>	<i>D. multivorans</i> Zellgehalte in überimpften Lösungen, die zuvor mit unterschiedlichen Toxaphen-Mengen (5,6 $\mu$ g, 55,8 $\mu$ g und 558 $\mu$ g) behandelt wurden	<b>62</b>
<b>Abb. 23</b>	Abbauprofil von B8-1414 und dessen Metabolit B7-1001 (vgl. <b>Tab. 9</b> , Versuch 1) durch eine Zellsuspension von <i>D. multivorans</i> unter Einfluss der Lagerungstemperatur über einen Zeitraum von sieben Tagen	<b>63</b>
<b>Abb. 24</b>	Abbau von Melipax (55 $\mu$ g) durch <i>D. multivorans</i>	<b>65</b>
<b>Abb. 25</b>	Abbauprofil von Melipax: a) Pentachlorbornane, b) Hexachlorbornene, c) Hexachlorbornane	<b>67</b>
<b>Abb. 26</b>	Struktur von B8-806 und B8-809	<b>69</b>
<b>Abb. 27</b>	Abbau von B8-806 durch Einsatz einer Zellsuspension von <i>D. multivorans</i>	<b>70</b>
<b>Abb. 28</b>	CTT-Strukturen und Prozesse, die beim Abbau von B8-806 erkannt wurden	<b>71</b>
<b>Abb. 29</b>	GC/EI-MS-Spektrum (m/z 157-400) von B7-1473	<b>72</b>
<b>Abb. 30</b>	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von B7-1473	<b>73</b>
<b>Abb. 31</b>	B8-806/B8-809-Abbau mit <i>D. multivorans</i>	<b>75</b>
<b>Abb. 32</b>	Abbauschema des B9-1025 zu vier möglichen Hexachlorbornanen	<b>77</b>
<b>Abb. 33</b>	B9-1025-Abbau mit <i>D. multivorans</i>	<b>78</b>
<b>Abb. 34</b>	Abbau von B9-1679 (77 ng) unter Einsatz von <i>D. multivorans</i>	<b>79</b>
<b>Abb. 35</b>	Inkubation von a) B8-1414 und einem Gemisch aus b) B7-1453 und c) B8-1412 mit <i>D. multivorans</i>	<b>81</b>
<b>Abb. 36</b>	Schema des Abbaus von B7-1453 in ein Pentachlorbornan über zwei Zwischenprodukte	<b>81</b>
<b>Abb. 37</b>	Abbau von B7-1453 (35 ng) und B8-1412 (20 ng, zu B7-1001) mit <i>D. multivorans</i>	<b>82</b>
<b>Abb. 38</b>	B7-1001 und Abbauprodukte bei der Behandlung mit <i>D. multivorans</i>	<b>83</b>
<b>Abb. 39</b>	Strukturen der CTTs und Prozesse beim Abbau von B7-1001	<b>85</b>

<b>Abb. 40</b>	Reaktion von B7-1001 mit methanolischem KOH	<b>86</b>
<b>Abb. 41</b>	Abbau von B6-923 durch <i>D. multivorans</i> ( <i>D. m.</i> ) bzw. Kontrolle (ohne Bakterien) über einen Zeitraum von 14 Tagen	<b>86</b>
<b>Abb. 42</b>	B6-923-Abbau (50 ng) durch Zellsuspensionen von <i>D. multivorans</i> , GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme (DB-5-Säule, m/z 274,9742 für Penta- und m/z 308,9352 für Hexachlorbornane) vom Start (oben) und nach 14 Tagen (unten)	<b>89</b>
<b>Abb. 43</b>	Schema der Bildung von B5-465 ausgehend von B7-1453 (vgl. <b>Abb. 36</b> ) und von B6-923	<b>90</b>
<b>Abb. 44</b>	Reaktion von B6-923 mit methanolischem KOH	<b>91</b>
<b>Abb. 45</b>	Abbau eines Einzelenantiomers (E2) von B9-1679 durch <i>D. multivorans</i>	<b>92</b>
<b>Abb. 46</b>	Melipax-Abbau (55 µg) mit superreduziertem DCC (5 µM DCC)	<b>94</b>
<b>Abb. 47</b>	Einflussparameter auf den Abbau von Melipax mit superreduziertem DCC	<b>95</b>
<b>Abb. 48</b>	Abbau von Melipax mit unterschiedlichen Konzentration an CCA (1 mM, 1 µM)	<b>95</b>
<b>Abb. 49</b>	B8-806-Abbau beim Einsatz von <i>D. multivorans</i> (a) und <i>E. coli</i> (b)	<b>97</b>
<b>Abb. 50</b>	Abbau von B7-1453, B8-1412 und dessen Metabolit B7-1001 mit Suspensionen von <i>D. multivorans</i> ( <i>D. m.</i> ) und <i>E. coli</i>	<b>98</b>
<b>Abb. 51</b>	CTT-Rückstandsmuster in einem aufgearbeiteten Sedimentbohrkern (2-3 cm, Ablagerung von 1989-92) aus dem Ontario-See (Kanada)	<b>99</b>
<b>Abb. 52</b>	CTT-Rückstandsmuster in einem Sedimentbohrkern des Großen Sklaven-Sees aus 2,5-3 cm Tiefe (GSL-19b)	<b>101</b>
<b>Abb. 53</b>	CTT-Rückstandsmuster in Invertebraten aus dem Kanadischen Becken	<b>103</b>
<b>Abb. 54</b>	Abbau von B8-1413, B9-1679, Oxychlordan und p,p'-DDE mit Hilfe von <i>D. multivorans</i> aus Skuaeierextrakten	<b>106</b>
<b>Abb. 55</b>	Mögliches Abbauschema von B8-1945 zu B6-903 über die Metabolite B7-1450 und B7-1449	<b>107</b>
<b>Abb. 56</b>	GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme vom Melipax-Abbau nach 16 Tagen (DB-5-Säule): a) Pentachlorbornane, b) Hexachlorbornene (bzw. -camphene), c) Hexa-, d) Heptachlorbornane	<b>108</b>

## 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Toxaphen ist ein komplexes Gemisch aus mehreren Hundert Einzelkomponenten, das größtenteils aus polychlorierten Bornanen besteht [1][2][3]. Das technische Gemisch wurde seit Ende der vierziger Jahre vor allem zur Insektenbekämpfung im Baumwoll-, Sojabohnen- und Erdnussanbau eingesetzt [1][2]. Die hohe Flüchtigkeit verknüpft mit der Persistenz chlorierter Xenobiotika führte auch im Fall des Toxaphens zu einer ubiquitären Verteilung. Das neurotoxische, extrem fischgiftige und kanzerogen wirkende Pestizid Toxaphen wurde dabei in höheren Gliedern der Nahrungskette – vor allem in marinen Säugern – angereichert [1][2]. Aufgrund dieser Eigenschaften erfolgten seit den siebziger Jahren Produktionsverbote, denen sich viele Länder anschlossen [2].

Sedimente und Böden wirken als natürliche Senken für die im Millionentonnenmaßstab eingesetzten Verbindungen des technischen Toxaphens (CTTs) [4]. So kann noch heute, durch Entnahme von Sedimentprofilen, die Hauptverwendungszeit in den siebziger Jahren festgestellt werden [5][6].

Das dabei nachweisbare CTT-Rückstandsmuster ist jedoch im Vergleich zum technischen Produkt stark vereinfacht [2][7]. So werden in höheren Organismen vorrangig Octa- und Nonachlorbornane und in Sedimenten, Böden und Klärschlämmen vor allem niederchlorierte CTTs gefunden. Als Hauptmetabolite konnten ein Hexa- und ein Heptachlorbornan identifiziert werden, die nachweislich nach partieller Dechlorierung höherchlorierter CTTs entstanden waren [8][9]. Als Mechanismus wurde die reduktive Dechlorierung an Kohlenstoffen mit geminalen Cl-Atomen (*gem*-Cls) vorgeschlagen, so dass aufgrund der sieben möglichen Chlorierungsstellen am Bornangerüst ein Abbau aller CTTs mit einem höheren Chlorierungsgrad als sieben erfolgen müsste [8][9][10].

Neben den beiden Hauptmetaboliten konnten weitere Penta- bis Heptachlorbornane und gelegentlich auch einige Octa- und Nonachlor-CTTs sowie wenige ungesättigte CTTs in anaeroben Medien identifiziert werden [8][9][11]. Die relativ große Spannbreite der CTT-Rückstandsmuster in Umweltproben spiegelte sich auch bei der Untersuchung von sechs kanadischen Seen wider [12].

Eine exakte Beschreibung der CTT-Rückstandsmuster wird dadurch erschwert, dass nur wenige niederchlorierte Verbindungen strukturell bekannt und nur die zwei

Hauptmetabolite und ein weiteres Hexachlorbornan als Standardverbindungen bekannter Konzentration kommerziell erhältlich sind.

Zur Untersuchung des CTT-Abbaus wurden bereits Klärschlämme und Böden mit Toxaphen dotiert [9][10], wobei eine Verschiebung des CTT-Musters in Richtung niederchlorierter Verbindungen und die Entstehung der Hauptmetabolite nachweisbar waren. Jedoch konnte dabei nur ein sehr langsamer Abbau im Boden und ein unvollständiger Umsatz in Klärschlamm festgestellt werden [9]. Aufgrund des hohen Chlorierungsgrades von Toxaphen mit durchschnittlich acht Cl-Atomen, kann ein aerober Prozess als Alternative ausgeschlossen werden [10][13].

Der Einsatz von einzelnen CTTs in Experimenten mit anaeroben Böden bestätigte den bevorzugten Abbau an Kohlenstoffen mit *gem*-Cls [13]. Der ausgebliebene CTT-Abbau beim Einsatz autoklavierter Bodenproben unterstützte die Vermutung, dass Mikroorganismen am Metabolismus beteiligt sind [13]. Dies konnte durch den Abbau mit Hilfe eines aus einem belasteten Boden extrahierten Bakterienkonglomerates ebenfalls bestätigt werden [14]. Jedoch sind solche Versuche sehr zeitaufwendig und schwierig zu wiederholen, da sich die Zusammensetzung der Bodenmikroorganismen ändern kann.

Die reduktive Dechlorierung, katalysiert von Bakteriengemischen oder definierten reinen Bakterienkulturen, wurde bereits im Fall von Chlorphenolen, Chlorbenzolen, Chlormethanen, Chlorethanen, Chlorethenen und ansatzweise auch für Toxaphen gezeigt [14][15][16][17].

Die beim CTT-Abbau ablaufenden Prozesse sind auch heute noch weitgehend unbekannt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine genauere Untersuchung des anoxischen Abbaus von Toxaphen erfolgen. Hierzu war eine Methode zu entwickeln, mit der ein reproduzierbarer Abbau unter definierten Bedingungen durchführbar ist. Die Vielzahl der notwendigen Experimente erforderte ein Verfahren, das einen schnellen Abbau von Toxaphen ermöglicht. Für diese Studien stand uns das Bakterium *Dehalospirillum multivorans* zur Verfügung, das bereits ein hohes Potential für die reduktive Dechlorierung von chlorierten Ethenen und Propenen gezeigt hatte. Aufgrund der Fähigkeit *D. multivorans*, Cl-Atome von hochchlorierten Substraten abzuspalten, schien es ebenfalls für den CTT-Abbau geeignet zu sein.

Da mit Hilfe des technischen Toxaphengemisches eine Aufklärung des Mechanismus nicht möglich erscheint, sollten auch relevante Einzel-CTTs eingesetzt werden, um die in Umweltproben ablaufenden Prozesse zu simulieren. Neben einigen bereits verfügbaren CTTs mussten andere explizit durch Isolierung aus Umweltproben gewonnenen werden.

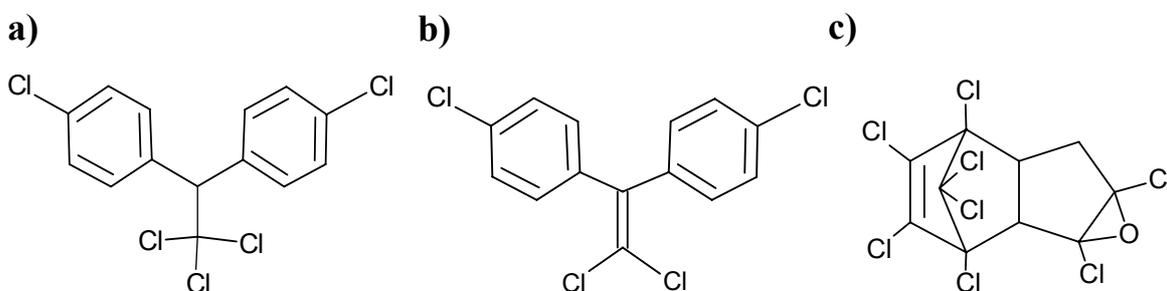
Neben der Untersuchung des Abbaus galt es sicherzustellen, dass es sich bei den identifizierten CTTs um umweltrelevante Verbindungen handelt. Dies sollte durch eine Untersuchung von belasteten Umweltproben überprüft werden. Die dabei gewonnenen Kenntnisse und das erworbene Verständnis der Abbauvorgänge sollten die Basis für Dekontaminationen von Toxaphenaltlasten in der Umwelt bilden.

## 2 ALLGEMEINER UND THEORETISCHER TEIL

### 2.1 Allgemeine Eigenschaften von technischem Toxaphen

Toxaphen zählt wie *p,p'*-Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) (**Abb. 1a**), Chlordan (Oxychlordan, **Abb. 1c**) und Hexachlorcyclohexan (HCH) zur Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, die als Pestizide weltweit im Millionentonnenmaßstab eingesetzt worden sind.

Toxaphen und sieben weitere Pestizide, polychlorierte Biphenyle (PCBs), Hexachlorbenzol und die Verbrennungsrückstände polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs) wurden im Rahmen der Stockholmer Konvention (2001) verboten, wobei erst durch die Unterzeichnung von 50 Mitgliedsstaaten der *United Nations* (UN) der Vertrag in Kraft tritt. Diese 12 langlebigen und als besonders gefährlich eingestuft organischen Giftstoffe (POPs, *Persistent Organic Pollutants*), die auch als „*Dirty Dozen*“ (dreckiges Dutzend) bezeichnet werden, dürfen danach weder hergestellt, angewendet noch verkauft werden [18]. Weiterhin befindet sich die Verbindungen des technischen Toxaphens (*compounds of technical toxaphene*, CTTs) auf Position 31 der Liste gefährlicher Substanzen, die 2001 vom *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act* (CERCLA) herausgegeben wurde [19].

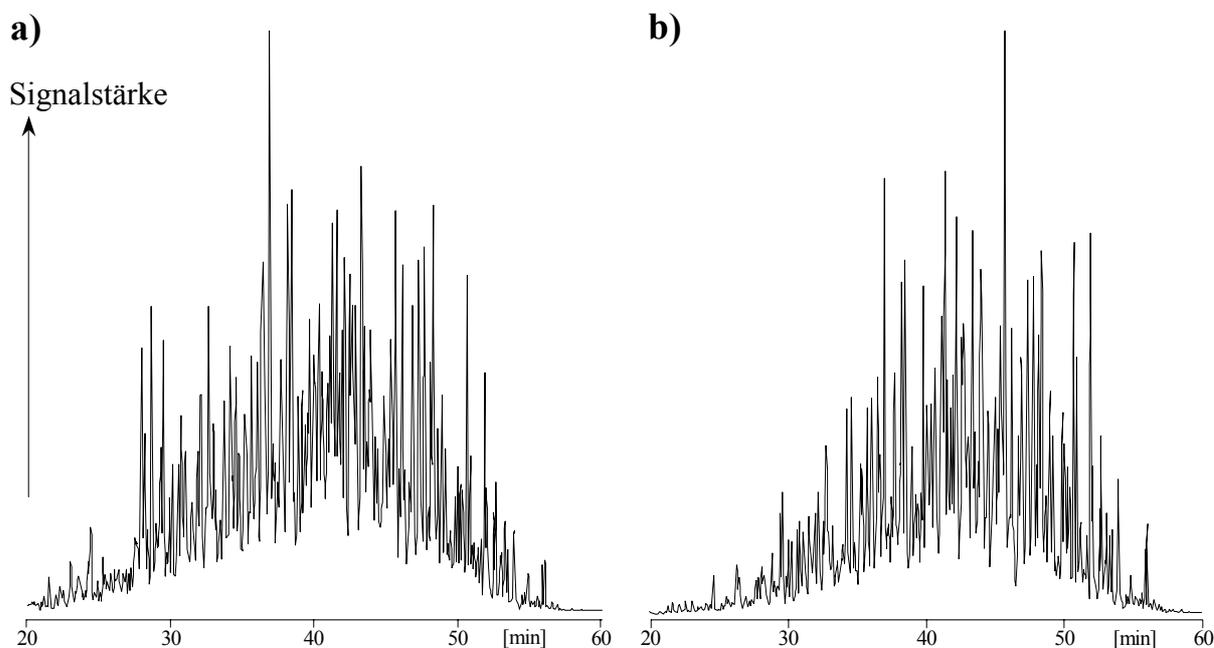


**Abb. 1** Struktur von *p,p'*-DDT (a), seinem Abbauprodukt *p,p'*-DDE (b) und dem Chlordanmetaboliten Oxychlordan (c)

#### 2.1.1 Zusammensetzung, Herstellung und Anwendung

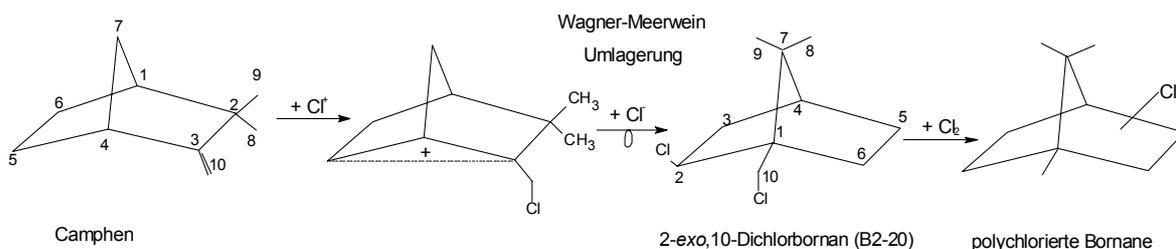
Toxaphen (*Chemical Abstract Services* (CAS) Bezeichnung: *Toxaphene mixture* [8001-35-2]) ist ein komplexes Gemisch aus überwiegend polychlorierten bicyclischen ( $C_{10}$ -) Monoterpenen. Es wurde 1945 als Hercules 3956® von der Firma Hercules Inc. in den USA erstmals auf den Markt gebracht [1]. Vergleichbare Produkte wurden später in weiteren Ländern produziert und gelangten auch unter Namen wie Melipax oder Strobane

T<sup>®</sup> in den Handel. Bei der Untersuchung zweier der oben genannten technischen Produkte ergab sich ein ähnliche Produktspektren, wenn auch im Bereich der niederchlorierten CTTs (Elutionsbereich bis ~ 40 min) und bei den jeweiligen Hauptkomponenten Unterschiede feststellbar waren (**Abb. 2**).



**Abb. 2** GC/ECD-Chromatogramme (GC1a, vgl. **Kap. 3.2.2**) der technischen Gemische Melipax (a) und Hercules 3956<sup>®</sup> (b)

Ausgangsmaterial für die Darstellung von technischem Toxaphen ist der Naturstoff Camphen (2,2-Dimethyl-3-methylen-bicyclo[2.2.1]heptan) [1]. Beim Einleiten von Chlorgas in eine 20-%ige Lösung von technischem Camphen in Tetrachlormethan erfolgt unter UV-Bestrahlung zunächst eine ionische Chloraddition an die Doppelbindung des Camphens. Aus dem daraus resultierenden Carbokation entsteht durch Wagner-Meerwein-Umlagerung und nach einer weiteren Chloranlagerung als Zwischenprodukt hauptsächlich 2-*exo*,10-Dichlorbornan (**Abb. 3**) [20]. Bei der weiteren radikalischen Chlorierung entsteht ein komplexes Produkt, das zu rund 90 % aus polychlorierten Bornanen besteht. Daneben liegen in Toxaphen geringe Mengen an polychlorierten Camphenen, Bornenen und Dihydrocamphenen vor [1]. So berichteten Kimmel *et al.*, dass technisches Toxaphen rund 5 % ungesättigte Verbindungen enthält, und dabei größtenteils (3,15 %) Chlorcamphene [21].



**Abb. 3** Mechanismus der Darstellung polychlorierter Bornane aus Camphen über die Zwischenstufe 2-exo,10-Dichlorbornan (B2-20)

Toxaphen weist einen durchschnittlichen Chlorierungsgrad von 67 - 69 % und ein mittleres Molekulargewicht von 414 g/mol auf. Das entspricht einer mittleren Elementarzusammensetzung von ca.  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Cl}_8$  [1][2][22]. Rund 97 % der Chlorbornane sind chiral [2].

Die Anzahl der bisher in technischen Gemischen bestimmten Einzelverbindungen variiert sehr stark. So wiesen Holmstead *et al.* über 177 [23], Saleh über 202 [24], de Boer *et al.* über 246 [25] und Jansson *et al.* gar mehr als 670 [26] Einzelverbindungen in technischen Gemischen nach. Diesen Befunden steht eine theoretisch mögliche Anzahl von allein 16640 polychlorierten Bornanen gegenüber [27].

Als nicht systemisches Insektizid, das vornehmlich als Fraßgift wirkt, wurde Toxaphen in fast allen landwirtschaftlichen Bereichen eingesetzt. So wurde es vorrangig bei der Insektenbekämpfung im Baumwoll-, Sojabohnen-, Erdnuss-, und Obstanbau, aber auch bei Parasitenbefall von Nutztieren herangezogen [1]. Wegen der vermeintlichen Ungefährlichkeit gegenüber Bienen wurde Toxaphen in der ehemaligen DDR unter dem Handelsnamen Melipax auch während der Blüte im Rapsanbau eingesetzt [2]. Weiterhin fand es zeitweise aufgrund seiner hohen Fischtoxizität (vgl. **Kap. 2.1.3**) zur Eliminierung des natürlichen Fischbestandes einiger Seen in Nordamerika Anwendung [6].

Im Zuge der Verbote von Chlordan, Aldrin und Dieldrin und insbesondere des DDT kam Toxaphen in den siebziger Jahren in den USA vermehrt als Ersatzprodukt mit jährlich bis zu 30000 t zum Einsatz [28]. Weitere Herstellungsländer waren Bulgarien, Nicaragua, Rumänien, Ungarn, Polen, Mexiko, Russland und weitere Staaten der ehemaligen Sowjetunion [1][29][30]. Hochrechnungen zufolge betrug der Toxaphen-Verbrauch der Jahre 1950-1993 rund 1,3 Millionen t [29].

Ökotoxikologische Untersuchungen an Toxaphen (vgl. **Kap. 2.1.3**), wie z.B. die Ermittlung von mutagenen Eigenschaften, Fischtoxizität, Bioakkumulation (**Gleichung 1** [31]) und Persistenz führten 1982 in den USA zu einem Produktionsstopp [28]. In der

Bundesrepublik Deutschland war die Anwendung von Toxaphen in der Landwirtschaft bereits 1971 untersagt worden. Bis Mitte der achtziger Jahre kam es in vielen Ländern der Erde zur Einschränkung bzw. zum Verbot des Pestizids, wogegen technisches Toxaphen in der DDR, wo insgesamt rund 45000 t produziert wurden, noch bis 1990 zugelassen war [32].

$$\text{Bioakkumulationsfaktor} = \frac{\text{Konzentration eines Stoffes in einem Lebewesen}}{\text{Konzentration eines Stoffes im umgebenden Medium}} \quad (1)$$

Das im Vergleich mit anderen Organochlorpestiziden rund zehn Jahre später erfolgte Verbot von Toxaphen ist auf Schwierigkeiten beim analytischen Nachweis zurückzuführen, da erst die im Laufe der achtziger Jahre entwickelten verbesserten Nachweisverfahren eine Rückstandsanalytik von Toxaphen ermöglichten [2].

### 2.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Technisches Toxaphen ist ein gelblich bis braun gefärbter, wachsartiger Stoff mit einem leichten Terpentingeruch [1]. Während Toxaphen unter sauren Bedingungen - auch gegenüber konzentrierter Schwefelsäure - relativ stabil ist, erfolgt unter Einwirkung von alkoholischer Kalilauge eine weitgehende Dehydrochlorierung zu Chlorbornenen [33]. LaPierre *et al.* [34], die ethanolische Natronlauge unter Überdruck bei 130 °C in Anwesenheit eines Nickelkatalysators mit Toxaphen reagieren ließen, beobachteten ebenfalls einen Abbau durch Dehydrochlorierung. Bei Verwendung eines Palladium-Magnesium-Pulvers unter Raumbedingungen (Druck, Temperatur) konnte eine teilweise Dechlorierung von Chlordan, DDT, PCBs und auch Toxaphen erzielt werden [35].

Des Weiteren konnte nach UV-Bestrahlung (Quecksilberniederdrucklampe bei 254 nm) ein photochemischer Abbau beobachtet werden [36]. Dieses Verfahren wurde vor allem zur Gewinnung von Toxaphen-Referenzstandards (vgl. **Kap. 2.2.2**) eingesetzt, denn das nach zweistündiger Bestrahlung bei 254 nm gebildete Toxaphenrückstandsmuster ähnelte dem von Lebertran und Fischölen [20][36][37].

Toxaphen hat keinen Siedepunkt, da es sich ab 150 °C unter HCl-Entwicklung zersetzt [38]. Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{ow}$ ), der ein Maß für die Lipophilie einer Verbindung darstellt, ist bei Toxaphen nur wenig geringer als der von PCBs (PCB 105: 6,02, PCB 153: 6,58, vgl. **Tab. 1**) [1][39].

**Tab. 1** *Physikalisch-chemische Daten von technischem Toxaphen*

Physikalische Größe	Werte	Literatur
Dichte (25 °C)	1,63 g/mL	[1]
Dampfdruck (20 °C)	1,33-8,92 x 10 <sup>-4</sup> Pa	[3]
Schmelzbereich	70-90 °C	[1]
Henry-Konstante	6 x 10 <sup>-6</sup> atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	[3]
Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient*	3,3-6,4	[1][40]
Wasserlöslichkeit	bis 3 mg/L	[1]

\*  $\log K_{ow}$

Die zum Teil großen Schwankungen einiger Parameter in **Tab. 1**, sind Folge der Tatsache, dass es sich bei Toxaphen um ein Multikomponentengemisch handelt und möglicherweise technische Gemische, die geringe Unterschiede in der Zusammensetzung aufweisen (vgl. **Abb. 2**), zur Untersuchung gelangten.

Fisk *et. al.* veröffentlichten  $\log K_{ow}$ -Werte von 4,7-6,64 für 36 CTTs, wobei der  $\log K_{ow}$  tendenziell mit dem Chlorierungsgrad korrelierte [39]. Dagegen weist Toxaphen gegenüber DDT eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit auf [1]. Die Henry-Konstante, welche die Flüchtigkeit eines Stoffes beschreibt und über den Dampfdruck und die Wasserlöslichkeit berechnet wird, liegt für Toxaphen in einem Bereich, der den Transport über die Atmosphäre sowie eine Anreicherung im Wasser ermöglicht [41].

### 2.1.3 Toxizität

Toxaphen wirkt wie alle insektiziden Organochlorverbindungen auf das zentrale Nervensystem (ZNS). Diese neurotoxische Wirkung führt zu Symptomen wie Übererregung und Lähmung motorischer und - in geringem Maße - auch sensorischer Nerven. Bei akuten Vergiftungen wurden Ruhelosigkeit, Schwindel, Erbrechen sowie Krämpfe und spastische Lähmungen beobachtet. Toxaphen ist für Fische mit einer tödlichen Dosis von 50 µg Toxaphen/L Wasser extrem giftig [1][3]. Dagegen weist Toxaphen eine mittlere akute Toxizität gegenüber Säugetieren auf und ist damit vergleichbar mit anderen Organochlorpestiziden (**Tab. 2**) [1].

Neben der akuten Toxizität verursacht Toxaphen chronische Erkrankungen des ZNS, der Leber, der Niere und der Reproduktionsorgane [43]. Allerdings sind in den beschriebenen Organen erst bei hohen (> 15-40 mg/kg) Konzentrationen cytopathologische Veränderungen festgestellt worden [44].

**Tab. 2** *LD<sub>50</sub>-Werte (mg/kg) verschiedener Organochlorpestizide bei oraler Verabreichung an Ratten [1][42]*

Insektizid	Aldrin	Dieldrin	Toxaphen	Lindan	DDT	Heptachlor	Endosulfan
<b>LD<sub>50</sub> (mg/kg)</b>	36-60	40-87	80-90	88-225	113-118	100-162	40-110

Bei Nagetieren rief Toxaphen Karzinogenität und Mutagenität hervor [1]. In Langzeitstudien an Ratten und Mäusen konnten Lebertumore, sowie bei männlichen Tieren Leukämie und bei weiblichen Sarkome beobachtet werden [45]. In Rindern wurden eine akute Toxizität von 5-35 mg/kg und Halbwertszeiten von 6,3-13 Wochen ermittelt [46]. Bei der Fischart Dickkopflritze (*Pimephales promelas*) wurde nach Verabreichung von 55-1230 ng Toxaphen pro L Wasser über einen Zeitraum von 150 Tagen ein verminderter Collagengehalt, der eine schwache und brüchige Wirbelsäule nach sich zog [47], beobachtet.

Weiterhin zählt Toxaphen zu den Chemikalien, die östrogene Wirkung haben sollen [48][49]. Für den Menschen wurde ein ADI-Wert (tolerierbare tägliche Aufnahme) von 1,25 µg/kg Körpergewicht und Tag [3] und eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von 0,5 mg/m<sup>3</sup> ermittelt [50].

Die bisher beschriebenen Effekte waren bei der Untersuchung des technischen Toxaphengemisches beobachtet worden. Bei oraler Applikation verschiedener CTTs an Mäuse, Hausfliegen und Goldfische zeigte sich, dass das toxische Potential stark strukturabhängig ist. Chlorbornane mit geminalen Cl-Atomen (*gem*-Cl) an C-2-, C-5-, C-8-, oder C-9-Position zeigten generell eine höhere akute Toxizität als andere CTTs [51]. Weiterhin fanden Khalifa *et al.* durch Versuche an Mäusen eine gegenüber dem technischen Gemisch sechsfach höhere Toxizität von 2,2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Heptachlorbornan (B7-515) [52], die von 2,2,5-*endo*,6-*exo*,8,8,9,10-Octachlorbornan (B8-806) und 2,2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,9,10-Octachlorbornan (B8-809) - zwei Hauptverbindungen im technischen Gemisch - noch übertroffen wurde (Nomenklatur: **vgl. Kap. 2.2.1**) [52]. Des Weiteren konnten Chandurkar *et al.* in Fischen nachweisen, dass 2-*endo*,3-*exo*,5-*endo*,6-*exo*,8,9,9,10,10-Nonachlorbornan (B9-1679) vierfach toxischer ist als das technische Gemisch [53].

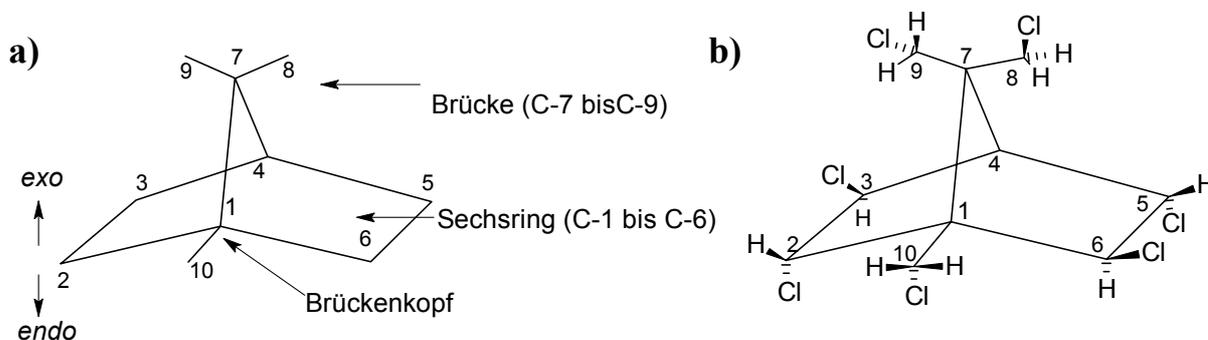
Nach Auswertung der bisherigen Erkenntnisse wurde in Deutschland für Toxaphenrückstände in Fisch und Fischprodukten ein Grenzwert von 0,1 mg/kg Frischgewicht festgelegt [54], der aus der Summe der Gehalte von drei Indikatorverbindungen (B8-1413, B9-1679, B9-1025; Struktur vgl. **ATab. 1**) berechnet wird.

## 2.2 Identifizierte Einzelkomponenten des technischen Toxaphens

### 2.2.1 Struktur und Nomenklatur

Da in technischem Toxaphen Verbindungen mit verschiedenen Grundkörpern vorliegen (vgl. **Kap. 2.1.1**), ist die Ableitung eines allgemeingültigen Akronyms, wie zum Beispiel „PCBs“ im Fall der polychlorierten Biphenyle, nicht einfach. In der Literatur werden daher Abkürzungen wie „PCC“ (*polychlorinated camphenes*) [55], „CHBs“ (*chlorinated bornanes*), „CB“ (*chlorobornanes*) [56] und „CTTs“ (*compounds of technical toxaphene*) [57] verwendet, wobei streng genommen nur das letztgenannte Akronym alle Gegebenheiten richtig widerspiegelt, und auf dieses wird in der Folge auch zurückgegriffen.

Auch die Nomenklatur der CTTs ist nicht trivial und soll daher am Beispiel der Chlorbornane, die auch den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden, beschrieben werden. Nach den Regeln der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) [58] beginnt die Nummerierung der C-Atome des Bornans im Sechsrings am methylsubstituierten Brückenkopf (**Abb. 4a**). Die sogenannte Brücke besteht aus den C-Atomen C-7 bis C-9, wobei sich C-8 über C-5/C-6 bzw. C-9 über C-2/C-3 befindet [58]. Das C-Atom der Methylgruppe an C-1 erhält die Nummer 10.



**Abb. 4** Bornangerüst mit der Nummerierung der C-Atome nach IUPAC-Regeln [58] (a) und Struktur von 2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan (B7-1001) (b)

Bornan ist aufgrund der durch die Kohlenstoffatome C-1, C-4, und C-7 verlaufenden Spiegelebene achiral. Die Addition eines Cl-Atoms würde jedoch mit der Ausnahme von 4-Chlorbornan und 10-Chlorbornan zu chiralen Monochlorbornanen führen. Achirale polychlorierte Bornane müssen somit an den gegenüberliegenden Positionen des Sechsrings (vgl. **Abb. 4**), wie z.B. 2-*exo* und 6-*exo* (eins der vier Paare), identisch und an

C-8 und C-9 symmetrisch substituiert sein. Dieses Symmetrieelement weisen lediglich 512 aller theoretisch möglichen Chlorbornane auf, wogegen 16128 der Chlorbornane als Bild und Spiegelbild vorliegen [27]. Somit ergibt sich, dass ca. 97 % aller theoretisch möglichen Chlorbornane chiral und nur etwa 3 % achiral sind [27].

Im Fall von chiralen Chlorbornanen wird das Enantiomer, welches die niedrigere Nummerierung der Chlorsubstitution aufweist, als Synonym für das Enantiomerenpaar angegeben [58][59]. Bei gleicher Zahlenfolge hat die *endo*-Position Vorrang, da der 2. Buchstabe alphabetisch zuerst kommt. Daraus folgt, dass der IUPAC-Name der in **Abb. 4b** gezeigten Verbindung eindeutig *2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan* und nicht *2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,9,10-Heptachlorbornan* ist.

Aufgrund der für den häufigen Gebrauch unpraktischen chemischen Namen wurden für CTT-Einzelverbindungen unterschiedliche Kürzel vorgeschlagen. So wird *2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan* in der Literatur als Toxicant A<sub>c</sub> [53], T12 [60], TOX 9 [61], Parlar #50 (Nummerierung nach der Elutionsreihenfolge an DB-5 Säulen), NCB 4925 [62], 297-643 [63], B9-1679 [64] und als B[12012]-(212) [65] bezeichnet. Wie aus diesem Beispiel hervorgeht, ist es im Falle des Toxaphens selbst für Fachleute nicht einfach, eine einheitliche Sprache zu finden.

In der vorliegenden Arbeit wird bei bekannten CTTs auf das Akronym-System von Andrews und Vetter zurückgegriffen [64]. Es handelt sich hierbei um eine umfassende Nummerierung aller theoretisch möglichen Chlorbornane auf der Basis der IUPAC Regeln. Mit Hilfe eines Computerprogramms werden alle Isomere der Reihe nach nummeriert und erhalten einen ein- bis vierstelligen Isomerencode. *2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan* (**Abb. 4b**) erhält so die eindeutige Bezeichnung B7-1001, wobei „B“ für das Grundgerüst Bornan steht, die nachfolgende Zahl „7“ den Chlorierungsgrad und der vierstellige Zahlencode „1001“ die Isomerennummer anzeigt. Das Computerprogramm bietet auch die Möglichkeit, die theoretisch mögliche Anzahl von Chlorbornanen mit bestimmten Strukturmerkmalen zu berechnen. So kann z.B. die Anzahl von Chlorbornan-Isomeren mit *gem*-Cls an C-2 durch schrittweise Erhöhung des Isomeren-Codes ermittelt werden. Von allen CTTs, die dieses Strukturmerkmal aufweisen, wurden die jeweils höchsten Codes aller Chlorierungsgrade addiert. Daraus ergibt sich, dass theoretisch 7232 Chlorbornane mit *gem*-Cls an C-2 substituiert sind [66].

Sollen einzelne Enantiomere dargestellt werden, wird dem Nummerncode noch der Buchstabe „a“ bzw. „b“ angefügt, wobei das Enantiomer mit der niedrigen Nummerierung der Chlorsubstitution den Buchstaben „a“ erhält. Da bisher keine Bestimmung der

absoluten Konfiguration von CTTs erfolgt ist, kann diese Nomenklatur noch nicht auf die im Falle einer chromatographischen Enantiomerentrennung erhaltenen Signale angewendet werden.

Aufgrund von Beobachtungen bei der Synthese, semiempirischen Modellierungen und dem Vergleich bekannter Strukturen können Einschränkungen hinsichtlich der tatsächlichen Varianz gemacht werden. Die Substitution einer Methylgruppe durch drei Chloratome wurde bisher nur einmal (in Fall von B7-500 [67]) und ein Chlorsubstituent an C-4 noch nie beobachtet. An der Brücke (C-8 und C-9) befinden sich höchstens drei Chloratome. Die sogenannte „Brücke-und-*exo*“-Regel besagt, dass eine Dichlormethylgruppe an C-8 nur im Fall eines 6-*exo*-Cl und eine Dichlormethylgruppe an C-9 nur im Fall eines 2-*exo*-Cl vorliegen kann. Weiterhin werden maximal drei Chlorsubstituenten an C-2/C-3 bzw. C-5/C-6 gefunden. Der Syntheseweg über 2-*exo*,10-Dichlorbornan schließt eine Nichtsubstitution an C-10 und einer der beiden *exo*-Cl vicinal zu C-1 aus. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen verringert sich die theoretisch mögliche Kongenerenzahl auf < 1500 [68]. Dieser hohen Zahl stehen bisher nur 79 strukturell bekannte Chlorbornane gegenüber (vgl. **ATab. 1**).

Zur Bezeichnung der in der vorliegenden Arbeit diskutierten unbekanntenen CTTs, wurde folgendes Verfahren angewandt: Zunächst wird der Chlorierungsgrad durch die entsprechende Abkürzung (Pe – Pentachlor, Hx – Hexachlor, Hp – Heptachlor) gekennzeichnet, und nach einem Bindestrich folgt das Grundgerüst in Form des Kürzels Ba für Bornan und Be für Bornen. Die Unterscheidung von Isomeren erfolgt durch den Zusatz einer Zahl, die entsprechend der Retentionsfolge an einer DB-5 (95 % Dimethyl-, 5 % Diphenylpolysiloxan) Säule bei der Kapillargaschromatographie (GC) vergeben wird. So wird das ersteluerende unbekanntene Hexachlorbornan als Hx-Ba1 bezeichnet.

### 2.2.2 Möglichkeiten für die Gewinnung von CTT-Einzelstandards

Aufgrund der Tatsache, dass CTTs vor 1994 als Einzelstandards nicht kommerziell verfügbar waren, erfolgte die Quantifizierung der in Umweltproben enthaltenen CTT-Rückstände bis dahin mit dem technischen Gemisch als Referenzstandard. Wie aus **Abb. 2**, **Kap. 2.1.1** ersichtlich wird, ist eine Trennung aller Einzelverbindungen des technischen Gemisches selbst mit Hilfe der hochauflösenden GC nicht möglich. Da einzelne CTTs sowohl bei der GC mit Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD) als auch unter Einsatz der massenspektrometrischen Detektion mit negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-MS)

unterschiedliche Responsefaktoren aufweisen, können die Gehalte unbekannter CTTs in Proben ohne Vergleichsstandards nicht exakt bestimmt werden.

Deshalb wurden bereits seit Anfang der siebziger Jahre Versuche unternommen, CTTs zu isolieren und zu charakterisieren. Allerdings ist die selektive Totalsynthese höherchlorierter CTTs bisher nicht gelungen [69]. Daher wurden andere Wege eingeschlagen, um dennoch relevante CTT-Standards zu erhalten:

1.) *Isolierung einzelner CTTs aus dem technischen Gemisch.*

Mit Hilfe der Adsorptionschromatographie an Kieselgel gelang Casida *et al.* [70] und Seiber *et al.* [71] die Isolierung von B7-515 (vgl. **ATab. 1**), welches zu 3 - 4 % im technischen Gemisch enthalten ist. Chandurkar *et al.* und Krock *et al.* konnten durch die Isolierung von B9-1679 bzw. B7-1453 umweltrelevante CTTs gewinnen und ihre Struktur aufklären [53][72].

2.) *Gewinnung einzelner CTTs durch gesteuerte Chlorierung isolierter Di- und Trichlorbornane.*

Durch den gezielten Einsatz reiner Ausgangsverbindungen (z.B. 2-*exo*,10-Dichlorbornan, vgl. **Abb. 3**) und definierter Mengen an Chlor resultieren bei der Synthese einfache Gemische erhalten, aus denen einzelne CTTs isoliert werden können [1][73][74][75].

3.) *Gewinnung einzelner CTTs durch partiellen Abbau mittels UV-Bestrahlung.* Bei dieser Verfahrensweise wird die unterschiedliche Stabilität von CTTs unter UV-Bestrahlung zur Vereinfachung des CTT-Musters ausgenutzt, was Burhenne *et al.* zur Isolierung von B9-1679 anwendeten [74].

4.) *Isolierung von CTTs aus Umweltproben.*

Die vereinfachten Rückstandsmuster in kontaminierten Umweltproben ermöglichen eine effektive Isolierung relevanter Einzelverbindungen. Auf diesem Wege wurden bereits 1992 die Hauptkongenere B8-1413 und B9-1679 isoliert und strukturell aufgeklärt [60][76]. Diese Methode eignet sich zur Strukturaufklärung umweltrelevanter CTTs, besitzt aber den Nachteil, dass hoch belastetes Material vorliegen muss und die zu gewinnenden Mengen gering sind.

### 2.2.3 Kommerziell und nicht kommerziell erhältliche CTTs

Die seit Mitte der neunziger Jahre kommerziell erhältlichen Toxaphenstandards wurden in den Arbeitskreisen von H. Parlar (Technische Universität München), und V. A. Nikiforov (Universität von St. Petersburg, Russland) hergestellt. Parlar *et al.* stellten u.a. einen

sogenannten „22“-Komponentenstandard her [77], der 18 polychlorierte Bornane und fünf polychlorierte Camphene enthält und von der Firma Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) bezogen werden kann. Von der Arbeitsgruppe um V. A. Nikiforov wurden u. a. durch Chlorierung von 2-*exo*,10,10-Trichlorbornan (B3-90) höher chlorierte Toxaphene synthetisiert [62][78]; gegenwärtig werden 45 dieser CTTs von der Firma LGC Promochem (Wesel) vertrieben. Die chemischen Namen aller kommerziell erhältlichen bzw. in der Literatur beschriebenen Chlorbornane, -bornene, -camphene und -dihydrocamphene sind im **ATab. 1** aufgeführt.

### 2.3 Toxaphenrückstände in der Umwelt

Wegen seiner relativen Flüchtigkeit und Persistenz wird Toxaphen, wie andere chlorierte Kohlenwasserstoffe auch, weiträumig über die Atmosphäre verfrachtet [3][41]. Als Folge davon sind CTTs heute ubiquitär nachweisbar. Da die Kondensation verstärkt bei niedrigen Temperaturen erfolgt, kommt es zu einer Anreicherung von Toxaphen und anderen Organochlorverbindungen in Polarregionen. Dies konnte auch in Luftproben, wo CTT-Gehalte von 5,1 pg/m<sup>3</sup> (Alert, Northwest Territory, Kanada [7]) und 6,9 pg/m<sup>3</sup> (Resolute Bay, Northwest Territory, Kanada [79]) vorlagen, nachgewiesen werden.

Wie bei Multikomponentengemischen häufig beobachtet wurde, findet man auch im Fall des Toxaphens in der Umwelt Rückstandsmuster, die sich deutlich von der Zusammensetzung der ursprünglich ausgebrachten technischen Gemische unterscheiden und darüber hinaus matrixspezifisch sind. So unterscheiden sich die CTT-Rückstandsmuster in biologischen Proben (z.B. in marinen Organismen) stark von den in Böden und Sedimenten vorliegenden.

#### 2.3.1 Rückstände in biologischen Proben

Am besten untersucht ist die CTT-Belastung mariner Organismen, da sich Toxaphen dort aufgrund seiner Lipophilie und Persistenz in höheren Gliedern der Nahrungskette anreichert. Geyer *et al.* ermittelten für sieben CTTs Bioakkumulationsfaktoren (vgl. **Kap. 2.1**) von  $> 10^5$  für Fische und andere Meerestiere, wobei Werte dieser Größenordnung als charakteristisch für persistente chlorierte Kohlenwasserstoffe anzusehen sind [41].

Gegenstand vieler Untersuchungen waren Invertebraten (wirbellose Tiere), die ungefähr 95 % aller auf der Erde vorkommenden Tierarten ausmachen. Im aquatischen System findet man diese vor allem auf oder im Untergrund von Seen oder Meeren, so dass die Belastung der Sedimente und des umgebenden Wassers an chlorierten

Kohlenwasserstoffen auch in den Tieren wiederzufinden ist und diese somit umweltdiagnostisch eingesetzt werden können. So konnten in Invertebraten (*Cyclocaris guilelmi*) aus der Beaufort Sea 41 ng/g Trockenmasse [7], in Zooplankton aus dem Arktischen Ozean 24-160 ng/g Fett [80], in Amphipoden (*Eurythenes gryllus*) 2300 ng/g Feuchtmasse und in kleineren Tieren (*Anonyx*, *Tmetonyx*, *Onisimus*) ebenfalls aus dem Arktischen Ozean 143 ng/g Feuchtmasse bestimmt werden [81].

In Meeressäugern wurden bisher die höchsten CTT-Gehalte nachgewiesen [74][82][83], wobei der höchste CTT-Gehalt von ~ 80 mg/kg Fett im Bauchfett (Blubber) eines männlichen Weißschnauzendelphins (*Lagenorhynchus albirostris*) an der Küste Neufundlands bestimmt wurde [84]. Hohe CTT-Gehalte konnten auch in der Leber von Meer-Forellen (*Cynoscion nebulosus*, 780 µg/kg Naßgewicht) [85] und in Mummichogs (*Fundulus heteroclitus*, 4,5 mg/kg Naßgewicht) [8] an der Küste Georgias (USA) bestimmt werden. Jedoch waren auch in Europa CTT-Gehalte von 300 µg/kg Fett in Aalfilet aus dem Rhein (Niederlande) oder 200 µg/kg Fett in Schollenleber aus der Deutschen Bucht (Nordsee) nachweisbar [83].

Dank einer verbesserten Analytik und der Verfügbarkeit von CTT-Einzelstandards konnten im Rückstandsmuster mariner Organismen charakteristische CTTs identifiziert und individuell quantifiziert werden. Zum Beispiel wurden im Fettgewebe von Robben aus der Antarktis nur elf [86] und in Fischen > 30 Hepta- bis Nonachlor-CTTs nachgewiesen [87]. Braekevelt *et al.* konnten durch die Quantifizierung von 25 CTTs rund 60 % (9,8 µg/kg Nassgewicht) des Gesamttoxaphengehaltes in Flussforellen (*Salvenius namycush*) aus dem Jahr 1998 (Laberge-See, Yukon, Kanada) wiedergeben [7], wobei B8-1413, B8-2229 und B9-1679 die Hauptkomponenten waren. Ähnliches fanden Cleemann *et al.* in arktischen Saiblingen (*Salvelnius alpinus*), die 1994-1995 an der Küste Grönlands gesammelt wurden, wo durch die Summe von B8-1413, B9-1679 und B9-1025 rund 30 % des totalen Toxaphengehaltes (11-49 µg/kg Nassgewicht) dargestellt werden konnten [88]. Weiterhin waren in einem 1998 untersuchten Schwarzen Heilbutt (*Reinhardtius hippoglossoides*) aus dem Isländischen Becken CTT-Gehalte von 215 µg/kg Fett ( $\Sigma$  B8-1413, B9-1679 und B9-1025) gefunden worden [89]. Dabei repräsentierten diese drei CTTs rund 20 % der nachgewiesenen POPs (Chlordan, PCBs,  $\Sigma$ DDT, Hexachlorcyclohexan (HCHs), CTTs und polybromierte Diphenylether (PBDEs)).

In höheren Gliedern der Nahrungskette, wie z.B. Robben, konnten durch B8-1413 und B9-1679 bis zu 80 % aller nachweisbaren CTTs bestimmt werden [86]. Beide

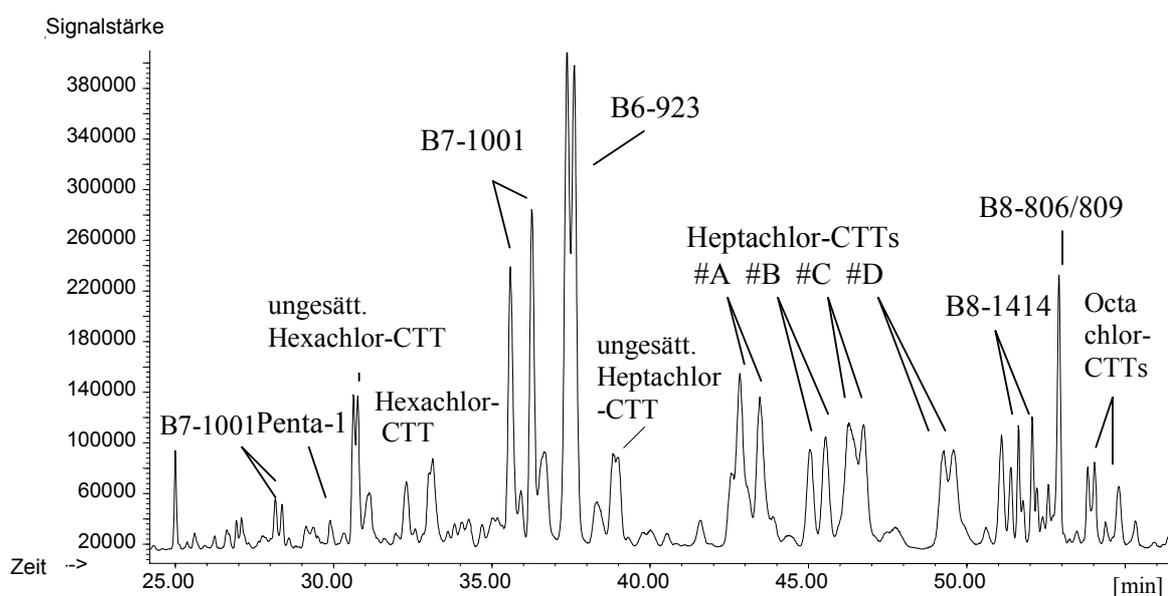
Hauptverbindungen wurden auch in Humanmilch von Frauen aus Nordrhein-Westfalen (1,5-7,2  $\mu\text{g}$  B8-1413 pro kg Fett und 4,4-13  $\mu\text{g}$  B9-1679 pro kg Fett) [90] und im Fettgewebe von Kindern aus Stralsund (2,4  $\mu\text{g}$  B9-1679 pro kg Fett für und 2,0  $\mu\text{g}$  B8-1413 pro kg Fett) [91] nachgewiesen.

Die gestaffelte Anordnung von vier Cl-Substituenten (*endo-exo-endo-exo*) im Sechsring erwies sich als wichtiges Strukturmerkmal für die Stabilität von CTTs (vgl. **ATab. 1**) [2]. So weisen neben B8-1413 und B9-1679 auch B8-1412 und B8-1414 dieses Strukturmerkmal auf. Diese vier CTTs und B8-2229, B8-1945 und B7-1453 wurden häufig in Organismen nachgewiesen [92].

### 2.3.2 Rückstände in Böden, Klärschlämmen und Sedimenten

Statt der in biologischen Proben häufig beobachteten Anreicherung von B8-1413, B9-1679 und anderen hochchlorierten CTTs wurde in Böden, Sedimenten und Klärschlämmen – im vgl. zu technischen Gemischen (**Abb. 2**) – wiederholt eine Verschiebung des GC-Profiles in Richtung früher eluierender und damit niederchlorierter CTTs gefunden [8][9][10][12].

Das Rückstandsmuster dieser Umweltproben wies häufig zwei Hauptsignale auf, die als B6-923 und B7-1001 identifiziert wurden (**Abb. 5**).



**Abb. 5** GC/ECNI-MS-Chromatogramm ( $\beta$ -BSCD-Säule) des CTT-Rückstandsmusters in einem belasteten Marschland in Georgia, USA [8]; Die Enantiomerentrennung einiger CTTs führt zu aufgespaltenen Signalen (vgl. Kap. 2.6.4)

Wie aus **Abb. 5** hervorgeht, ist das CTT-Rückstandsmuster häufig nicht auf diese zwei Hauptverbindungen beschränkt [8][9][11]. So wurden in dieser Probe außerdem auch unbekannte Penta-, Hexa- und Heptachlor-CTTs – darunter auch ungesättigte Verbindungen - nachgewiesen [8].

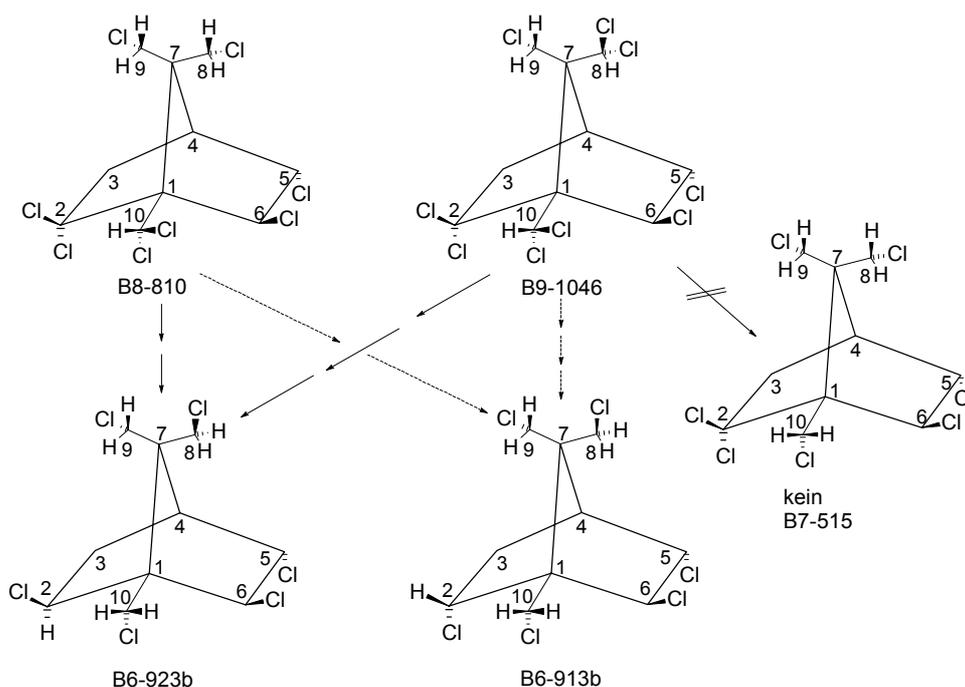
Neben den niederchlorierten CTTs wurden mit B8-1414, B8-2229, B8-806, B8-809 und B9-1679 zudem einige unter anaeroben Bedingungen scheinbar relativ stabile Octa- und Nonachlorbornane detektiert. Allerdings spielten diese hochchlorierten CTTs nicht die dominierende Rolle in technischen Gemischen, so dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit des CTT-Abbaus nicht nur vom Chlorierungsgrad abhängig ist [8][9].

Stern *et al.* zeigten, dass die Sedimentproben aus sechs kanadischen Seen bei Gehalten von 0,2-3,5 ng/g sehr unterschiedliche CTT-Rückstandsmuster aufwiesen [12]. Noch höhere Werte (bis 50 ng/g) bestimmten Pearson *et al.* [93] in Sedimenten der Großen Seen (Nordamerika) sowie Vetter und Maruya (7300 ng/g) [8] in Sedimenten eines lokal verunreinigten Ökosystems in Georgia (USA). Weiterhin fanden Rose *et al.* 1997 in Oberflächensedimenten des Lochnagar-Sees (Schottland) CTT-Gehalte von 14 ng/g, welche nur von drei der zum Vergleich aufgeführten 13 Seen Nordamerikas übertroffen wurden [94]. Der Michigan-See, einer dieser drei Seen, wies dabei mit bis zu 45 ng/g die höchsten CTT-Gehalte in Sedimenten der Jahre 1991/92 auf [93]. Weiterhin wurde 1997 für den Lochnagar-See im Oberflächensediment eine jährliche Toxaphen-Akkumulationsrate von 4,2 µg/m<sup>2</sup> bestimmt [94]. Interessanterweise wurden die höchsten CTT-Gehalte in altersdatierten Sedimentsegmenten aus dem Jahr 1990 gemessen, d.h. etwa 10-15 Jahre nach dem Maximum der CTT-Gehalte in Sedimenten von nordamerikanischen Seen [93]. Dies könnte auf das noch bis 1990 in der ehemaligen DDR produzierte und angewendete Melipax zurückzuführen sein (vgl. **Kap. 2.1.1**).

Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen CTT-Rückstandsmuster können die Art und der Zeitpunkt des CTT-Eintrags, die Zusammensetzung und Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen und die vorherrschenden Bedingungen (Redoxaktivität, pH-Wert, Temperatur, Nährstoffgehalt) genannt werden. Ferner bestimmt die Beschaffenheit von Böden und Sedimenten maßgeblich das Adsorptionsverhalten und somit die Verfügbarkeit der chlorierten Kohlenwasserstoffe für Abbauprozesse [4], so dass direkte Vergleiche nur bedingt möglich sind.

Parr und Smith berichten über eine rasche mikrobielle Transformation von Toxaphen in feuchtem, sandigem Lehmboden, wobei der anaerobe Abbau wesentlich schneller erfolgte als der aerobe [95]. Fünf Jahre nach dem Produktionsstopp von VEB Fahlberg List (Melipax-Produzent, Magdeburg) fand Fingerling [96] kaum Veränderungen im Toxaphen-Rückstandsmuster der belasteten aeroben Bodenproben und schlussfolgerte, dass der aerobe Abbau im Fall des Toxaphens nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Dagegen beobachteten Mirsatari *et al.* [97] innerhalb von sechs Wochen einen vollständigen CTT-Abbau in anaeroben Sedimenten, während im gleichen Zeitraum in anaeroben Böden nur Nona- und Decachlorbornane vollständig abgebaut wurden. Parlar *et al.* fanden nach fünfmonatiger Reaktionszeit von technischem Toxaphen in lehmigem Boden neben B6-923 auch einige Hexachlorbornene und ein Tetrachlorcamphen-2-on [10]. Buser *et al.* vermuteten, dass ungesättigte CTTs durch Dehydrochlorierung entstehen [9]. Murthy *et al.* beobachteten eine verhältnismäßig starke Anreicherung von Tetrachlor- und Hexachlor-CTTs und eine Abreicherung von Hepta- und Nonachlor-CTTs in einem anaeroben Boden [98]. Ein wichtiger Fortschritt bei der Erforschung des CTT-Abbaus gelang durch den Einsatz von Einzelkomponenten. So fanden Fingerling *et al.* nach Dotierung von anaeroben Böden mit sechs umweltrelevanten CTTs (B7-515, B8-806, B8-809, B8-810, B9-1046, B9-1049) einen Abbau zu den Hexachlorbornanen B6-923 und B6-913 (Abb. 6), die sich unter diesen Versuchsbedingungen als stabil erwiesen [13].



**Abb. 6** CTTs, die beim Abbau von B8-810 und B9-1046 gefunden wurden; B7-515 konnte nicht beobachtet werden [13]

Beide Hexachlor-CTTs unterscheiden sich nur in der Substitution an C-2, und somit weist die bevorzugte Bildung von B6-923 auf eine höhere Stabilität des 2-*exo*-Cl hin (**Abb. 6**). Da beim Abbau höherchlorierter Verbindungen (z.B. B9-1046 oder B8-810) kein B7-515 auftrat (**Abb. 6**), wurde vermutet, dass der Chlorabbau zunächst am C-2-Atom des Bornangerüstes stattfindet [13].

Als Mechanismus wurde die reduktive Dechlorierung an *gem*-Cls beschrieben [9][13]. Da nur sieben Kohlenstoffatome des Bornangerüstes chloriert sein können (vgl. **Kap. 2.2.1**), müssten alle Nona- und Octa- sowie viele Heptachlorbornane *gem*-Cls besitzen. In der Tat weisen die Hauptrückstände in Sedimenten B6-923 und B7-1001 keine *gem*-Cls auf und unterstützen somit diese These.

Die Beteiligung von Mikroorganismen am CTT-Abbau wurde durch den ausgebliebenen Abbau eines autoklavierten und sterilisierten Bodens belegt [13]. Auch wurden zwei Studien veröffentlicht, bei denen zum Abbau von Toxaphen Bakteriensuspensionen eingesetzt wurden. So konnte durch Isolierung von Bakterien aus einem belasteten Boden ein 90-%iger Abbau aller höherchlorierten CTTs und nach Abtötung der Mikroorganismen eine wesentlich geringere Transformation nachgewiesen werden [14]. Weiterhin beobachteten Clark und Matsumura bei der CTT-Inkubation mit dem Bakterium *Pseudomonas putida* sowohl einen anaeroben als auch einen aeroben Abbau [16], wobei unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 30 Tagen ein drei- bis vierfach schnellerer Abbau von Toxicant A (B8-806, B8-809) erreicht wurde. Trotz dieser Befunde war eine quantitative Beschreibung der CTT-Rückstandsmuster in Sedimenten, Böden und Klärschlämmen aus Mangel an niederchlorierten CTT-Standards bislang nicht möglich (vgl. **Abb. 5**).

## 2.4 Mikrobielle Dehalogenierung chlororganischer Verbindungen

Organochlorverbindungen gelten unter den in der Natur vorkommenden Bedingungen als persistent. Der Chlorierungsgrad wird als ein Parameter für die Umsatzgeschwindigkeit des mikrobiellen Abbaus chlorierter Xenobiotika angesehen. So wurde unter anaeroben Bedingungen ein Abbau von 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin unter Bildung von Tri- und Dichlorkongeneren beobachtet [99]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Abbauxperimente mit Chlorbenzol [100] und Tetrachlorethen (PCE) [101]. Inkubationen des technischen PCB-Gemisches Aroclor 1260 mit verschiedenen Bakterienkulturen ergaben unter anaeroben Bedingungen eine Abnahme höherchlorierter zugunsten einer Zunahme niederchlorierter (vor allem tetrachlorierter) PCBs [102]. In einem

nachgeschalteten aeroben Versuchsaufbau konnten 80 - 92 % dieser niederchlorierten PCBs abgebaut werden. Die sofortige aerobe Behandlung von Aroclor 1260 zeigte dagegen keinen nennenswerten Dechlorierungserfolg. Offenbar gelang der aerobe Abbau nur bei niederchlorierten PCBs. Weiterhin konnte bei einem gekoppelten anaerob-aeroben Prozess ein sequentieller Abbau von p,p'-DDT (vgl. **Abb. 1**) festgestellt werden [103]. Die sowohl anaerob als auch aerob lebende Bakterienkultur *Phanerochaete chrysosporium* dechlorierte anaerob über 80 % des DDTs zu p,p'-Dichlordiphenyldichlorethan (p,p'-DDD) und teilweise zu p,p'-Dichlordiphenyldichlorethen (p,p'-DDE, vgl. **Abb. 1**). Beim folgenden aeroben Prozess wurde etwa 50 % des DDD und 30 % des DDE abgebaut. Sofortige aerobe Bedingungen ermöglichten dagegen - sowohl mit *P. chrysosporium* als auch bei Einsatz einer Mischkultur - nur einen Abbau von < 3,5 % des eingesetzten DDTs.

Im Falle des Toxaphens konnten lediglich als Nebenprodukte des anaeroben Abbaus in Böden lediglich ein Tetrachlorcamphen-2-on [10] und beim Abbau von B7-515, B8-806 und B8-809 ein 7,8,9-Trichlorcamphen-2-on [104] gefunden werden. Somit scheint die Oxidation des Kohlenstoffgerüsts bei CTTs nur in untergeordnetem Maße stattzufinden.

Die Dechlorierung erfolgt entweder kometabolisch oder metabolisch in einer spezifischen Reaktion, die mit einem Energiegewinn (ATP-Synthese) für die Zelle verbunden sein kann [105]. Da bei kometabolischen Prozessen neben den chlorierten Verbindungen auch andere primäre Energiequellen vorhanden sein müssen [105], laufen diese in der Regel wesentlich langsamer als metabolische Prozesse ab. Als wichtigste Form einer metabolischen, reduktiven Dechlorierung wurde die sogenannte Dehalorespiration beschrieben, bei der chlorierte Verbindungen (z.B. chlorierte Ethene oder Phenole) als terminale Elektronenakzeptoren in einer anaeroben Atmungskette fungieren [106]. Die Elektronen für diese Reaktion können aus Formiat, H<sub>2</sub> oder komplexeren organischen Substanzen, wie z.B. Lactat, stammen.

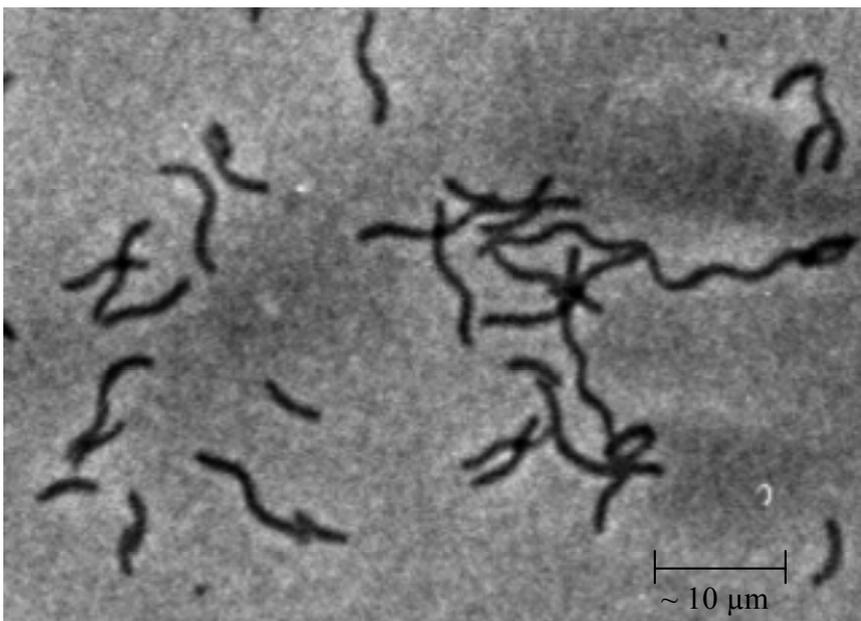
Inzwischen konnten einige zur Dehalorespiration befähigte Bakterien aus Klärschlamm sowie Fluss- und Meeressedimenten isoliert werden [107]. Diesbezüglich gut untersuchte Organismen sind *Desulfomonile tiedjei* [108], einige *Desulfitobakterien* wie *D. hafniense* [109] und *Dehalospirillum multivorans* [110]. *D. tiedjei* und *D. hafniense* zeigten vor allem beim Abbau von Aromaten (z.B. Pentachlorphenol) ihr reduktives Potential, welches *D. multivorans* beim Abbau von Chlorethenen demonstrierte. Seine konstitutiven Dechlorierungseigenschaften und seine relativ hohen Wachstumsraten machen *D.*

*multivorans* zu einem idealen Testobjekt für den anaeroben Abbau chlorierter aliphatischer Kohlenwasserstoffe. Zur Untersuchung des anaeroben Abbaus von Toxaphen wurde deshalb in dieser Arbeit auf *D. multivorans* zurückgegriffen.

#### 2.4.1 *Dehalospirillum multivorans*

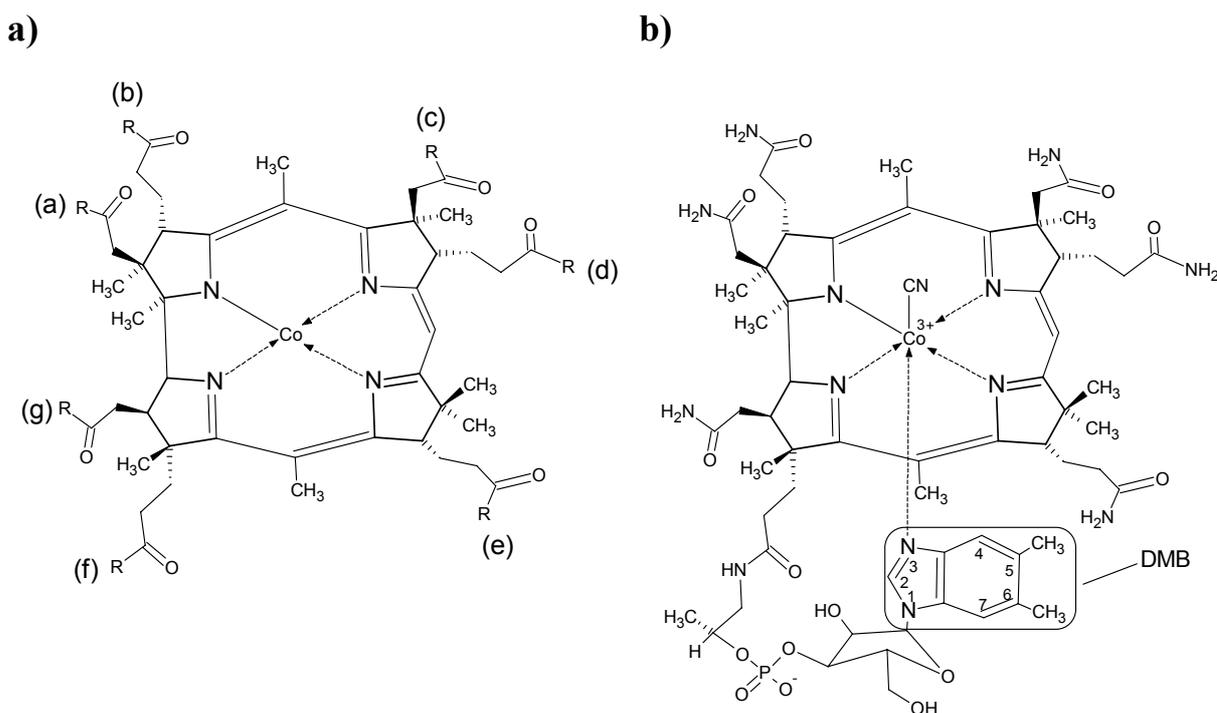
*D. multivorans* (aus dem lat. „dechlorierender Vielfresser“ der Familie Spirillum) ist ein gram-negatives, strikt anaerobes Bakterium, welches ursprünglich aus Klärschlamm isoliert wurde (**Abb. 7**) [110]. Es ist in der Lage, allein mit Wasserstoff (oder Formiat) und PCE als einziger Energiequelle sowie mit Acetat als Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Die in *D. multivorans* vorkommende Dehalogenase nimmt eine Schlüsselposition beim reduktiven Abbau ein. So katalysiert sie die reduktive Dechlorierung von PCE über Trichlorethen (TCE) zu Dichlorethen (DCE). Zum Substratspektrum des Enzyms gehören neben PCE und TCE auch chlorierte Propene, Tri- und Dichloracetate, Hexachlorethan, chlorierte Acetamide und Tetrachlormethan [112]. Die PCE-Dehalogenase (Molekulargewicht 57 kDa) wurde aus der wasserlöslichen Fraktion des Bakteriums isoliert und gereinigt [113]. Als Kofaktoren wurden ein Corrinoïd und zwei Eisen-Schwefel-Zentren identifiziert [114]. Der Corrinoïd-Kofaktor bildet das katalytische Zentrum des Enzyms [107][115]. Kürzlich wurde die Struktur des Corrinoïds als  $\text{Co}_\beta$ -Cyano- $\text{Co}_\alpha$ -7'-AdeninyI-176-Norcobamid (NCA, Norpseudovitamin B<sub>12</sub>) charakterisiert [107].



**Abb. 7** Mikroskopische Aufnahme von *D. multivorans* [111]

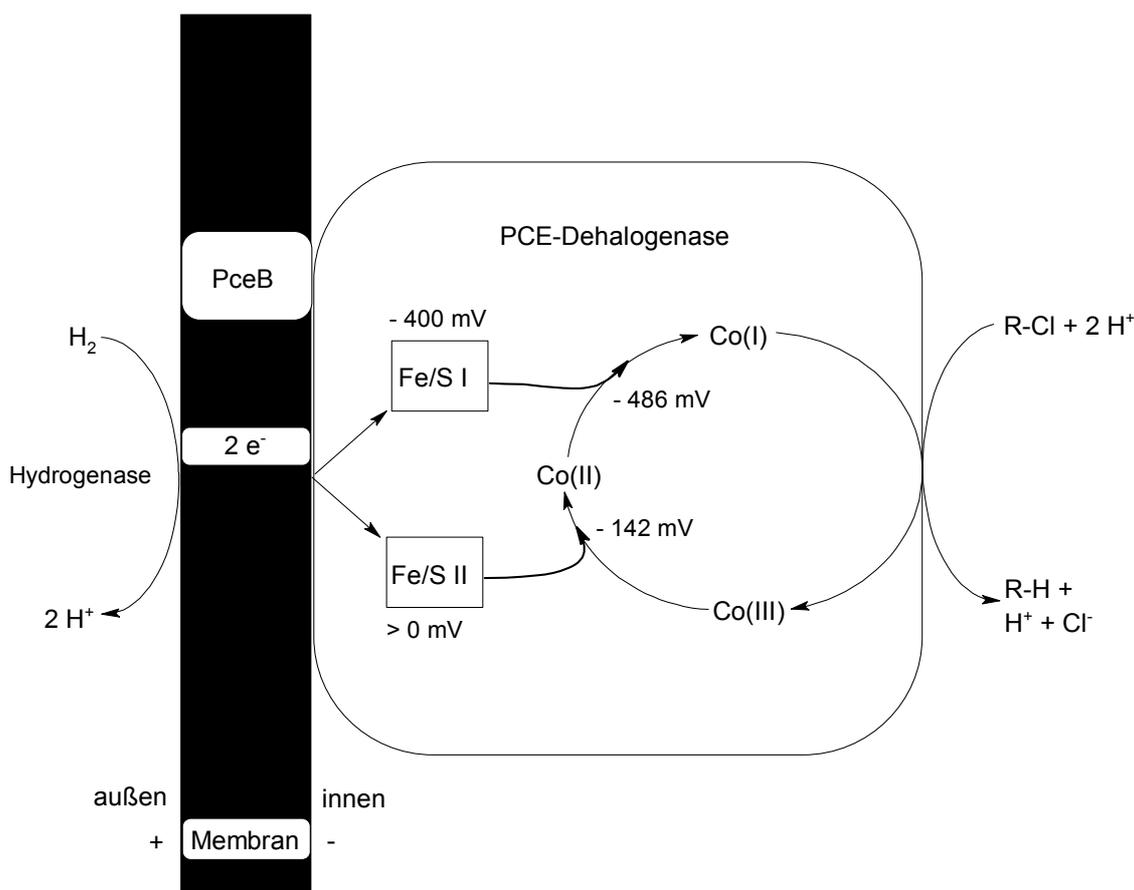
Die Nomenklatur der dem Vitamin B<sub>12</sub> ähnlichen Verbindungen – zu dem auch das NCA gehört – ist dabei sehr kompliziert. Alle diese Verbindungen weisen das 19 gliedrige Uroporphyrin-Grundgerüst Corrin auf und werden daher als Corrinoiden bezeichnet [116]. Ein Corrinring mit desamidierten Seitenketten bekommt den Trivialnamen Cobyrynsäure (**Abb. 8a**). Das Hexaamid der Cobyrynsäure, das in f-Position eine D-1-Amino-2-propanol-Gruppe aufweist, wird als Cobinamid bezeichnet (**Abb. 8a**). Ist an der 2-Position des Aminopropanols ein  $\alpha$ -D-Ribofuranose-3-phosphat gebunden, heißt die Verbindung Cobamid [116]. Dabei werden Cobamide mit einer  $\alpha$ -glycosidisch gebundenen 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB)-Base als Cobalamine bezeichnet. Dementsprechend bekommt  $\alpha$ -5,6-Dimethylbenzimidazolyl-cobamid-cyanid einfach den Namen Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>, **Abb. 8b**). Verbindungen mit ein- bzw. zweiwertigem Kobalt bekommen den Zusatz „s“ (superreduziert) bzw. „r“ (reduziert).



**Abb. 8** Strukturformel (a) der Cobyrynsäure ( $R = OH$ ) und (b) des Cyanocobalamins (CCA, Vitamin B<sub>12</sub>); Dicyanocobinamid (DCC) ergibt sich beim Austausch des unteren Liganden 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB) mit  $CN^-$  [116]

Die reduktive Dechlorierung von PCE durch die PCE-Dehalogenase von *D. multivorans* läuft vermutlich nach dem in **Abb. 9** dargestellten Reaktionsmechanismus ab [107][117].

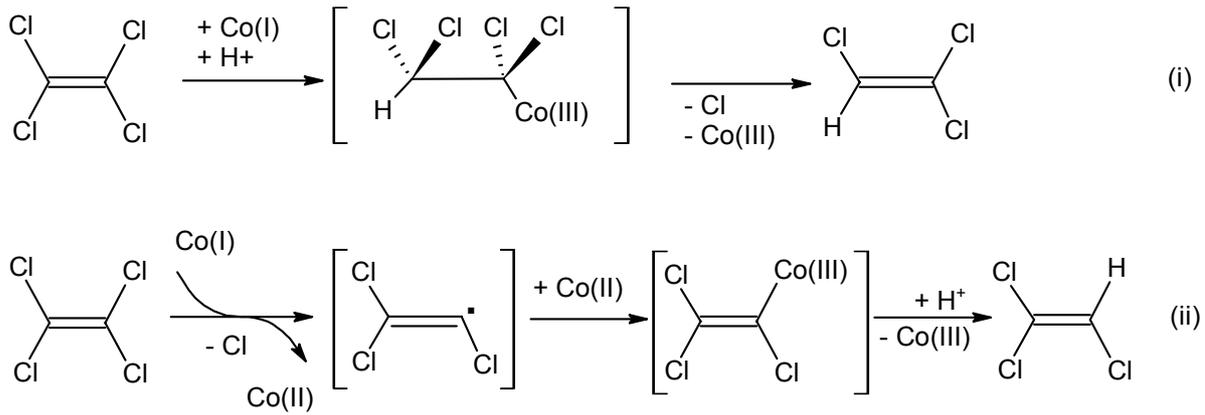
Die von Hydrogenasen zur Verfügung gestellten Elektronen werden (wahrscheinlich mit Hilfe eines revertierten Elektronentransports) auf ein Eisen-Schwefel (Fe/S)-Zentrum mit niedrigem bzw. hohem Redoxpotential übertragen (**Abb. 9**, linke Hälfte).



**Abb. 9** Modell der reduktiven Dechlorierung von PCE durch die PCE-Dehalogenase von *D. multivorans*; Fe/S – Eisen-Schwefel-Zentrum, Co(I–III) → Oxidationsstufe des Kobalts im NCA, PceB – Membrananker der PCE-Dehalogenase [107]

Die beiden Fe/S-Zentren überführen das dreiwertige Zentralatom Kobalt des Corrinoide sukzessive zum einwertigen Kobalt (Redoxpotentiale, **Tab. 3**) [107]. Das auf diese Weise entstandene superreduzierte NCA<sub>s</sub> ist dann in der Lage, chlorierte Substrate zu reduzieren. Für diese Reduktion werden folgende zwei Mechanismen diskutiert (vgl. **Abb. 10**):

- i) die Addition des NCA<sub>s</sub> an das chlorierte Substrat und anschließende  $\beta$ -Eliminierung von Chlorid. Das freigesetzte NCA wird durch die Eisen-Schwefel-Zentren wieder in die superreduzierte Form überführt [106] (**Abb. 10**, oben) oder
- ii) die Übertragung eines Elektrons von NCA<sub>s</sub> auf das chlorierte Substrat, wobei Chlorid freigesetzt und gleichzeitig ein intermediäres Alkylradikal gebildet wird; im zweiten Reduktionsschritt erfolgt nun die Oxidation von NCA<sub>r</sub> - zu NCA unter gleichzeitiger Übertragung des Elektrons auf ein H<sup>+</sup>, das an das Alkylradikal gebunden wird (**Abb. 10**, unten) [15]. Das dechlorierte Endprodukt wird dabei protonolytisch vom Corrinoide abgespalten. Das freigesetzte NCA wird anschließend durch die Eisen-Schwefel-Zentren wieder in die superreduzierte Form überführt.

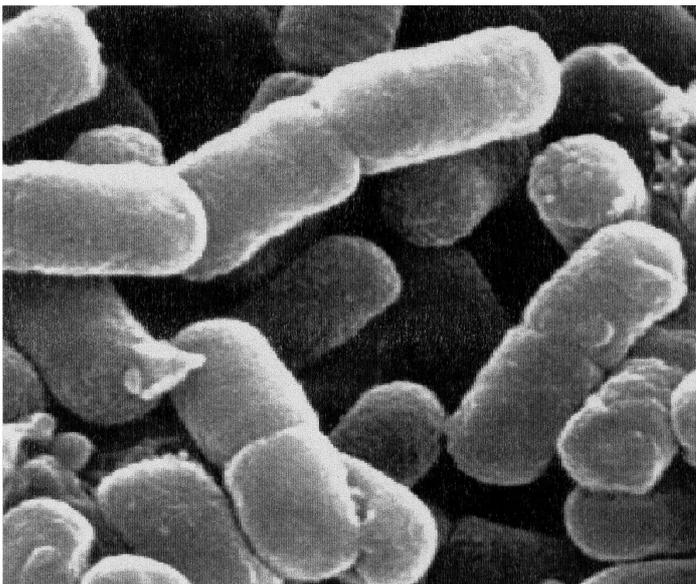


**Abb. 10** Hypothetische Reaktionsmechanismen beim reduktiven PCE-Abbau durch PCE-Dehalogenase,  $\text{Co(I-III)} \rightarrow$  Oxidationsstufe des Kobalts im NCA [15][106]

Da die Dechlorierung von PCE auch in Zellen aus Kulturen mit Pyruvat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor bewiesen werden konnte, ist die Dechlorierungsaktivität konstitutiv in den Zellen von *D. multivorans* vorhanden [101]. Ein Vergleich der Abbauraten mit Dehalogenasen anderer dechlorierender Mikroorganismen ergab bei der PCE-Dehalogenase von *D. multivorans* eine drei- bis zehnfach höhere Dechlorierungsgeschwindigkeit [117][118].

#### 2.4.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (**Abb. 11**), von dem bisher in der Literatur keine Nachweise über dechlorierende Eigenschaften vorlagen, wurde als Vergleichskultur eingesetzt [15].



**Abb. 11** Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme von *E. coli* [120]

Bei dem zur Familie der Enterobakterien (*Enterobacteriaceae*) gehörenden *E. coli* handelt es sich um fakultativ anaerobe, gram-negative Bakterien, die teilweise kokkoid sind (**Abb. 11**) und ubiquitär in Wasser, Böden und im Stuhl vorkommen [119].

## 2.5 Abiotischer Abbau von Toxaphen

In abiotischen Prozessen wird der reduktive Abbau nicht durch lebende Bakterien und aktive Enzyme, sondern durch temperaturstabile Kofaktoren und Reduktionsmittel katalysiert. Bisher liegen in der Literatur nur wenige Kenntnisse über den abiotischen Abbau von Toxaphen vor. Vor allem in der Mitte der siebziger Jahre untersuchten Casida und Mitarbeiter das abiotische Verhalten von Toxaphen mit reduziertem Hämatin (Ferrihämhydroxid) und reduziertem Cytochrom P450 [121][122]. Bei Untersuchungen der Isolate B8-806, B8-809 und B7-515 wurden als Hauptabbauwege die reduktive Dechlorierung und Dehydrochlorierung beschrieben. Dabei wurde jeweils das enthaltene Eisen(II)protoporphyrin-System als Reaktionszentrum vorgeschlagen [122]. Saleh und Casida erreichten durch Einsatz von reduziertem Hämatin innerhalb von zwei Stunden einen 85-%igen Abbau von B7-515 und B8-806/809 und fanden als Hauptprodukte die Hexachlorbornane B6-923 und B6-913 (vgl. **Abb. 6**) [121].

Die Befunde nach Einsatz von Hämatin legten nahe, dass Cyanocobalamin (CCA, siehe **Abb. 8**) und andere Corrinoide sich besonders zur Dechlorierung von chlorierten Verbindungen im allgemeinen und CTTs im speziellen eignen. Corrinoide können die mikrobielle Dechlorierung sowohl abiotisch als auch als Kofaktoren in Enzymen katalysieren [112][123][124][125]. Die Dechlorierungsraten sind abhängig vom eingesetzten Corrinoide [126]. So enthält die aus dem Bakterium *D. multivorans* isolierte PCE-Dehalogenase NCA (**Tab. 3**), das z.B. Hexachlorethan etwa 20-mal schneller umsetzen kann als CCA [107].

Die Redoxpotentiale der mit CCA verwandten Corrinoide sind dabei abhängig von den jeweiligen Liganden (**Tab. 3**) [127]. Da das Kobalt für abiotische Dechlorierungen in die superreduzierte Form (z.B. CCA<sub>s</sub>) überführt werden muss, ist ein entsprechend starkes Reduktionsmittels notwendig, wie z.B. Titan(III)citrat [128]. Der Reduktionszustand wird durch die Färbung der Lösung sichtbar. CCA ist durch ein kräftiges Rosa, CCA<sub>r</sub> durch einen bräunlichen und im CCA<sub>s</sub> durch einen hellgelben Farbeinschlag gekennzeichnet, was anhand verschiedener Absorptionsmaxima in den VIS-Spektren deutlich wird (**Tab. 3**).

**Tab. 3** Axiale Liganden und spektrale Eigenschaften der besprochenen Corrinoid

Corrinoid	Oberer Axial-ligand ( $\beta$ )	Unterer Axial-ligand ( $\alpha$ )	Absorptions maxima	$\epsilon$ (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Redoxpotential	
					Co <sup>III/II</sup>	Co <sup>II/I</sup>
Norpseudovitamin B <sub>12</sub> (NCA)	CN <sup>-</sup>	Adenin	360 nm 548 nm	23,21 <sup>a</sup> 6,78 <sup>a</sup>	- 142 mV	- 486 mV
Dicyano cob(III)inamid	CN <sup>-</sup>	CN <sup>-</sup>	368 nm 583 nm	30,4 <sup>b</sup> 9,9 <sup>a</sup>	- 212 mV	- 459 mV
Cyanocob(III)alamin (CCA)	CN <sup>-</sup>	DMB	361 nm 551 nm	28,06 <sup>b</sup> 8,74 <sup>b</sup>	- 425 mV	- 662 mV
Cob(II)alamin (CCA <sub>r</sub> <sup>c</sup> )	-	DMB	473 nm	9,2 <sup>b</sup>		
Cob(I)alamin (CCA <sub>s</sub> <sup>c</sup> )	-	-	386 nm	28,0 <sup>b</sup>		

<sup>a</sup> [107], <sup>b</sup> [116]

<sup>c</sup> r: reduziert, s: superreduziert

Das superreduzierte Corrinoid dechloriert Substanzen (Elektronenakzeptor) und wird dabei selbst durch Überführung seines Zentralatoms Kobalt in die dreiwertige Form oxidiert, welches wiederum von Ti(III)citrat zu Co<sup>+</sup> reduziert wird. Der kontinuierlich ablaufende Kreisprozess ist durch die eingesetzte Menge an Ti(III)citrat und Substrat begrenzt. Auf diesem Wege konnten neben einer Reihe von halogenierten Alkanen (Tetrachlorethan, Hexachlorethan) [115][129] auch chlorierte Acetamide, Acetate und PCBs [130] umgesetzt werden.

Bei dem von Schanke und Wackett untersuchten Abbau von polychlorierten Ethanen überwog die Eliminierung (78-82 %) deutlich gegenüber der reduktiven Dechlorierung, so dass es überwiegend zur Bildung von chlorierten Ethenen kam [115]. Dagegen erfolgte der Abbau von nur an C-1 substituierten Chlorethan allein durch reduktive Dechlorierung. Dies wurde auch bei ungesättigten Verbindungen, wie PCE und Trichlorpropen gefunden [126].

Der mit einer methanogenen Bakterienkultur erreichte Abbau von Chloroform wurde durch den Zusatz von CCA um das Zehnfache erhöht. Interessant war hierbei, dass das Verhältnis der Abbauprodukte Dichlormethan und Kohlendioxid durch den Zusatz von CCA in Richtung des Kohlendioxids verschoben wurde [129], was einer erhöhten Mineralisierung entspricht.

## 2.6 Analytik von Toxaphenverbindungen

Um eindeutige Aussagen über das ökochemische Verhalten von Toxaphen machen zu können, müssen seine Bestandteile möglichst selektiv und sensitiv nachgewiesen werden. Umweltproben weisen meist ein komplexes Muster verschiedener Xenobiotika auf. Für eine erfolgreiche Rückstandsanalytik von Toxaphen mit Hilfe der Kapillargaschromatographie und hochempfindlicher Detektionssysteme (Elektroneneinfangdetektor oder Massenspektrometer) ist eine vorherige effiziente Reinigung der extrahierten Probe erforderlich. Dabei finden allgemein bekannte Methoden Anwendung, wie Fettabtrennung durch Gelpermeationschromatographie (GPC), Entfernung elementaren Schwefels mit Kupfer, Clean-up-Schritte mit konzentrierter Schwefelsäure und Fraktionierung durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel, Florisil oder Aluminiumoxid [1][2].

### 2.6.1 CTT-Bestimmung durch Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD)

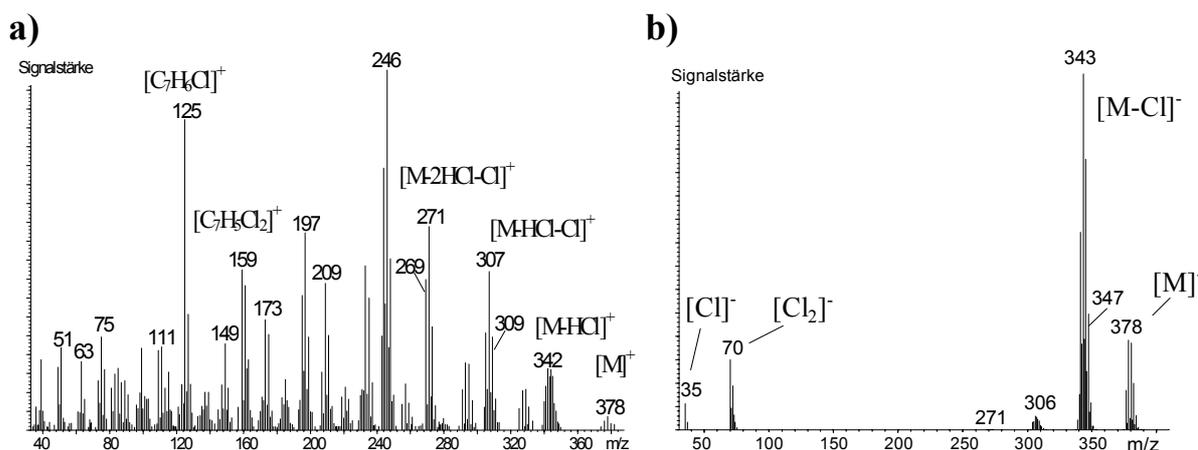
Der Elektroneneinfangdetektor zeigt chlorierte Kohlenwasserstoffe mit Nachweisgrenzen im unteren Pikogramm-Bereich sehr empfindlich und selektiv an. Die Identifizierung einer Substanz erfolgt über den Retentionszeitvergleich mit Referenzstandards. Da jede Verbindung Elektronen unterschiedlich stark einzufangen vermag, resultieren für chlorierte Kohlenwasserstoffe und somit auch für CTTs Responsefaktoren, die um den Faktor 2 und mehr variieren können [56]. Eine exakte quantitative Bestimmung ist daher nur möglich, wenn für jede Verbindung ein Vergleichsstandard bekannter Konzentration zur Verfügung steht.

Aufgrund der hohen Anzahl von Toxaphenverbindungen im technischen Gemisch ist eine vollständige Trennung aller CTTs an den bisher bekannten Kapillarsäulen, wie z. B. 5 % Phenyl- und 95 % Dimethylpolysiloxan (DB-5), nicht möglich, so dass es häufig zu Koelutionen wie im Fall von B7-495/B7-515, B8-531/B8-1414/B8-1945, B8-806/B8-809 und B9-743/B9-2006 kommt. Daher sollten bei Anwendung der GC/ECD stets zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität eingesetzt werden, wodurch im Idealfall Koelutionen vermieden werden. Eine andere Möglichkeit, Koelutionen zu vermeiden und die Trennleistung insgesamt zu verbessern, eröffnet der Einsatz multidimensionaler GC [22][25][131], d.h. der Betrieb von zwei in Reihe geschalteten Kapillarsäulen

unterschiedlicher Polarität. Dabei kann ein frei wählbarer Ausschnitt des Eluats zu einem beliebigen Zeitpunkt von der ersten Trennsäule direkt in die zweite überführt werden.

## 2.6.2 CTT-Bestimmung durch Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS)

Die beiden wichtigsten Ionisierungsarten in der massenspektrometrischen Detektion von CTTs nach der GC-Trennung stellen die Elektronenstoßionisierung (*electron impact ionisation*, EI) und die ECNI dar. Die ECNI-MS ist die am häufigsten eingesetzte massenspektrometrische Methode, mit der - aufgrund der hohen Elektronenaffinität halogenreicher Verbindungen - CTTs empfindlich nachgewiesen werden können [82]. Die Empfindlichkeit der EI-MS ist durch die stark fragmentierten Spektren (**Abb. 4a**) rund zehn- bis 100-fach geringer als die der fragmentarmen ECNI-MS (**Abb. 4b**) und wurde daher vor allem zur Strukturaufklärung unbekannter CTTs eingesetzt [2].



**Abb. 12** Massenspektrum von B7-1001 nach GC-Trennung und a) EI-MS sowie b) ECNI-MS

Neben den beiden Ionisierungsarten wurden drei Massenanalytoren verwendet. Sektorfeld-Instrumente, bei denen eine Doppelfokussierung des Ionenstrahls mittels eines magnetischen und eines elektrischen Sektorfelds erfolgen kann, werden vor allem für hochauflösende Massenspektrometer (HRMS) eingesetzt [7]. Quadrupol-Systeme zeichnen sich zwar nicht durch hohe Auflösungen  $R$  ( $\sim 1000$ , vgl. **Gleichung 2**) aus, doch können diese leichter kalibriert und fokussiert werden, und sie verfügen über eine höhere Stabilität im Dauerbetrieb. Darüber hinaus ist vor allem im „*selected ion monitoring*“ (SIM)-Modus,

in dem nur wenige Ionen detektiert werden, unter ECNI-Bedingungen ein empfindlicher Nachweis von CTTs bis in den niedrigen Pikogramm-Bereich möglich [2].

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2)$$

Als dritter Massenanalysator tritt immer mehr die elektrische Ionenfalle (*Ion trap*) in den Vordergrund, bei dem durch die Aufkonzentrierung der Ionen im Analysator und durch den Beschuss mit einem Kollisionsgas weitere Zerfälle induziert werden können. Bei selektiver Detektion von Elternion→Tochterion-Übergängen kann eine ähnliche Sensitivität wie bei Quadrupol-Systemen im SIM-Modus erreichen werden [132].

#### 2.6.2.1 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach Elektronenstoßionisierung (GC/EI-MS)

Molekülionen ( $[M]^+$ ) - wie im Fall von B7-1001 (**Abb. 12a**) - werden in EI-MS-Spektren höherchlorierter CTTs nur selten beobachtet. Die Hauptfragmente entstehen durch eine schrittweise Abspaltung von Cl, HCl, CHCl<sub>2</sub> oder CH<sub>2</sub>Cl aus dem Molekülion [38]. Bei C<sub>8</sub>-Fragmenten handelt es sich häufig um Retro-Diels-Alder (RDA)-Produkte [133]. Das Monochlortropyliumion  $[C_7H_6Cl]^+$  (m/z 125) ist eines der intensivsten Fragmentationen oberhalb von m/z 100 und wird von allen CTTs gebildet. Zusätzlich sind das Trichlortropyliumion (m/z 193) und das Dichlortropyliumion (m/z 159) typische Fragmente unter GC/EI-MS-Bedingungen (**Abb. 12**) [1].

Unterschiede in den CTT-Responsefaktoren spielen bei der GC/EI-MS (*Fullscan*: Faktor 3) eine wesentlich geringere Rolle als bei der GC/ECNI-MS (*Fullscan*: Faktor 10) [56], so dass die EI-MS, vor allem in der Kopplung mit der Tandem-MS (MS/MS) Technik, zur Identifizierung und Quantifizierung von CTTs Anwendung fand [134][135]. Der Einsatz einer Ionenfalle als Massenanalysator in der EI-MS/MS-Technik ermöglichte neben den einheitlichen Responsefaktoren auch eine empfindliche CTT-Detektion im niedrigen Pikogramm-Bereich [136]. Chan *et al.* schlugen das Dichlortropyliumion (m/z 159) und das Monochlortropyliumion (m/z 125) als Elternionen und deren Dissoziation zu m/z 125 und m/z 89 für die GC/EI-MS/MS vor [137]. Durch Skopp *et al.* wurden als Elternionen die Massenfragmente m/z 303 und m/z 305 vorgeschlagen, wobei die Kombination m/z 125/303 bei vier CTTs (B8-1413, B7-515, B9-1679 und B9-1025), sowohl hinsichtlich der Responseschwankungen (Faktor 2) als auch der Nachweisgrenzen (0,9-2,0 pg), die besten Ergebnisse lieferte [136].

### 2.6.2.2 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-MS)

Bei der ECNI-MS handelt es sich um eine relativ schonende Ionisierungsart. Durch Wechselwirkung der in einer Glühkatode erzeugten energiereichen Elektronen mit einem Reaktandgas (z. B. Methan, Argon), wird eine große Anzahl energiearmer Elektronen gebildet, welche die Probenmoleküle ionisieren [138]. Die im Vergleich zur EI-MS wesentlich geringere übertragene Energie unterbindet weitgehend Fragmentierungsreaktionen der Probenmoleküle.

Polychlorierte Bornane mit einem Chlorierungsgrad  $\geq 5$  bilden unter ECNI-MS-Bedingungen intensive  $[M-Cl]^-$ -Fragmentationen [3], wobei mit sinkendem Chlorierungsgrad das  $[M]^-$  - Ion an Bedeutung gewinnt [139]. Die Chlorisotopen  $^{35}Cl$  und  $^{37}Cl$  führen, entsprechend der natürlich vorkommenden Häufigkeit, zur Ausbildung von Chlorisotopenmustern, aus denen die zwei intensivsten Fragmentationen zur Identifizierung und Quantifizierung herangezogen werden (**Tab. 4**). Einzelne CTTs weisen sehr unterschiedliche ECNI-Responsefaktoren auf, die eine Verwendung von CTT-Einzelstandards zur Quantifizierung notwendig machen [2].

**Tab. 4** Intensive Masse- zu Ladungs-Verhältnisse ( $m/z$ ) der  $[M-Cl]^-$  - Fragmentationen von ausgewählten chlorierten Bornanen und Bornenen

Summenformel	Molekülion <sup>a</sup>	Ion zur Quantifizierung (Q) <sup>b,c</sup>	Ion zur Identifizierung (I) <sup>b,c</sup>	Theor. Verhältnis Q/I [%] [139]	SIM Fenster <sup>d</sup>
C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>5</sub>	305,9303	272,9584 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	270,9614 [M-Cl] <sup>-</sup>	100:77,96	1
C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>5</sub>	307,9459	274,9740 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	272,9770 [M-Cl] <sup>-</sup>	100:77,96	1
C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>6</sub>	339,8914	306,9195 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	308,9165 <sup>e</sup> [M+4-Cl] <sup>-</sup>	100:63,94	1
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>6</sub>	341,9070	308,9351 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	310,9321 [M+4-Cl] <sup>-</sup>	100:63,94	1, 2
C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>7</sub>	375,8681	342,8962 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	344,8932 [M+4-Cl] <sup>-</sup>	100:79,95	1, 2
C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>8</sub>	409,8292	376,8573 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	378,8543 [M+4-Cl] <sup>-</sup>	100:93,95	2, 3
C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>9</sub>	443,7903	412,8154 [M+4-Cl] <sup>-</sup>	410,8184 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	100:89,34	3
C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>10</sub> <sup>f</sup>	477,7514	446,7765 [M+4-Cl] <sup>-</sup>	444,7795 [M+2-Cl] <sup>-</sup>	100:78,17	

<sup>a</sup> Mit folgenden Isotopenmassen wurde gerechnet:  $^{35}Cl$ : 34,9689,  $^{37}Cl$ : 36,9659;  $^1H$ : 1,0078;  $^{12}C$ : 12,0000.

<sup>b</sup>  $[M+2-Cl]^-$  bedeutet einen Austausch eines  $^{35}Cl$  durch  $^{37}Cl$ ,  $[M+4-Cl]^-$  entspricht einem doppelten Austausch von  $^{35}Cl$  durch  $^{37}Cl$ .

<sup>c</sup> Bei Anwendung eines Quadrupolgerätes wird auf ganze Massen gerundet.

<sup>d</sup> SIM Fenster (HRMS), 1: 10 – 20,3 min, 2: 20,3 – 26 min, 3: 26 – 35 min

<sup>e</sup> Fragmentation  $m/z$  304,9225  $[M-Cl]^-$  wurden bei ECNI-High Resolution-MS gemessen.

<sup>f</sup> Decachlorbornane wurden nur beim Abbau von technischem Toxaphen einbezogen.

Eine weitere Absicherung sollte durch Einsatz geeigneter interner Standards erfolgen, mit deren Hilfe Schwankungen zwischen Injektionen - vor allem in der Ionenquelle - korrigiert werden können. Leider sind bisher keine isotopenmarkierte CTTs auf dem Markt verfügbar, so dass auf andere interne Standards, wie z.B.  $^{13}\text{C}$  markiertes Mirex, zurückgegriffen werden muss [7].

Polychlorierte Verbindungen die gleiche Fragmentationen wie CTTs aufweisen, stören bei der CTT-Bestimmung, so dass diese vor der GC-MS-Analyse entfernt werden müssen. Durch den Einsatz hochauflösender Massenspektrometer mit Auflösungsvermögen  $> 10000$  sind solche Überlagerungen nicht zu erwarten [7]. Allerdings wäre etwa das doppelte Auflösungsvermögen für eine getrennte Erfassung von  $m/z$  272,9584 ( $[\text{M}+2\text{-Cl}]^-$  von Pentachlorbornanen) und 272,9770 ( $[\text{M-Cl}]^-$  von Pentachlorbornanen) notwendig (vgl. **Tab. 4** und **Kap. 2.6.1** Gleichung 2).

### 2.6.3 Strukturaufklärung von CTTs mittels Protonenresonanzspektroskopie ( $^1\text{H-NMR}$ )

Die  $^1\text{H-NMR}$  ist die am weitesten verbreitete Methode zur Strukturaufklärung von CTTs. Aufgrund zahlreicher Protonen, die ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen und mehrfach koppeln können, ergeben sich komplexe  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Dies macht eine Anwendung von Systemen notwendig, die über entsprechend hohe Auflösungen verfügen, wie z.B. 500-MHz-Geräte. Mittels spezieller Experimente, z.B. *correlated spectroscopy* (COSY), ist es möglich, die an einer Kopplung beteiligten Protonen zu identifizieren. Aus den bisher veröffentlichten  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von CTTs lassen sich Rückschlüsse über die Lage von Signalen und die Größe von Kopplungskonstanten ziehen (**Tab. 5**) [1][141].

Protonen an C-8 und C-9 stellen ein unabhängiges Spinsystem dar, und im Fall einer ungleichen Verteilung (z.B. 2 + 1 Proton) kann die Zuordnung nicht direkt erfolgen. Dazu kann der Kern-Overhauser-Verstärkungs-Effekt (NOE-Effekt) herangezogen werden, mit dessen Hilfe räumlich benachbarte Kerne – auch wenn diese über mehrere Bindungen voneinander getrennt sind - bestimmbar sind. Bei den primären Methylgruppen C-8 und C-9 ist der zum Sechsring gerichtete Substituent stets ein Proton, und dieser befindet sich in räumlicher Nähe ( $< 3\text{Å}$ ) [61] zu *exo*-Protonen des Sechsrings. Dieser Zusammenhang ist in NOE-Experimenten nachweisbar und wird zur Identifizierung der Signale an C-8 und C-9 herangezogen (Struktur vgl. **Abb. 4**).

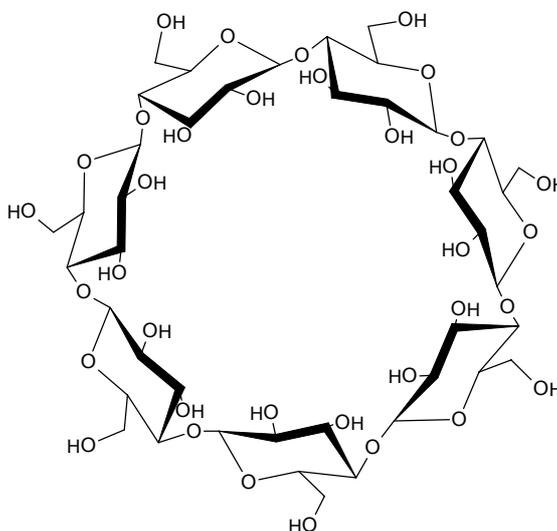
**Tab. 5** *Typische Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen bei der  $^1\text{H}$ -NMR von polychlorierten Bornanen<sup>a</sup> [1][2][61][141]*

Spin-Kopplung	Bereich der Kopplungskonstanten J [Hz]	Protonen-Position	Bereich der chemischen Verschiebung [ $\delta$ ]
Geminale Kopplung an sekundären Kohlenstoffen	15-17	-CHCl <sub>2</sub>	3,0-7,2
Geminale Kopplung an primären Kohlenstoffen	11-14,5	-CH <sub>2</sub> Cl	3,7-5,1
Vicinale <i>syn</i> -Kopplung (H2-H3)	8,5-9,5	-CH <sub>3</sub>	1,8-2,0
Vicinale <i>anti</i> -Kopplung (H2-H3)	4,0-6,5	-CH <sub>2</sub> -	2,7-3,8
Brückenkopf H4-H3- <i>exo</i> -Kopplung	2,5-5	-C(H- <i>endo</i> )Cl-	4,1-6,0
Brückenkopf H4-H3- <i>endo</i> -Kopplung	0,3-2,1	-C(H- <i>exo</i> )Cl-	4,6-5,2
Long-range W-Kopplung H8-H9	0,5-3,1	H4	2,6-3,7

<sup>a</sup> vgl. **Abb. 4a**, **Kap. 2.2.1**

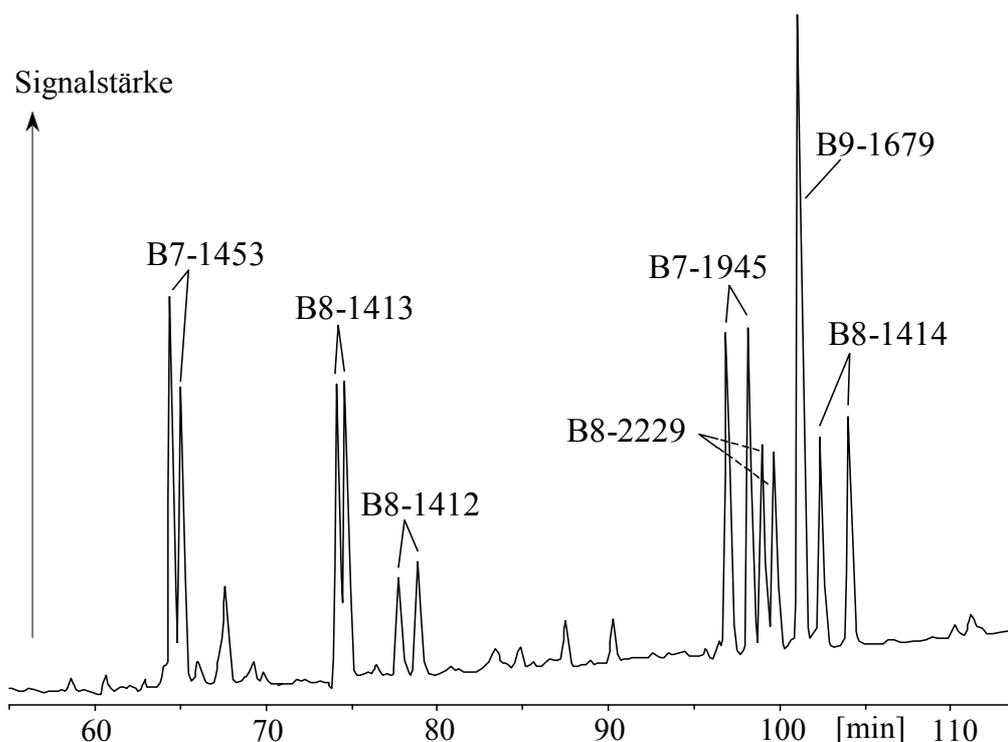
#### 2.6.4 Enantioselektive Bestimmung von CTTs mittels Gaschromatographie

Wie bereits beschrieben, sind 97 % der polychlorierten Bornane chiral (vgl. **Kap. 2.2.1**). Enantiomere weisen die gleichen physikalischen Eigenschaften auf, können sich aber in ihrer biologischen Aktivität, Persistenz [142] und toxischen Wirkung unterscheiden [143]. Aufgrund dieser Unterschiede ist eine enantioselektive Bestimmung von CTTs, die in der Gaschromatographie mit Hilfe chiraler stationärer Phasen (CSPs) durchgeführt wird, von Bedeutung. CSPs beruhen im wesentlichen auf modifizierten  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrinen, die aus sechs, sieben bzw. acht  $\alpha$ -1,4 verknüpften Glucoseeinheiten bestehen (**Abb. 13**).


**Abb. 13** *Schematische Darstellung von  $\beta$ -Cyclodextrin*

Durch Modifizierung (Alkylierung, Silylierung oder Acylierung) der terminalen OH-Gruppen in den Glucosebausteinen der Cyclodextrine konnten CSPs gewonnen werden, die sich als Trennphasen in der Gaschromatographie bewährten.

1994 gelang die erste Enantiomerentrennung von CTTs an *tert.*-butyldimethylsilyliertem  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -BSCD) in Mischung mit OV1701 (85 % Methyl-, 7 % Phenyl-, 7 % Cyanopropyl-, 1 % Vinylpolysiloxan) oder PS086 (85 % Methyl-, 15 % Phenylpolysiloxan) [134][144][145]. Als weitere CSP wurde ein nicht exakt charakterisiertes (6-*O-tert.*-Butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -TBDM) vorgeschlagen. Diese zeigte in Analogie zu  $\beta$ -BSCD-Phasen bei verschiedenen Syntheseansätzen unterschiedliche Trennleistungen [86][146]. Vor kurzem konnten einige polychlorierte Bornane an chemisch gebundenem Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin enantioselektiv getrennt werden (**Abb. 14**) [147]. Ähnliches gelang mit einem Octakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\gamma$ -Cyclodextrin gelöst in OV1701 oder PS086 [90][132]. Bisher ist es aber noch nicht gelungen, alle „wichtigen“ CTTs an einer CSP enantioselektiv zu trennen, so dass entsprechend dem Trennproblem eine geeignete CSP ausgewählt werden muss.



**Abb. 14** GC/ECD-Chromatogramm der Enantiomerentrennung von sieben CTTs an einer chemisch gebundenen Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Phase ( $\beta$ -PMCD) [147]

### 3 EXPERIMENTELLER TEIL

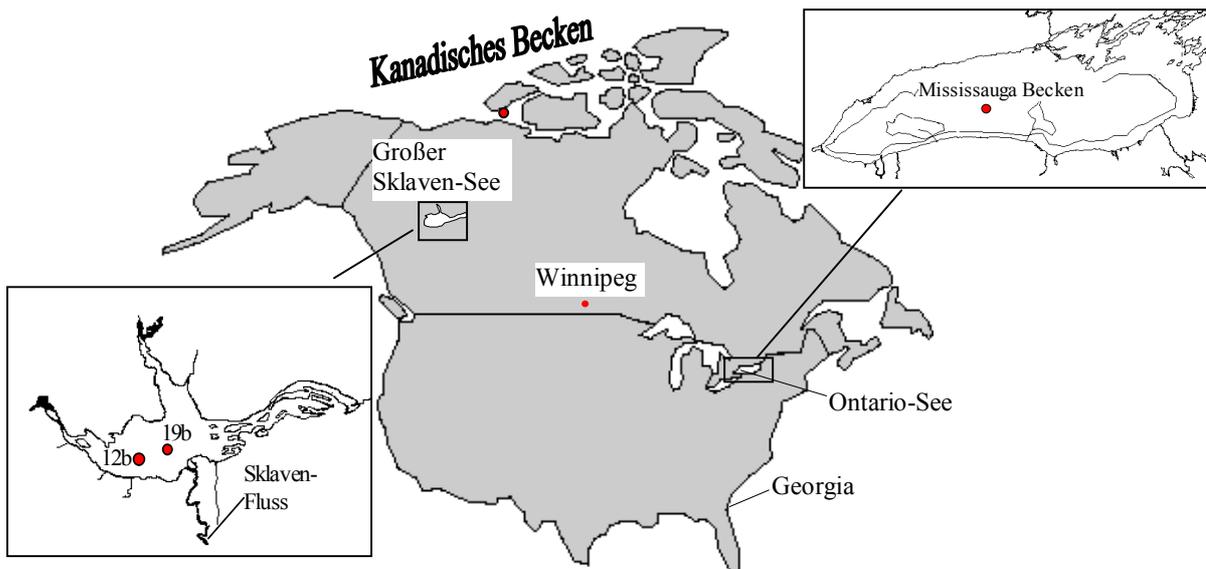
#### 3.1 Probenmaterial

1 kg Melipax-Pulver mit einem Toxaphengehalt von 10 % wurde originalverpackt in einer Gartenlaube in Jena gefunden [2]. Das Produkt war dort wahrscheinlich über einen Zeitraum von ca. 20 Jahren Temperaturen von ca. -10 bis 30 °C ausgesetzt. Es ist möglich, dass unter diesen Bedingungen ein leichter Abbau erfolgte, denn es lagen relativ große Anteile niederchlorierter CTTs und relativ geringe Mengen an B6-1679, B8-806 und B8-809 vor (**ATab. 2**).

Zur Isolierung von B6-923 stand eine Fraktion (600-650 mL, mobile Phase: *n*-Hexan) des technischen Gemisches Melipax (vgl. oben), die nach Chromatographie an 50 g aktiviertem Kieselgel erhalten worden war, zur Verfügung [72]. B7-1473, B7-1001 und B8-1414 lagen in der Fraktion 700-750 mL [72][148] des Extraktes einer belasteten Sedimentprobe aus Brunswick, Georgia, USA vor, die auf die gleiche Weise wie Melipax (vgl. oben) fraktioniert worden war.

Extrakte von zwei Eiern von Südpolar-Skuas (*Catharacta maccormicki*), die im Winter 1993/94 an der nördlichen Spitze der Potter-Halbinsel in der Antarktis gesammelt worden waren, wurden ebenfalls untersucht [149]. Die Gewichte der beiden Eier betragen ohne Schale 70 g (Probe 46x) und 93 g (Probe 10b) und die Fettgehalte lagen bei 5,8 und 7 % [149]. Aliquote der Proben lagen fertig aufgearbeitet vor. Die CTTs befanden sich in der zweiten Fraktion (50 mL Essigsäureethylester/*n*-Hexan, 1:9 (v:v) nach 48 mL *n*-Hexan) der Trennung an 8 g aktiviertem Kieselgel [150]. Aufgrund der relativ geringen CTT-Gehalte wurden beide Probenextrakte vereint.

Aufgearbeitete Sedimentproben vom Großen Sklaven-See sowie Proben von Invertebraten (Amphipoden) aus dem Kanadischen Becken wurden vom Freshwater Institute in Winnipeg (Kanada) zur Verfügung gestellt (**Abb. 15**). Die aufgearbeitete Sedimentprobe aus dem Ontario-See stammte von C. H. Marvin (Environment Canada, Burlington, Kanada) [151][152]. Die Probenaufarbeitung und Aufreinigungsschritte sind detailliert in der Literatur beschrieben [81][153][154][155]. Hierbei wurden die Proben zunächst gefriergetrocknet, mit wasserfreiem Natriumsulfat vermischt und nach Zugabe der internen Standards PCB30 und Octachlornaphthalin mittels beschleunigter Lösungsmittelextraktion (*accelerated solvent extraction*, ASE) extrahiert. Elementarer Schwefel in Sedimentproben konnte durch Behandlung mit Kupferspänen entfernt werden.



**Abb. 15** Karte von Nordamerika (nur Kanada und USA) mit den Probeentnahmegebieten

Die erhaltenen Extrakte wurden an leicht deaktiviertem Florisil (1,2 % Wasser, w:w) fraktioniert, wobei die Fraktionen 1 und 2, die jeweils CTTs enthielten, vereint wurden. Zur Korrektur der GC-MS-Variationen wurde  $^{13}\text{C}_8$  markiertes Mirex als interner Standard (IS) eingesetzt.

Bei den Sedimentproben handelte es sich um Segmente aus Tiefenprofilen. Die Sedimentprobe vom Ontario-See (2-3 cm Tiefe, 5,37 g) wurde 1998 aus dem Mississauga-Becken entnommen (**Abb. 15**) [151]. Zur Altersdatierung des Segmentes aus 2-3 cm Tiefe wurde das  $^{210}\text{Pb}$ -Isotop herangezogen, woraus sich ergab, dass die Sedimentierung in den Jahren 1989-1992 erfolgte [156]. Die 1993 aus dem Großen Sklaven-See entnommenen Proben stammten von den Segmenten aus 3,5-4 cm (GSL 12b, 4,96 g) und 2,5-3 cm Tiefe (GSL 19b, 5,16 g). Die Altersbestimmung hatte für das Segment aus 3,5-4 cm Tiefe eine Sedimentierung um das Jahr 1965 und für das 2,5-3 cm Segment eine Sedimentierung um das Jahr 1975 ergeben [155].

Die aus dem Kanadischen Becken stammenden Amphipoden (*Themisto libellula*) wurden 1998 entnommen. Dabei handelt es sich um kleine Krebstiere der Unterordnung *Hyperiidae*, die nur in arktischen Gewässern und dort am Untergrund in einer Tiefe von bis zu 1000 m vorkommen. Die Individuen werden bis zu zwei Jahre alt und bis zu 2 cm groß [157]. Es wurden 0,867 g *T. libellula* eingewogen und die gravimetrische Fettbestimmung ergab 12,68 %.

## 3.2 Geräteparameter

### 3.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Das HPLC-System bestand aus einem 234-Autosampler, einer 306-HPLC-Pumpe und einem 201-202-Fraktionssammler der Firma Abimed Gilson (Langenfeld). Auf einen Detektor wurde verzichtet, da CTTs von gängigen HPLC-Detektoren nicht angezeigt werden. Als Eluent wurde im Umkehrphasen-Modus (*reversed phase*, RP-HPLC) Acetonitril/Wasser im Verhältnis 86:14 (v:v) und im Normalphasen-Modus (NP-HPLC) *n*-Hexan eingesetzt, wobei die Flussrate jeweils 0,9 mL/min betrug. Die Proben (gelöst in den jeweiligen Eluenten) wurden mittels Autosampler in eine 100- $\mu$ L-Probenschleife gegeben und nach erfolgter Trennung in 4-mL-Gläschen von dem Fraktionssammler aufgefangen. Folgende HPLC-Säulen wurden eingesetzt: RP-Säule LC-18-DB (250 mm x 4,6 mm, Korngröße 5  $\mu$ m), Supelco (Deisenhofen), NP-Säule Polygosil (250 mm x 4.6 mm, Korngröße 10-60  $\mu$ m), Macherey-Nagel (Düren).

### 3.2.2 Gaschromatographie gekoppelt mit einem Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD) oder einem Flammenionisationsdetektor (GC/FID)

Alle Messungen wurden an zwei Gaschromatographen Hewlett-Packard (HP) 5890 Series II (Agilent, Waldbronn) durchgeführt, die im Folgenden aufgeführt sind.

Die Injektion (1  $\mu$ L) erfolgte bei allen Messungen splitlos (splitlose Zeit: 2 min). Als Trägergas wurde Helium 5.0 und als *make-up*-Gas für den ECD Stickstoff 5.0 (Linde, Leuna) verwendet. Helium wurde bis Juli 2001 von Linde (Leuna) und danach vom Institut für Festkörperphysik FSU Jena bezogen. Der Trägergasfluss betrug 1,3 mL/min. Die Details zu den verwendeten Kapillarsäulen sind in **Kap. 3.2.6** zusammengefasst.

1) An einem Doppelsäulengerät, welches mit zwei  $^{63}\text{Ni}$ -ECDs und einem Autosampler (HP 7673) ausgestattet war, erfolgten alle GC/ECD-Messungen außer denen zur Bestimmung der ECD-Responsfaktoren (vgl. unten). An diesem im Folgenden GCI genannten Gerät erfolgte auch der Großteil der Quantifizierungen. Nach dem Injektor erfolgte eine Teilung des Trägergasstromes mittels eines T-Stückes (Firma Gerstel, Mülheim/Ruhr).

**GCI: GC/ECD**

Injektor-Temp.:	250 °C	Detektor-Temp.:	300 °C
Kapillarsäulen:	CP-Sil 8/20 % C18 ( <b>GCI/a</b> ), CP-Sil 2 ( <b>GCI/b</b> ) (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )		
Temp.-programm:	60 °C (1,5 min), 40 °C/min auf 150 °C (5 min), 2 °C/min auf 230 °C, 5 °C/min auf 270 °C (15 min)		

2) **GCIi**: ausgestattet mit einem FID, ECD und einem Dani-Autosampler

Injektor-Temp.:	250 °C	Detektor-Temp.:	260 °C
Brenngase:	Wasserstoff 5.0 (Linde, Leuna) 1,0 bar, Druckluft 1,8 bar (Hausversorgung)		
Kapillarsäule:	CP-Sil 8/20 % C18 (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )		
Temp.-programm:	60 °C (1,5 min), 40 °C/min auf 170 °C (5 min), 5 °C/min auf 230 °C, 3 °C/min auf 270 °C (5 min)		

**3.2.3 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-MS)**

Die Messung erfolgte an einem Gaschromatograph HP 5890 Series II plus verbunden mit einem HP 5989 B MS Engine Massenspektrometer (Hewlett Packard, Ratingen).

**GC-Parameter:**

Trägergas:	Helium 5.0 (vgl. <b>Kap. 3.2.2</b> )
Injektion:	splitlos (1,5 min) bei 230 °C
Temp.-programm:	achirale HP-5- Säule 80 °C (1 min), 20 °C/min auf 170 °C (2 min), 20 °C/min auf 200 °C (5 min), 20 °C/min auf 280 °C (15 min), (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )
Temp.-programm:	chirale $\beta$ -BSCD- Säule 80 °C (4 min), 20 °C/min auf 180 °C (5 min), 20 °C/min auf 195 °C (25 min), 20 °C/min auf 230 °C (15 min), (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )

**ECNI-MS Parameter:**

Ionenquellentemp.:	150 °C	Quadrupol-Temp.:	100 °C
Reaktandgas:	Methan 4.5 (Linde, Leuna)		
Kalibrierung der Massenskala:	Perfluortributylamin (PFTBA); m/z 312, m/z 414, m/z 464		

SIM-Modus:	Aufnahme der intensiven Fragmentionen aus dem $[M-Cl]^-$ -Cluster vgl. <b>Tab. 4</b> der Penta- bis Decachlorbornane $m/z$ 273/275 ( $Cl_5$ ), 307/309 ( $Cl_6$ ), 343/345 ( $Cl_7$ ), 377/379 ( $Cl_8$ ), 411/413 ( $Cl_9$ ), 445/447 ( $Cl_{10}$ ). Identifizierung von B6-913: Ionen $m/z$ 273/275 ( $Cl_5$ ), 307/309 ( $Cl_6$ ), 343/345 ( $Cl_7$ ) und 342/344 ( $Cl_6$ $[M]^-/[M+2]^-$ ) Untersuchung des B9-1679-Abbau mit einem Enantiomer (vgl. <b>Kap. 4.3.4</b> ) $m/z$ 343/345 ( $Cl_7$ ), 375/377/379 ( $Cl_8$ ), $m/z$ 411/413 ( $Cl_9$ )
Scan-Modus:	Aufnahme im Massenbereich von $m/z$ 30 bis 400

### 3.2.4 Gaschromatographie mit hochauflösender massenspektrometrischer Detektion nach negativer chemischer Ionisierung (GC/ECNI-HRMS)

Ein Gaschromatograph HP 5890 Series II gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer Kratos Concept (EBE Geometrie, Mach 3X Datensystem, New York, USA) wurde für die Analysen verwendet (**Abb. 16**).

#### GC-Parameter:

Trägergas:	Helium 5.0 (Welders Supplies Limited, Winnipeg, Kanada)
Injektion:	druckgepulste splitlose Injektion (99 psi) bei 250 °C, die nach 1 min auf den „ <i>constant flow</i> “-Modus mit 1 mL/min übergang [158]
Temp.-programm:	80 °C (2 min), 20 °C/min auf 240 °C (20 min), 10 °C/min auf 300 °C (5 min)
Kapillarsäule:	DB-5-Säule (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )

#### ECNI-HRMS Parameter:

Reaktandgas:	Argon 5.0 (Welders Supplies Limited, Winnipeg, Kanada)		
Ionenquellentemp.:	120 °C	Ionenbeschleunigungsspannung:	5,3 kV
Ionisierungsenergie:	180 eV	Auflösungsvermögen:	~ 10000
Kalibrierung der			
Massenskala:	Perfluorkerosin (PFK) im <i>Autotune</i> -Modus		
SIM-Modus:	Aufnahme der zwei intensivsten $[M-Cl]^-$ Fragmentionen der Penta- bis Nonachlorbornane und der Penta- bis Hexachlorbornene (vgl. <b>Tab. 4</b> )		

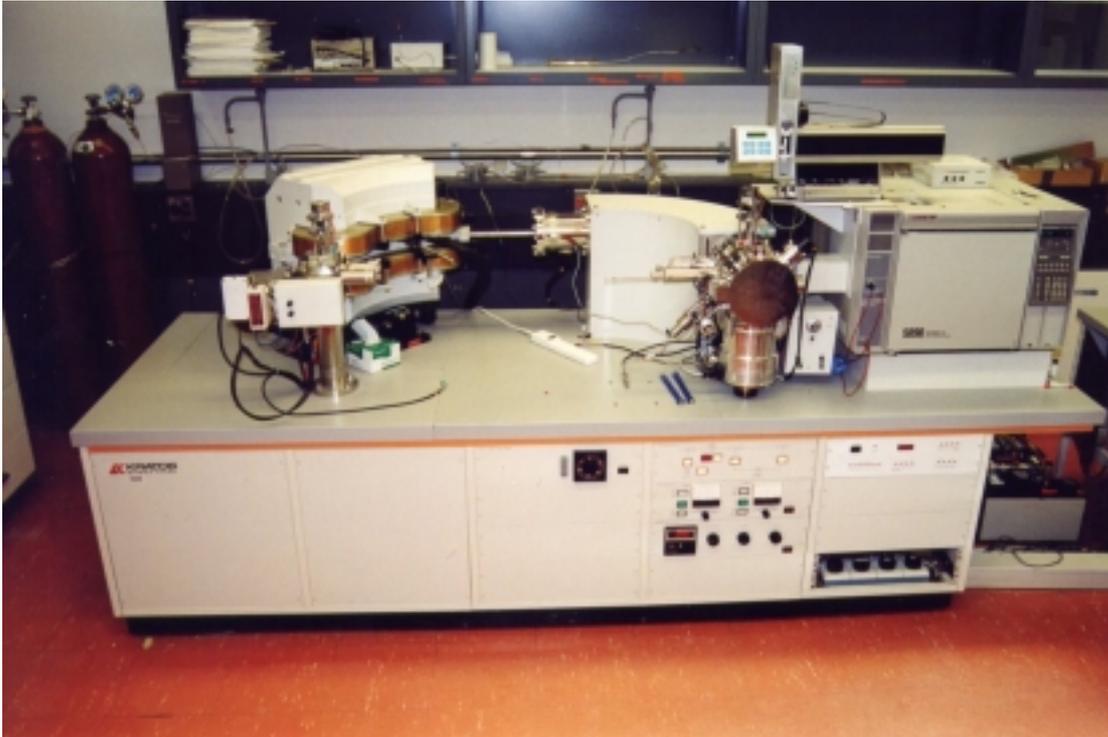


Abb. 16 GC/HRMS-Instrument der Firma Kratos Concept

### 3.2.5 Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion nach Elektronenstoßionisation (GC/EI-MS)

EI-Massenspektren wurden an dem in **Kap. 3.2.3** beschriebenen GC/MS-Gerät HP 5890 Series II plus / HP 5989 B MS Engine Massenspektrometer aufgenommen.

#### GC-Bedingungen:

Trägergas:	Helium 5.0 (vgl. <b>Kap. 3.2.2</b> )
Injektion:	splitlos (1,5 min) bei 230 °C
Temp.-programm:	80 °C (1 min), 20 °C/min auf 170 °C (2 min), 20 °C/min auf 200 °C (5 min), 20 °C/min auf 280 °C (15 min)
Kapillarsäule:	HP-5-Säule (vgl. <b>Kap. 3.2.6</b> )

#### EI-MS-Bedingungen:

Ionisierungsenergie:	70 eV	Ionenquellentemp.:	200 °C
Massenbereich:	m/z 30 – 420	Scan-Zeit:	~ 1 Scan/s
Kalibrierung der			
Massenskala:	PFTBA; m/z 312, m/z 414, m/z 464		

### 3.2.6 Verwendete Kapillarsäulen

Die Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Kapillarsäulen sind in **Tab. 6** aufgelistet.

**Tab. 6** Kapillarsäulen

Säulen- bezeichnung	Belegung	Parameter	Hersteller
CP-Sil 2	chemisch gebundener, zu 4 % vernetzter siliziumhaltiger, hochmolekularer Kohlenwasserstoff	50 m, 0,25 mm i.d., 0,25 $\mu\text{m}$ $d_f$	Chrompack, (Middelburg)
CP-Sil 8/ 20 % C18	4/5 95 % Dimethyl-, 5 % Diphenylpolysiloxan und 1/5 Octadecylmethylpolysiloxan	50 m, 0,25 mm i.d., 0,25 $\mu\text{m}$ $d_f$	Chrompack, (Middelburg)
$\beta$ -BSCD*	25 % <i>tert.</i> -butyldimethylsilyliertes $\beta$ - Cyclodextrin gelöst in PS086	30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 $\mu\text{m}$ $d_f$	BGB Analytik, (Adliswil, Schweiz)
HP-5	95 % Dimethyl-, 5 % Diphenylpolysiloxan	30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 $\mu\text{m}$ $d_f$	Hewlett-Packard, (Ratingen)
DB-5	95 % Dimethyl-, 5 % Diphenylpolysiloxan	60 m, 0,25 mm i.d., 0,25 $\mu\text{m}$ $d_f$	J&W Agilent Technologies (Mississauga, Kanada)

\* Es wurden zwei  $\beta$ -BSCD-Säulen (i) und (ii) mit gleichen Parameter verwendet, die sich in ihrem Trennvermögen unterscheiden.

### 3.2.7 Protonenresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR)

Die Messungen wurden an einem Bruker Avance drx 500 (Bruker, Rheinstetten) Spektrometer bei 27 °C durchgeführt. Die B7-1473-Lösung (vgl. Kap. 3.3.1.2) wurde vor der Messung im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt und in deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) gelöst. Alle chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) wurden relativ zum Lösungsmittelpeak  $\text{CDCl}_3$  registriert und auf Tetramethylsilan zurückgerechnet ( $\delta$  ( $^1\text{H}$ ) = 7,260 ppm für  $\text{CDCl}_3$ ). Weiterhin wurden zweidimensionale (COSY)- und NOESY-Spektren (vgl. **Kap. 2.6.3**) aufgenommen. Es wurden 3174 ( $^1\text{H}$ )-, 192 (COSY)- und 96 (NOESY)-Aufnahmen akkumuliert.

### 3.2.8 Weitere Geräte

Die Aufnahme der UV-Spektren sowie Messungen der optischen Dichte bei 578 nm ( $\text{OD}_{578}$ ) und Extinktion erfolgten an einem Varian Cary 300 (Varian, Darmstadt) Spektrophotometer. Sterilisierungen erfolgten in einem tuttner 3870 ELV (New York, USA) Autoklav für 20 min bei 120 °C. Das Abzentrifugieren erfolgte an einer Beckmann-

Zentrifuge Avanti™ J-20 (Beckmann Coulter, Unterschleißheim) bei 8000 rpm über 10 min, wobei die Zentrifuge auf 4 °C temperiert war. Das anaerobe Zelt war mit einer Schleuse zum sauerstofffreien Ein- und Ausbringen der Arbeitsgegenstände und einem Katalysator (Abfangen von O<sub>2</sub> durch Reaktion zu H<sub>2</sub>O) ausgestattet, die das anaerobe Arbeiten bei der Aufarbeitung der Bakterien gewährleisteten. Die Anaerobisierung von Lösungen erfolgte durch abwechselndes Begasen mit Stickstoff und evakuieren über einen Zeitraum von 1,5 Stunden (Vakuumpumpe MZ, vacuubrand, Wertheim). Für mikroskopische Studien kam das Mikroskop Jena Med 2 der Firma Carl Zeiss Jena in der Vergrößerung von 2500 mit Öl als Phasenkontrast zur Anwendung. Es wurde ein Rotationsverdampfer mit Rotor RE 111 und Wasserbad 461 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) in Verbindung mit einer Vakuumpumpe MZ der Firma vacuubrand (Wertheim) verwendet. Die Lösungsmittel (*n*-Hexan, Essigsäureethylester) wurden bei einer Wasserbadtemperatur von 35-40 °C und einem eingestellten Druck von 250 mbar abgezogen.

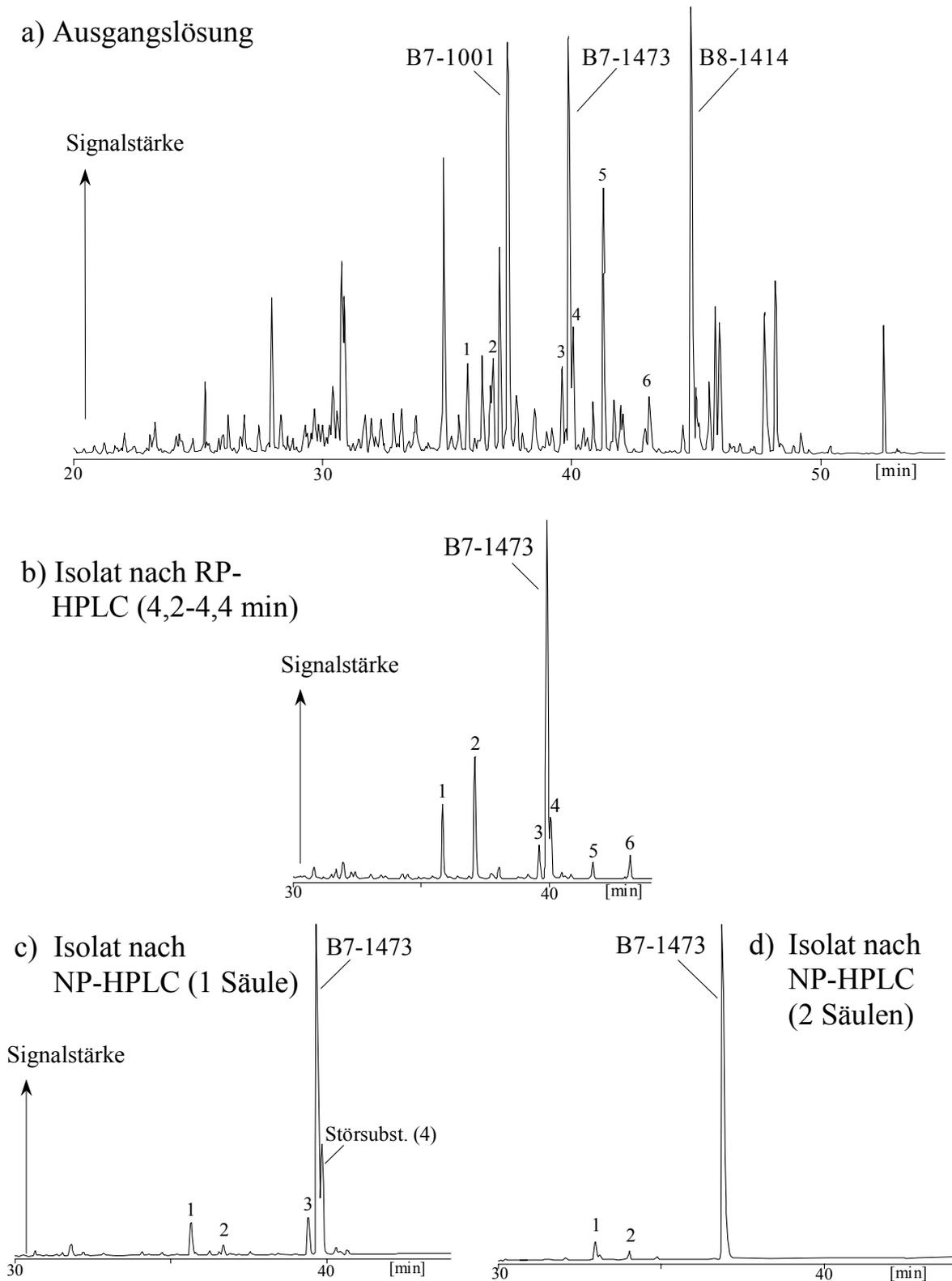
### 3.3 Isolierung verschiedener CTTs aus komplexen Gemischen

#### 3.3.1 Flüssigchromatographische Trennverfahren

Die weitere Aufarbeitung von den an Kieselgel gewonnenen Fraktionen hochbelasteter Proben (vgl. **Kap. 3.1**) erfolgte zunächst mittels RP-HPLC. B7-1473, B7-1001 und B8-1414 lagen in einer belasteten Sedimentprobe vor, die trotz der Vortrennung an 50 g Kieselgel noch ein komplexes CTT-Muster zeigte (vgl. **Abb. 17a**).

##### 3.3.1.1 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)

Aliquote (2 mL) der in *n*-Hexan gelösten Proben (vgl. **Kap. 3.1**) wurden im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen und in 1 mL Acetonitril/Wasser 86:14 (v:v) aufgenommen. Jeweils 90 µL der Lösung wurden in das RP-HPLC-System injiziert (**Kap. 3.4**). RP-HPLC-Fractionen von 0,2 min wurden in 4-mL-Probengläschen gesammelt, anschließend zweimal mit je 1 mL *n*-Hexan versetzt, geschüttelt und die organische Phase nach erfolgter Phasentrennung abgenommen. Die gewonnenen *n*-Hexan-Phasen konnten vereinigt und nach entsprechender Verdünnung mittels GC/ECD analysiert werden (vgl. **Tab. 7**).



**Abb. 17** GC/ECD Chromatogramme von der Isolierung von B7-1473, (GCI/b, vgl. **Kap. 3.2.2**): a) Ausgangslösung der Sedimentprobe nach Fraktionierung an 50 g Kieselgel (vgl. **Kap. 3.1**), b) Isolat nach RP-HPLC, c) Isolat nach RP- und NP-HPLC an einer Säule, d) Isolat nach RP- und NP-HPLC an zwei in Reihe geschalteten Säulen; c) und d) wurden im Abstand von 18 Monaten durchgeführt, was bei der CP-Sil2-Säule erhebliche Retentionszeitverschiebungen zur Folge hatte.

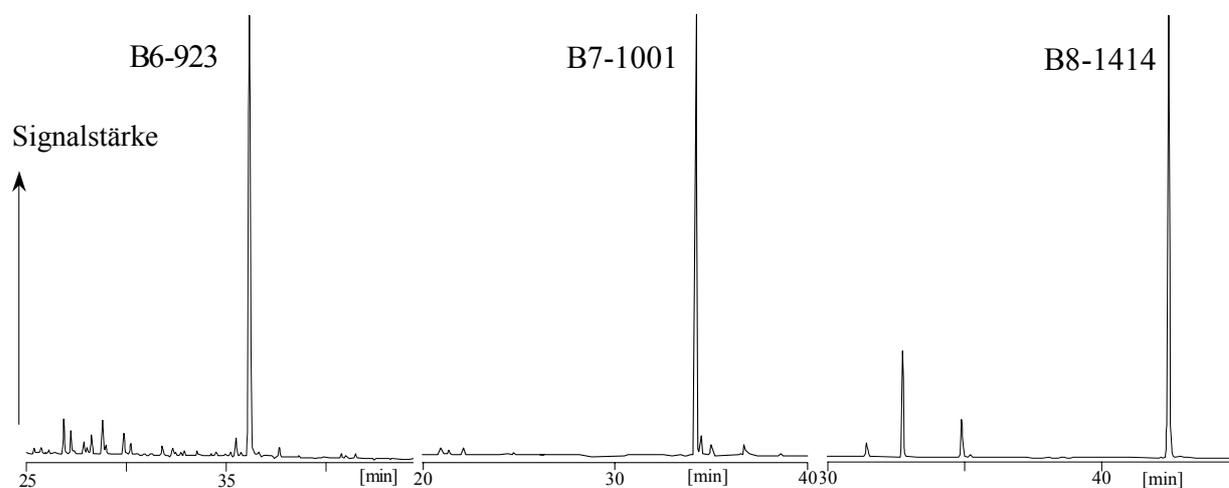
**Tab. 7** Retentionszeit der Hauptfraktion (HF) von B6-923, B7-1001, B7-1473 und B8-1414 an den verwendeten Säulen und die dabei gewonnenen Mengen

Verbindung	RP-HPLC, HF [min] (Elutionsbereich)	NP-HPLC, HF [min] (Elutionsbereich)	Ausbeute
B6-923	6,2 - 6,4 (5,8 - 6,6)	10,6 - 11 → eine NP-Säule (10,2 - 11,4)	10 µg
B7-1001	7,8 - 8,0 (7,6 - 8,4)	-	13 µg
B7-1473	7,4 - 7,6 (7,0 - 8,0)	4,2 - 4,4 → eine NP-Säule (3,8-4,8) 7,0 - 7,2 → zwei NP-Säule (6,8-7,6)	13 µg 6 µg
B8-1414	8,2 - 8,4 (8,0 - 8,8)	4,0 - 4,2 → eine NP-Säule (3,6-4,6)	7 µg

In der Hauptfraktionen lag B7-1001 bereits in ausreichender Reinheit (> 90 %) vor (**Abb. 18**). Die Hauptfraktionen von B6-923, B7-1473 und B8-1414 mussten mittels Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) weiter aufgereinigt werden.

### 3.3.1.2 Normalphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (NP-HPLC)

Die nach RP-HPLC erhaltenen Hauptfraktionen (~ 1,5 mL in *n*-Hexan) wurden im Stickstoffstrom auf ca. 0,6 mL eingengt. Jeweils 90 µL der Lösung wurden in das NP-HPLC-System injiziert (**Kap. 3.4**). Die 0,2 min-Fractionen (0,4 min-Fractionen im Fall von B6-923) wurden in 4-mL-Probengläschen gesammelt und nach entsprechender Verdünnung mittels GC/ECD analysiert. Für B8-1414 und B6-923 konnten auf diese Weise ausreichend reine Fraktionen (> 90 %) gewonnen werden (**Abb. 18**).

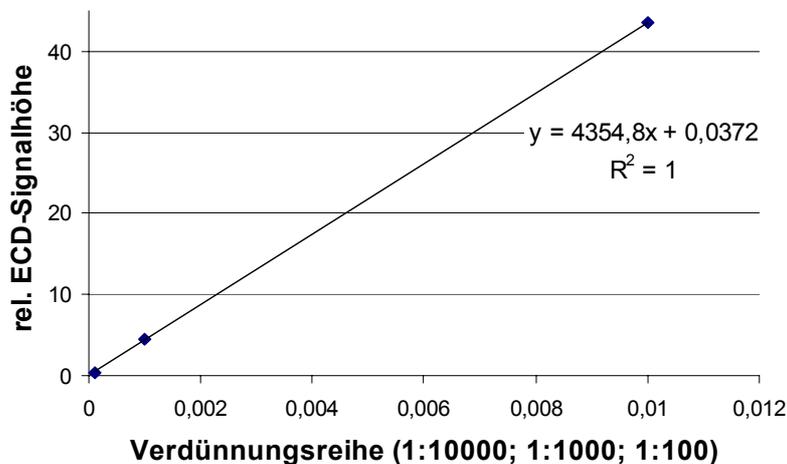

**Abb. 18** Verwendete Hauptfraktionen der HPLC-Isolate von B6-923, B7-1001, B8-1414, GC/ECD-Chromatogramme (GCI/a, vgl. **Kap. 3.2.2**)

Zur Isolierung von B7-1473 erforderte eine Störkomponente (4, **Abb. 17**) einen weiteren Reinigungsschritt, bei dem zwei NP-Säulen (vgl. **Kap. 3.2.1**) gekoppelt wurden (**Abb. 17d**).

### 3.3.2 Kalibrierung des B7-1473-Isolates mittels GC/FID

Die bei der Isolierung von B7-1473 gewonnene Menge reichte nicht für eine gravimetrische Einwaage aus. Die B7-1473-Lösung kann jedoch mittels Gaschromatographie und Flammenionisationsdetektor (GC/FID) mit einem Isomer kalibriert werden [69][139]. Nach dieser GC/FID-Kalibrierung kann der ECD-Responsefaktor bestimmt werden, so dass die Verbindung quantitativ erfasst werden kann.

Die Heptachlorbornane B7-1001 und B7-1473 besitzen die gleiche Summenformel ( $C_{10}H_{11}Cl_7$ ) und zeigen ein ähnliches gaschromatographisches Verhalten. Deshalb wurde B7-1001 zur Kalibrierung von B7-1473 herangezogen. Von B7-1001 stand uns ein quantitativer 20 pg-Standard zur Verfügung, der allerdings nicht für die GC/FID-Bestimmung geeignet war. Deshalb wurde zunächst die Lösung (0,1 mL) des B7-1001 Isolates mit Hilfe des oben genannten B7-1001-Standards kalibriert. Hierzu wurde ein Aliquot der konzentrierten Lösung vom B7-1001-Isolat schrittweise auf eine dem Standard ähnliche Konzentration verdünnt. Die Verdünnungsreihe (1:10000 – 1:100) wurde zweifach am GC/ECD bestimmt (**Abb. 19**). Beim Vergleich der Signalhöhe des quantitativen 20 pg B7-1001-Standards und der 1:1000-Verdünnung des Isolates ergab sich ein um das  $1,27 \pm 0,06$ -fach höheres Signal, so dass die Ausgangskonzentration des B7-1001-Isolates bei  $25,4 \pm 1,3$  ng/ $\mu$ L lag.



**Abb. 19** B7-1001 Verdünnungsreihe zur Kalibrierung des B7-1473-Isolates

Um Fehler bei der Injektion zu vermeiden, wurden die Lösungen von B7-1473 und B7-1001 zu gleichen Teilen vereint und das Gemisch in das GC/FID-System injiziert. Die B7-1001-Konzentration dieser Kalibrierlösung betrug  $12,7 \pm 0,6$  ng/ $\mu$ L. 1  $\mu$ L von dieser Lösung wurde siebenmal mittels Autosampler in das GC-System injiziert. Aus den erhaltenen Signalhöhen ergab sich mit Hilfe der Lösung bekannten B7-1001-Gehaltes (12,7 ng/ $\mu$ L) eine Konzentration von 6,2 ng/ $\mu$ L B7-1473 in der Kalibrierlösung (**Tab. 8**). Aus den Standardabweichung und der Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Ausgangskonzentration ergibt sich eine Ungenauigkeit von  $\sim 10$  % für die Quantifizierung von B7-1473 in den Proben.

### 3.3.3 Bestimmung des GC/ECD Responsefaktors von B7-1473

Nach Umbau des Säulenendes von FID nach ECD (vgl. **Kap. 3.2.2**, GCII) wurden die 1:75 verdünnten Lösungen von B7-1001 und B7-1473 im gleichen Gaschromatograph unter gleichen GC-Bedingungen wie bei FID-Kalibrierung vermessen. Der ECD-Responsefaktor wurde aus den relativen Signalhöhen von B7-1473 und B7-1001 berechnet (**Tab. 8**).

**Tab. 8** Kalibrierung einer B7-1473-haltigen Lösung durch B7-1001 anhand der GC/FID-Signale mit anschließender Bestimmung des ECD-Responsefaktors von B7-1473<sup>b</sup>

GC-Run	Kalibrierung durch GC/FID <sup>c</sup>		ECD-Responsefaktor <sup>a, c</sup>	
	B7-1001	B7-1473	B7-1001	B7-1473
1	7,25	3,7	8,0	3,65
2	7,25	3,75	8,1	3,7
3	7,3	3,7	7,5	3,5
4	7,75	3,85	7,65	3,5
5	8,25	4,0	7,9	3,6
6	7,85	3,4	7,95	3,6
7	7,6	3,6	8,1	3,7
Mittelwert	$7,61 \pm 0,37$	$3,71 \pm 0,19$	$7,89 \pm 0,23$	$3,61 \pm 0,08$
Konzentration	12,7 ng/ $\mu$ L	6,2 ng/ $\mu$ L	169 pg/ $\mu$ L	83 pg/ $\mu$ L
Response			1,000	1,067

<sup>a</sup> nach 1:75-facher Verdünnung

<sup>b</sup> relativ zu einem B7-1001-Responsefaktor von 1,0

<sup>c</sup> jeweils über die relative Signalhöhe [cm]

Der auf diese Weise ermittelte ECD-Responsefaktor war unter den gewählten Bedingungen nahezu identisch mit dem von B7-1001, so dass die Quantifizierung von B7-1473 in Umweltproben am GC/ECD mit dem Responsefaktor einer quantitativen Lösung von B7-1001 erfolgen kann.

### **3.4 Anaerobe Dechlorierung von Toxaphen mit Hilfe von Bakterien-suspensionen**

#### **3.4.1 Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen**

Die für jede Experimentreihe explizit durchgeführte Anzucht von *D. multivorans* erfolgte nach Scholz-Muramatsu *et al.* in anaerobem Medium bei 25 °C [110]. Von Neumann und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Universität Jena wurden hierfür Aliquote der Stammkultur von *D. multivorans* (Vorkultur), Lösungen von Pyruvat, Fumarat, Resazurin, Cystein, NaHCO<sub>3</sub> und Supplement sowie das Basalmedium zur Verfügung gestellt.

Die Vorkultur, die 5 mM Acetat (Kohlenstoffquelle), 40 mM Formiat (Elektronendonator) und 5 mM PCE (Elektronenakzeptor) enthielt, wurde mit 10 % einer bereits vorliegenden Vorkultur angeimpft. Letztere war in der Regel nach einem bis maximal drei Tagen so weit gewachsen ( $OD_{578} > 0,2$ ), dass sie auf die Hauptkultur überimpft werden konnte. Zuvor wurde hierfür das wässrige Medium (1 L), das 40 mM Pyruvat, 40 mM Fumarat, 2 g Hefe, 1 mL 0,02-%iges Resazurin und 20 mL Basalmedium enthielt, anaerobisiert und autoklaviert. Des Weiteren wurden der Puffer (0,1 M Tris-HCl) und 1 M Formiat-Lösung angesetzt, anaerobisiert und autoklaviert. Die bereits steril und anaerobisiert vorliegende Lösung aus 10 mL Supplement, 1 mL Cystein (5 % in Wasser, w:v) und 40 mL 1 M NaHCO<sub>3</sub> wurde nach dem Abkühlen mit Hilfe einer Spritze steril zum Hauptmedium hinzugegeben. In gleicher Weise erfolgte das Animpfen des Hauptmediums mit der Vorkultur (100 mL) von *D. multivorans*. Im Anschluss wurde die Hauptkultur für einen Tag im Wasserbad bei 25 °C geschüttelt (80 rpm).

*E. coli* wurde auf dem gleichen Medium wie *D. multivorans* für 16 bis 20 h bei 25 °C bis zu einer Zelldichte von ungefähr 1 bis 2 ( $OD_{578} = 1$  entspricht ~0,13 mg Zellprotein je mL) kultiviert. Das Medium (1 L) wurde mit 10 mL einer aerob auf einem *luria broth* (LB)-

Medium gewachsenen Kultur angeimpft [159]. Das LB-Medium (1 L) besteht aus jeweils 5 g Hefe, 10 g Trypton/Pepton und 10 g NaCl.

Im Basalmedium waren pro Liter 0,07 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g NH<sub>4</sub>Cl, 1,0 g NaCl, 0,4 g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl und 0,15 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O enthalten. Die Supplement-Lösung setzte sich aus Vitaminen und Spurenelementen zusammen: In 260 mL 0,12 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 waren 3,9 mg FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,21 mg ZnCl<sub>2</sub>, 0,35 mg MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,02 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,46 mg CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,007 mg CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,085 mg NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,13 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,2 µg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0,9 µg Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O und als Vitamine 14 µg p-Aminobenzoesäure, 3,5 µg Biotin, 35 µg Nikotinsäure, 17 µg Calciumpanthotenat, 52 µg Pyridoxamin und 35 µg Thiamin enthalten.

Nach der Kultivierung wurde die Zelldichte der Bakterienkulturen durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Hierzu wurde 1 mL entnommen, in eine Küvette überführt und das Resazurin mit Natriumdithionit entfärbt. Die Proben wurden, wenn erforderlich, mit Wasser auf eine OD<sub>578</sub> ≤ 0,5 verdünnt, da bei hohen (und auch bei zu tiefen OD<sub>578</sub> < 0,05) Zelldichten die Proportionalität zwischen Zellzahl und Dichte ungültig ist [105]. Der Faktor für das Verhältnis von OD<sub>578</sub> zu Proteingehalt liegt für *D. multivorans* bei OD<sub>578, D. m.</sub> = 1 → 220 µg/mL und für *E. coli* bei OD<sub>578, E. coli</sub> = 1 → 133 µg/mL [160]. Weiterhin wurde mittels der Mikroskopie der Zustand (Beweglichkeit, Kontur) der Zellen überprüft.

Die Aufarbeitung der Bakterienkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen sowie unter Ausschluss von Sauerstoff. Die *D. multivorans*-Kulturen wurden rund einen Tag nach dem Animpfen durch die Vorkulturen in der log-Phase (exponentielle Wachstumskurve) geerntet. Hierzu wurden die Kulturen zunächst in das anaerobe Zelt eingeschleust, in Zentrifugenbecher (400 mL) verteilt, ausgeschleust und bei 8000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die wiederum eingeschleusten, im Pellet enthaltenen, Bakterien wurden mit 100 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert.

### 3.4.2 Versuchsdurchführung

#### 3.4.2.1 Standardverfahren

4,5 mL der gemäß **Kap. 3.4.1** erhaltenen Zellsuspension und 0,5 mL des Elektronendonors Formiat (40 mM) wurden in 10-mL-Gläschen, die zuvor mit Aceton und *n*-Hexan gespült

und - wie alle Glasgeräte – autoklaviert worden waren, pipettiert. 5 µL der CTT-Lösungen in *n*-Hexan (vgl. **Tab. 9**) wurden hinzugegeben und danach mit einem teflonbeschichteten Septum (Macherey-Nagel, Düren) verschlossen. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben im anaeroben Zelt (95 % N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub>) gelagert.

#### 3.4.2.2 Ansätze zur Qualitätssicherung

Bei allen Abbauxperimenten wurden parallel Reagenzienblindproben (d.h. ohne Zugabe von CTTs) und Kontrollproben (4,5 mL 0,1 M Tris-HCl-Puffer, 0,5 mL 40 mM Formiat und CTTs) ohne Bakterien durchgeführt. Die Langlebigkeit der Bakterien in der Zellsuspension wurde durch die erstmalige Zugabe von B8-1414 zu sieben Tage alten Blindproben und durch die erneute Zugabe von B9-1679 zu bereits sechs Tage laufenden Experimenten mit B9-1679 überprüft.

Um die Relevanz von lebenden Bakterienkultur für den CTT-Abbau zu untersuchen, wurden die Zellen in verschiedenen Ansätzen durch Hitzebehandlung (10 min bei 98 °C) abgetötet. Die CTT-Dotierung erfolgte, um Verluste auszuschließen, erst nach der Denaturierung. Zur vollständigen Deaktivierung (Oxidation) der Zellen und auch der durch die Zellen geschaffenen reduktiven Bedingungen wurden in bestimmte Ansätze nach der Hitzebehandlung steriler Sauerstoff eingeblasen oder Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) hinzugegeben.

Zur Untersuchung des Temperatureinflusses wurden die nach **Kap. 3.4.2.1** vorbereiteten Proben unterschiedlich aufbewahrt: im anaeroben Zelt bei 28 °C, in verschlossenen Glasgefäßen im Kühlschrank bei 4 °C und im Brutraum bei 37 °C.

#### 3.4.2.3 Toxischer Einfluss der CTT-Gehalte auf *D. multivorans*

Zur Kontrolle des toxikologischen Effektes auf die Anzahl der lebenden Bakterienzellen wurden jeweils in Doppelbestimmung 4,5 mL des kultivierten *D. multivorans* und 0,5 mL Formiat (40 mM) auf 10-mL-Gläschen verteilt und mit Melipax (5,6 µg, 55,8 µg, 558 µg) dotiert. Nach einem Tag konnten 0,5 mL der mit Melipax kontaminierten Zelllösungen auf frisches Medium (4,5 mL, vgl. **Kap. 3.4.1**) überimpft werden, welche wiederum jeweils siebenmal 1:10 verdünnt (1:10<sup>7</sup>) wurden. Das Zellwachstum dieser Proben, das abhängig vom Zustand der Zellkulturen ist, wurde nach einem Tag und nach vier Tagen durch Messung der Zelldichte und den Vergleich mit Blindwerten ermittelt (siehe **Kap. 4.1.7**).

## 3.4.2.4 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach den in **Tab. 9** angeführten Zeitintervallen (**Tab. 9**). Hierzu wurden die Gläschen geöffnet, 5 mL *n*-Hexan und als IS perdeuteriertes  $\alpha$ -Hexachlorcyclohexan ( $\alpha$ -PDHCH, 5  $\mu$ L) hinzugegeben. Diese Lösung wurde in einen 100-mL-Erlenmeyer mit Schliff überführt. Die Proben wurden mit 10 mL *n*-Hexan 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach erfolgter Phasentrennung konnte die (obere) *n*-Hexan-Phase abgetrennt werden. Dann wurde die wässrige Phase erneut mit 10 mL *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten *n*-Hexan-Extrakte wurden über Natriumsulfat in einen gradierten 100-mL-Kolben filtriert und anschließend am Rotationsverdampfer auf ungefähr 1,5 mL eingengt.

**Tab. 9** Zeitpunkt der Probenahmen (PR) von den untersuchten CTTs mit den eingesetzten CTT- und Proteingehalten in der Bakteriensuspension, *D. multivorans* (*D. m.*)

CTT <sup>b</sup>	Menge [ng]	Proteingehalt [mg/mL]	Start <sup>a</sup>	2 PR	3 PR	4 PR	5 PR
<b>Melipax</b>	55000	<i>D. m.</i> : 1,1	0	7 d	13 d	16 d	-
<b>B6-923</b>	V 1	20	<i>D. m.</i> : 1,2	0	1 d	5 d	14 d
	V 2	50	<i>D. m.</i> : 0,9	0	14 d	-	-
<b>B7-1001</b>	45	<i>D. m.</i> : 1,6	0	1 d	7 d	15 d	-
<b>B7-1453</b>	35	<i>D. m.</i> : 1,3 <i>E. coli</i> : 1,2	0	1 d	5 d	14	-
<b>B8-1412</b>	20	<i>D. m.</i> : 1,3	0	1 d	5 d	14	-
<b>B8-1414</b>	V 1	50	<i>D. m.</i> : 1,7	0	3 d	7 d	-
	V 2	50	<i>D. m.</i> : 1,2	0	1 d	4 d	-
<b>B8-806</b>	50	<i>D. m.</i> : 1,05 <i>E. coli</i> : 1,5	0	6 h	1 d	5 d	12 d
<b>B8-806/B8-809</b>	-	<i>D. m.</i> : 1,2	0	4 h	6 h	1 d	5 d
<b>B9-1025</b>	V 1	145	<i>D. m.</i> : 1,3	0	1 d	4 d	-
	V 2	145	<i>D. m.</i> : 0,9	0	1 d	5 d	-
<b>B9-1679</b>	100	<i>D. m.</i> : 0,6	0	4 h	1 d	7 d	-
<b>B9-1679; 1 Enantiomere</b>	-	<i>D. m.</i> : 0,6	0	1 d	7 d	-	-
<b>Skua-Eier</b>		<i>D. m.</i> : 2,7	0	1 d	4 d	7 d	-
<b>Tox.-Test (Melipax)</b>	5600, 55800, 558000	<i>D. m.</i> : 1,9	0	1 d	4 d	-	-

<sup>a</sup> < 3 min nach der CTT-Zugabe

<sup>b</sup> V 1 = 1 Versuch, V 2 = 2 Versuch

Das Endvolumen wurde im Fall des technischen Toxaphens auf 2 mL und im Fall von einzelnen CTTs durch Abblasen im Stickstoffstrom auf 1 mL eingestellt. Die so vorbereiteten Lösungen wurden alle am GC/ECD und teilweise auch am GC/ECNI-(HR)MS vermessen.

### 3.5 Abiotische Dechlorierung von Toxaphen

#### 3.5.1 Vitamin B<sub>12</sub> (CCA) und Dicyanocobinamid (DCC)

##### 3.5.1.1 Präparation der eingesetzten Lösung

Zur Untersuchung der abiotischen Dechlorierung von Toxaphen wurde jeweils etwa 1 mg des Corrinoides in 10 mL Wasser gelöst. Die exakte Konzentrationsbestimmung der Lösungen erfolgte über Extinktionsmessungen am Absorptionsmaximum auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes an einem UV/VIS-Spektrophotometer (vgl. **Kap. 3.2.8**).

Die quantifizierten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser so weit verdünnt, dass in den Probengläschen Konzentrationen von 0,1 µM bis 1 mM vorlagen. Die zuvor anaerobisierten Tris-HCl-Puffer und DCC- und CCA-Lösungen wurden in das anaerobe Zelt überführt und zur weiteren Bearbeitung unter Sauerstoffausschluss gelagert.

In den 10-mL-Gläschen wurden 0,5 mL von CCA oder DCC, 4,5 mL Puffer und Titan(III)citrat im Überschuss (100 µL) vorgelegt. Nach erfolgter Überführung des Kobalts in die superreduzierte Co<sup>I</sup>-Form (Veränderung der Färbung, vgl. **Tab. 3**) wurden 55 bis 222 µg der CTTs in 5 µL *n*-Hexan hinzugegeben. Die 10-mL-Gläschen wurden mit teflonbeschichteten Septen verschlossen und bis zur Probenaufarbeitung unter anaeroben Bedingungen gelagert (vgl. **Kap. 3.4.2.4**).

##### 3.5.1.2 Herstellung von Ti(III)citrat

Ti(III)citrat ( $E^{\circ}_{\text{Ti(IV)/Ti(III)}} = -480 \text{ mV}$  [128]) wurde als Reduktionsmittel beim abiotischen Abbau von Toxaphen eingesetzt. Die Herstellung der gepufferten Ti(III)citrat-Lösung erfolgte unter Schutzatmosphäre im anaeroben Zelt. Zu 10 mL 0,4 M Natriumcitrat pH 7,0 wurden 2 mL 30-%iges (w:v) 1,9 M Ti(III)chlorid in 2 N HCl gegeben. Durch schrittweise Zugabe einer 2 M Natriumcarbonatlösung wurde die Lösung auf pH 8,0 titriert und anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 mL eingestellt.

### 3.5.2 Reaktion von CTTs mit methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung

Ungefähr 100 ng B6-923- bzw. B7-1001-haltige *n*-Hexanlösung (20 µL) wurden in einem 100-mL-Rundkolben vorgelegt und im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen. Nach Zugabe von 30 mL Methanol und 1 mL KOH-Lösung (2,5 M) wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die leicht abgekühlte Lösung (~ 40 °C) wurde mit 20 mL *n*-Hexan versetzt und bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur im Kolben belassen. Nach der Phasentrennung im Scheidetrichter wurde die (obere) *n*-Hexan-Phase entnommen. Anschließend wurde die methanolische Lösung erneut mit 20 mL *n*-Hexan und anschließend mit einem Gemisch aus *n*-Hexan und Essigsäureethylester (9:1, v:v) versetzt. Die organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf 2 mL eingengt und mittels GC/ECD und GC/ECNI-MS untersucht. Die Abbauprodukte wurden in der zweiten *n*-Hexan-Fraktion und die nicht vollständig umgesetzten Edukte in der ersten *n*-Hexan-Fraktion gefunden.

### 3.6 Qualitätskontrollen

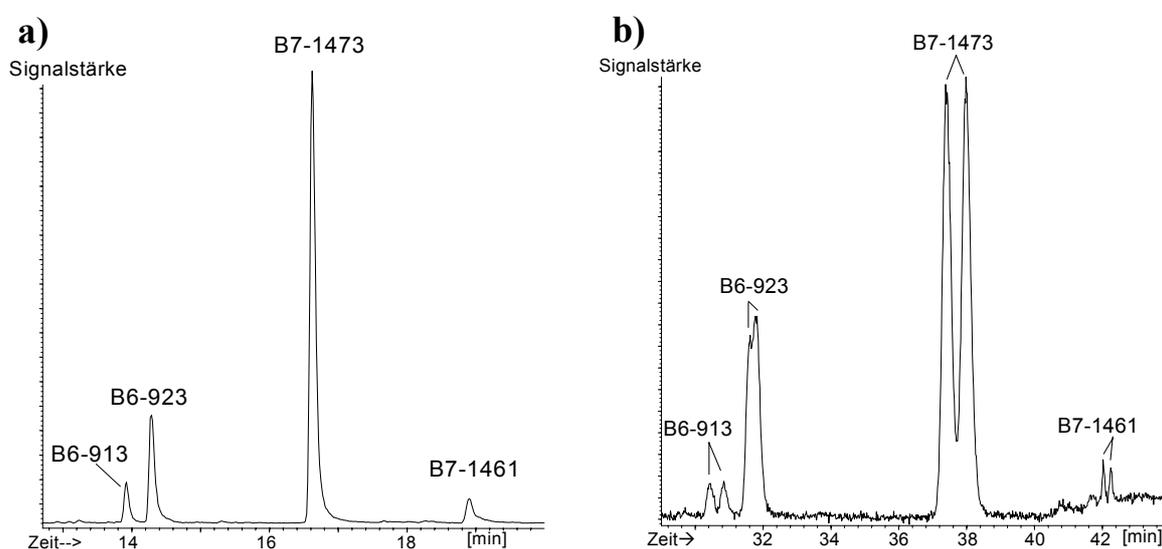
Zu allen Proben wurde vor der Extraktion  $\alpha$ -PDHCH als Wiederfindungsstandard zugesetzt (vgl. **Kap. 3.4.2.4**), um auf Verluste an Organochlorverbindungen während der Aufarbeitung zu prüfen [161][162]. Dabei wurde die  $\alpha$ -PDHCH-Konzentration so gewählt, dass sie im Bereich der CTT-Konzentration in den Probenextrakten lag. Bei jeder Probenserie wurde der Reagenzienblindwert kontrolliert, um Verunreinigungen im System zu erfassen (vgl. **Kap. 4.1.3**). Außerdem wurden von allen Proben Doppelbestimmungen und bei Experimenten mit geringerem Probenumfang Dreifachbestimmungen durchgeführt. War eine Auswertung von drei Parallelproben möglich, erfolgt die Angabe der Standardabweichung als Maß der Streuung des Analysenverfahrens.

Die Bakterien lagen jeweils in einer Zellsuspension aus Puffer und Formiat vor. Der maximale Abbauezeitraum der Experimente betrug 16 Tage. Die Langzeit-Dechlorierungsfähigkeit von *D. multivorans* konnte durch eine spätere Zugabe zu einer bereits dotierten Probe überprüft werden (vgl. **Kap. 4.1.6**).

Die Überprüfung der Vollständigkeit der Extraktion erfolgte, indem die Extraktionsrückstände einer Probenahme vereint, mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt und erneut mit frischem Lösungsmittel extrahiert wurden (vgl. **Kap. 4.1.2**).

Eine Absicherung der GC/ECD-Bestimmung erfolgte durch parallele Bestimmung an zwei GC-Säulen unterschiedlicher Polarität (vgl. **Kap. 3.2.2**). Beim Vergleich der erhaltenen Signale fällt eine Koelution an einer Säule durch ein erhöhtes Signal auf, so dass die Verbindung an der anderen Säule ausgewertet werden musste. Die CP-Sil 8/20 % C18-Säule erwies sich im Verlauf dieser Arbeit im Hinblick auf die Retentionszeit als stabilere Kapillarsäule, so dass diese zur Auswertung und die CP-Sil 2-Säule zur Kontrolle eingesetzt wurde.

Weiterhin bietet die Enantiomerentrennung an CSPs eine Absicherung der Ergebnisse, da zur eindeutigen Identifizierung statt einer zwei Retentionszeiten zur Verfügung stehen und man das Auflösungsverhalten der Enantiomere als weiteres Kriterium heranziehen kann (**Abb. 20**).



**Abb. 20** GC/ECNI-MS-SIM-Chromatogramme (Hexa- bis Octachlorbornane) der B8-806 Abbauprodukte nach einem Tag an einer achiralen HP-5- und an der chiralen  $\beta$ -BSCD (*i*)-Säule, vgl. **Kap. 4.3.1.1**

Bei der quantitativen Bestimmung an der GC/ECNI-HRMS wurde als IS  $^{13}\text{C}$ -markiertes Mirex verwendet, wodurch messtechnisch bedingte Schwankungen - vor allem in der Ionenquelle - korrigiert werden konnten. Des Weiteren wurden bei allen massenspektrometrischen Untersuchungen für jeden Chlorierungsgrad zwei Massenspuren ( $[\text{M}-\text{Cl}]^-$  vgl. **Tab. 4**) herangezogen, die in ihrem Verhältnis nicht mehr als 10 % von der theoretischen Isotopenverteilung abweichen durften.

Das Produktspektrum wurde durch zusätzliche Messungen mit den eingefügten Molekülonen  $[\text{M}]^-$  und  $[\text{M}+2]^-$  (vgl. **Tab. 4**) von niederchlorierten CTTs (beim SIM-Modus) bzw. durch einen *Fullscan* über den Massenbereich kontrolliert.

### 3.7 Herkunft und Qualität der eingesetzten Chemikalien

#### *Lösungsmittel*

<i>n</i> -Hexan:	zur Rückstandsanalyse, LGC Promochem (Wesel)
Acetonitril:	HPLC Gradient Grade, Baker (Deventer, Niederlande)
Wasser:	gereinigt mit Mill-Q System, Millipore (Eschborn)
Essigsäureethylester:	zur Rückstandsanalyse, Fluka (Neu-Ulm)
Isooctan:	p. a., Roth (Karlsruhe)

#### *Gase*

Neben den bereits erwähnten Gasen wurden am Institut für Mikrobiologie Stickstoff 4.6, Kohlendioxid 4.5 (Anaerobisierung von NaHCO<sub>3</sub>) und Formiergas (Gemisch aus 95 % N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub>) eingesetzt. Die Gase wurden von Linde (Leuna) geliefert.

#### *Weitere Chemikalien*

Kieselgel 60 (Partikelgröße 0,063 bis 0,2 mm, E. Merck, Darmstadt) wurde durch Aufbewahrung bei 130 °C über mindestens 16 h aktiviert. Konzentrierte Schwefelsäure (96 %, p.a.) und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sicc. wurden von E. Merck (Darmstadt) geliefert.

Die für mikrobiologischen Untersuchungen verwendeten Chemikalien wurden von Aldrich (Steinheim), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisendorf) in der besten lieferbaren Qualität bezogen.

#### *Standardsubstanzen:*

##### CTT-Mixstandards:

*Toxaphen-Mix 3:* Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (je 1 ng/μL)  
B8-1413, B8-1414, B8-1945, B8-2229,  
B9-1679, B9-1025

*BgVV three Standard:* LGC Promochem (Wesel) (je 5 ng/μL)  
B8-1413, B9-1679, B9-1025

*25 CTT-Standard* LGC Promochem (Wesel) [163]  
B7-1453 und B8-1412: kalibrierte Lösung (B7-1453: 6,88 ng/μL [69],  
B8-1412: 4,4 ng/μL [92])

*Einzelstandards:*

B7-1000:	Isolat aus unserem Labor [148]
B8-1414:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (1 ng/μL)
B8-1945:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (1 ng/μL)
B8-2229:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (1 ng/μL)
B7-515:	LGC Promochem (Wesel) (5 ng/μL)
B8-806:	LGC Promochem (Wesel) (5 ng/μL)
Camphechlor:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)

Weiteren CKWs:

Oxychlordan:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
trans-Chlordan:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
cis-Chlordan:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
trans-Nonachlor:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
cis-Nonachlor:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
α-PDHCH:	Feststoff, synthetisiert in unserem Labor [161] 2,4 ng/μL <i>n</i> -Hexan-Lösung verwendet
p,p'-DDT:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
p,p'-DDD:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)
p,p'-DDE:	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) (10 ng/μL)

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Validierung des Probenaufbereitungsverfahrens

Zur Untersuchung des anaeroben Abbaus von Toxaphen können Umweltmaterialien, wie Klärschlamm, oder auch definierte Bakterienkulturen herangezogen werden. Gegen den Einsatz von Klärschlamm sprach u.a., dass es kaum möglich gewesen wäre, die geplanten Experimente über mehrere Jahre unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Dagegen können bei Verwendung von einzelnen Bakterienkulturen nach entsprechender Validierung der Methode die Experimente jederzeit wiederholt werden. Dies eröffnet auch anderen Arbeitsgruppen die Möglichkeit, auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zurückzugreifen und diese ggf. weiterzuführen. Weitere Vorteile beim Arbeiten mit Bakterienkulturen bestanden in der einfachen Probenaufarbeitung (vgl. **Kap. 3.4.2.4**), dem geringeren Bedarf an CTT-Standards und in der im Vergleich zu Ansätzen mit Klärschlamm geringeren Geruchsbelästigung.

Allerdings gelang es selbst beim Arbeiten mit Bakterienkulturen nicht, aus großen Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten reproduzierbar Aliquote zu entnehmen. Deshalb wurde die Bakterienkultur bei allen Experimentreihen unter Verwendung von luftdicht verschließbaren 10-mL-Probengläschen in viele Einzelansätze aufgeteilt. Diese konnten dann (zu verschiedenen Zeitpunkten) vollständig aufgearbeitet werden. Somit konnten Inhomogenitäten und das Einschleppen von Sauerstoff verhindert werden.

Diese Verfahrensweise sollte zunächst im Hinblick auf die o. g. Kriterien (Wiederholbarkeit über lange Zeiträume) validiert werden.

#### 4.1.1 Wiederfindung und Kontrolle ohne Bakterien am Beispiel des Abbaus von B8-1414

Da der CTT-Gehalt in den Proben als Folge des gewollten Abbaus mit Bakterienkulturen im Verlauf der Experimente abnahm, musste sichergestellt werden, dass diese Konzentrationsabnahme der Analyte nicht von Verlusten bei der Probenvorbereitung (vgl. **Kap. 3.4.2.4**) überlagert wurde. Hierzu wurde den Ansätzen sofort nach dem Öffnen der 10-mL-Probengläschen  $\alpha$ -PDHCH als IS zugesetzt und umgehend extrahiert. Von  $\alpha$ -PDHCH war bekannt, dass sich dieses bei der Probenvorbereitung wie die CTTs verhält, jedoch wesentlich flüchtiger ist. Erfahrungsgemäß spielen bei der Probenvorbereitung vor allem Verluste beim Einengen von Extrakten eine Rolle [149], und diese treten beim

flüchtigen IS wesentlich stärker zum Vorschein als bei den schwerer flüchtigen CTTs. Somit stellt die Wiederfindung des IS den Grenzfall für CTT-Verluste bei der Probenvorbereitung dar. Die Wiederfindungsrate des  $\alpha$ -PDHCH lag bei den Abbauversuchen zwischen 68 und 103 % (im Falle des B8-1414 zwischen 72 % und 97 %, **Tab. 10**, vgl. **Kap. 4.3.2.2**) und damit bis auf einen Fall im Rahmen des für rückstandsanalytische Untersuchungen gerade noch duldbaren Verlustes von 30 %.

Dass die Verluste der CTTs im Vergleich dazu geringer waren, geht daraus hervor, dass die ermittelten CTT-Gehalte bei Doppelbestimmungen mit unterschiedlicher Wiederfindung des IS (72 % und 97 %), nur geringfügig variierte oder sogar gleich blieb (0,75 ng und 0,75 ng, **Tab. 10**). Dies wurde auch in Reagenzienblindwerten und in Proben mit CTTs, ohne Zusatz einer Bakterienkultur, bestätigt. Ferner wiesen Ansätze ohne Bakterienzusatz über den gesamten Versuchszeitraum einen nahezu gleichen Gehalt an B8-1414 auf (**Tab. 10**). Nur bei Anwesenheit von *D. multivorans* wurden Abbauprodukte nachgewiesen. Somit können nennenswerte Verluste an CTTs während der Probenvorbereitung ausgeschlossen werden.

*Durchführung von Mehrfachbestimmungen:*

Wie bereits erwähnt (vgl. **Kap. 3.6**), wurden alle Experimente in Mehrfachbestimmung durchgeführt. Aufgrund der mitunter sehr großen Anzahl an einzelnen Ansätzen, die in sehr kurzer Zeit aufgearbeitet werden mussten, konnten bei einer Experimentreihe nicht in allen Fällen eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden.

**Tab. 10** Abbau von B8-1414 (50 ng) durch *D. multivorans* mit der Angabe der Wiederfindung an  $\alpha$ -PDHCH, der Kontrollen ohne Bakterien (K-B8-1414) über einen Zeitraum von sieben Tagen

Probenahme Ansatz	B8-1414 [ng]	$\alpha$ -PDHCH [%]	K-B8-1414 [ng] <sup>a</sup>	K- $\alpha$ -PDHCH <sup>a</sup> [%]
	1/2/3	1/2/3	1/2	1/2
Start	50/ 40/ 43	83/ 74/ 78	43/ 46	89/ 95
Mittelwert	44 ± 5,2	-	44 ± 1,5	-
3 Tage	0,75/ 1,15/ 0,75	72/ 90/ 97	36/ 43	81/ 83
Mittelwert	0,9 ± 0,2	-	40 ± 3,4	-
7 Tage	-*/ -*/ -*	87/ 93/ 96	43/ 39	84/ 81
Mittelwert	-	-	41 ± 2,4	-

-\* < 0,1 ng

<sup>a</sup> Kontrollen ohne Bakterien wurden nur in Doppelbestimmung durchgeführt

Die Streuung der Messwerte, die bei Doppelbestimmung bzw. Dreifachbestimmungen ermittelt wurde, lag zwischen 0 % und 30 %, wobei die Schwankungen mit zunehmender Inkubationszeit und bei Substanzmengen nahe an der Nachweisgrenze generell größer waren als zu Beginn der Experimente. So betrug der Unterschied bei B8-1414 am Start ( $44 \pm 5,2$  ng) 12 % und nach drei Tagen ( $0,9$  ng  $\pm 0,2$ ) 22 % (**Tab. 10**). Diese Streuungen bei Mehrfachbestimmung waren typisch für alle durchgeführten Experimente. Aufgrund dieser recht guten Übereinstimmung der Mehrfachbestimmungen wurde bei der Diskussion der Ergebnisse (**Kap. 4.2-4.4**) auf die Angabe des Streubereichs verzichtet und stattdessen mit Mittelwerten gearbeitet.

#### **4.1.2 Überprüfung der Vollständigkeit der CTT-Extraktion durch erneute Extraktion**

Die Effizienz der zweifachen Extraktion mit dem Lösungsmittel *n*-Hexan im Ultraschallbad (vgl. **Kap. 3.4.2.4**) wurde durch erneute Extraktion der wässrigen Phase mit zweimal je 10 mL *n*-Hexan nach vorheriger Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure überprüft. Dabei wurden z.B. beim Abbau von B9-1025 nach einem Tag und normaler Probenaufarbeitung (vgl. **Kap. 3.4.2.4**) im ersten Extrakt 61 ng (vgl. **Tab. 11**) und nach H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Behandlung und erneuter Extraktion im zweiten Extrakt nur weitere 1,9 ng (< 3 %) gefunden. Dieses Ergebnis wurde auch durch spätere Untersuchung unterstützt, so dass von vernachlässigbaren Verlusten an CTTs ausgegangen werden kann.

#### **4.1.3 Reagenzienblindwert**

Um sicherzustellen, dass im Verlauf von Langzeitversuchen im Labor keine Kontamination durch verunreinigte Chemikalien oder Geräte auftrat, wurde parallel zu jeder Probenahme ein Reagenzienblindwert in Doppelbestimmung (vgl. **Kap. 3.4.2.2**) angesetzt und ausgewertet. Dabei wurden in keinem Fall Kontaminationen der Bakterienkulturen festgestellt.

#### **4.1.4 Reproduzierbarkeit der Experimente am Beispiel von B9-1025**

Da für jede Experimentreihe eine neue Zellkultur von *D. multivorans* aus der Stammkultur kultiviert werden musste (vgl. **Kap. 3.4.1**), galt es sicherzustellen, dass die erhaltenen

Ergebnisse nach Auswertung verschiedener Ansätze miteinander vergleichbar waren. Auch galt es zu prüfen, ob Schwankungen im Proteingehalt hingenommen werden können.

Hierzu wurde z.B. die gleiche Menge an B9-1025 im Abstand von drei Monaten zweimal zu frisch kultivierten Zellsuspensionen von *D. multivorans* gegeben, wobei der erste Ansatz mit 1,3 mg/mL Zellprotein einen um 0,4 mg/mL höheren Proteingehalt der Bakteriensuspension aufzeigte (vgl. **Kap. 3.4.2.4**). Insgesamt verlief der Abbau des B9-1025 (vgl. **Kap. 4.3.1.3**) in beiden Experimenten sehr ähnlich. So wurden bei der zweiten Probenahme (nach einem Tag) Unterschiede von rund 15 % in den B9-1025-Gehalten gefunden, die bei der dritten Probenahme (nach vier Tagen bzw. fünf Tagen) mit < 10 % noch geringer waren (vgl. **Tab. 11**).

Eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente ergab sich auch im Falle des B8-1414 (vgl. **Kap. 4.1.7** und **4.1.8**), denn für dieses CTT variierte der nach drei bzw. vier Tagen erhaltene Abbau nur um 15 %, obwohl die Proteingehalte der Bakteriensuspensionen mit 1,2 und 1,7 mg/mL insgesamt um 0,5 mg/mL schwankten. Der etwas schnellere Abbau von B8-1414 bei höheren Zelldichten verdeutlicht den - wenn auch geringen - Einfluss des Proteingehaltes auf den CTT-Abbau. Daher wurde versucht, die Bedingungen bei allen weiteren Experimenten so zu wählen, dass die Proteingehalte von *D. multivorans* bei 0,9-1,3 mg/mL lagen (**Tab. 9**).

Diese Vorgehensweise stellte eine Reproduzierbarkeit der Abbauxperimente im Bereich von 15 % sicher.

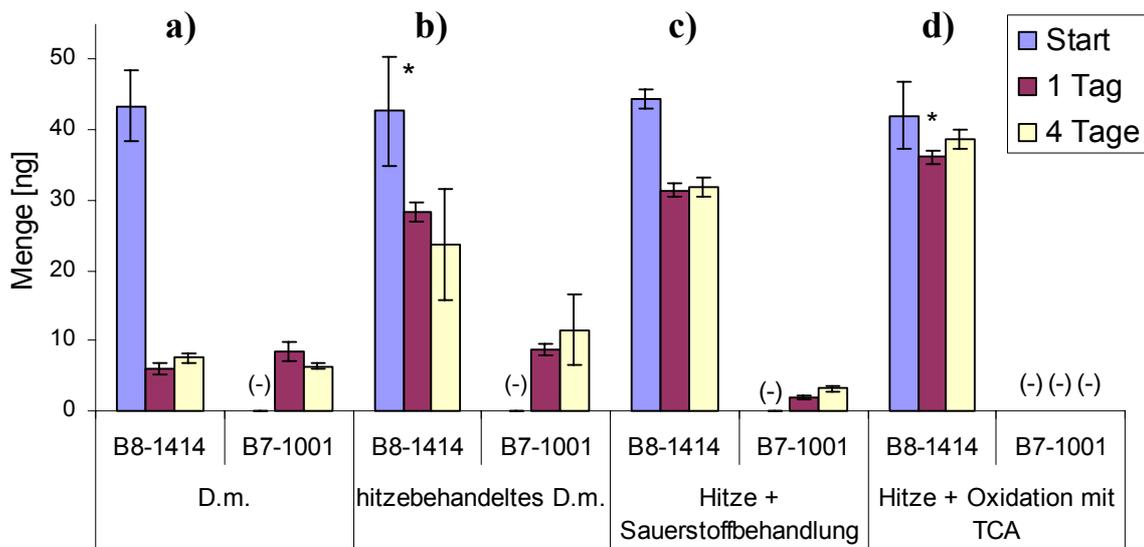
**Tab. 11** Vergleich zweier Abbauxperimente von B9-1025 (145 ng) mit *D. multivorans*

Probenahme	B9-1025 [ng]		$\alpha$ -PDHCH [%]	
	Versuch 1	Versuch 2 <sup>a</sup>	Versuch 1	Versuch 2 <sup>a</sup>
Ansatz	1/2/3	1/2	1/2/3	1/2
<i>Start</i>	145/139/143	140/126	78/70/86	75/92
<i>Mittelwert</i>	142 ± 2,9	133 ± 6,8		
<b>1 Tag</b> <sup>a</sup>	70/53/61	42/62	85/90/97	98/90
<b>Mittelwert</b>	61 ± 11	52 ± 9		
<b>4 Tage</b>	24/39/27	-	78/80/77	
<b>Mittelwert</b>	30 ± 8,1	-		
<b>5 Tage</b>		38/26		76/90
<b>Mittelwert</b>	-	32 ± 6,2		

<sup>a</sup> wurde als Doppelbestimmung durchgeführt

#### 4.1.5 Vergleich des CTT-Abbaus durch lebende und abgetötete Zellen von *Dehalospirillum multivorans*

Aus verschiedenen Experimenten mit CTTs ging hervor, dass der Abbau am 1. Tag (zwischen der ersten und zweiten Probenahme) schneller erfolgte als zu späteren Zeitpunkten (vgl. Kap. 4.1.4 bzw. 4.1.7). Darüber hinaus war auch in der Anfangsphase mit hitzedenaturierten Zellen ein CTT-Abbau feststellbar (Abb. 21b). Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Komponenten in den Bakterienlösungen auch nach Abtötung der Bakterien zum CTT-Abbau befähigt sind. Dieser Sachverhalt sollte mit Hilfe eines weiteren Experimentes genauer untersucht werden (Tab. 9 Versuch 2). Dabei wurde zusätzlich zu einer zehnminütigen Hitzeeinwirkung bei 98 °C (Abb. 21b) auch Sauerstoff eingeleitet (Abb. 21c) und anschließend erneut anaerobisiert beziehungsweise mit Trichloressigsäure (TCA) chemisch oxidiert (Abb. 21d). Das Ziel war eine vollständige Unterbindung des reduktiven CTT-Abbaus in Bakterienlösungen von *D. multivorans*.



**Abb. 21** Abbauprofil von B8-1414 und dessen Metabolit B7-1001 beim Einsatz von (a) *D. multivorans* (*D. m.*), b) hitzebehandelte Zellen von *D. multivorans*, c) Hitze- und Sauerstoffbehandlung, d) Hitzebehandlung und chemische Oxidation mit TCA über einen Zeitraum von vier Tagen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, \* nur zwei Proben auswertbar (Fehlerbalken = Abweichung vom Mittelwert)

Die Auswertung ergab, dass *D. multivorans*-haltige Bakterienkulturen nach Hitze- und TCA-Behandlung (Abb. 21d) nicht mehr in der Lage waren B8-1414 abzubauen. So konnte auch das Abbauprodukt B7-1001 nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden sowohl nach alleiniger Hitzebehandlung (Abb. 21b) als auch nach zusätzlicher

Sauerstoffeinleitung (**Abb. 21c**) rund 20 % der eingesetzten Menge an B8-1414 abgebaut und bis zu 20 % an B7-1001 detektiert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass *D. multivorans* hitzestabile Bestandteile enthält, die Toxaphen reduzieren können. In Frage kommen die als Kofaktoren beschriebenen Eisen-Schwefelcluster oder das in der PCE-Dehalogenase vorkommende superreduzierte NCA (vgl. **Kap. 2.4.1**). Diese können solange wirken, wie sie in der zur Reduktion von CTTs notwendigen Oxidationsstufe vorhanden sind. Somit ist verständlich, dass diese chemische Reaktion nur zu Beginn der Ansätze zum Tragen kommt. Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass das Ausmaß des chemischen Abbaus von B8-1414 im Vergleich zum Abbau mit lebenden *D. multivorans*-Zellen, bei dem innerhalb eines Tages rund 85 % umgesetzt worden war (**Abb. 21a**), wesentlich geringer war. Außerdem war erst durch *D. multivorans* vor dessen Denaturierung eine Reduktion dieser Kofaktoren möglich, so dass diese chemische Oxidation letztendlich auch auf lebenden Zellen basierte.

#### 4.1.6 Langzeit-Dechlorierungsversuche von CTTs mit *Dehalospirillum multivorans*

Der Abbau einzelner CTTs wurde über einen Zeitraum von maximal 16 Tagen verfolgt, wobei die wesentlichen Vorgänge innerhalb der ersten sieben Tage abliefen. Daher galt es zu prüfen, ob die Bakterienkultur zu Beginn und am Ende des Experimentes in ähnlicher Weise zum CTT-Abbau befähigt war, oder ob die Kinetik des CTT-Abbaus von einem Absterben der Bakterien begleitet wurde. Deshalb wurde die Langzeit-Dechlorierungsfähigkeit von *D. multivorans* durch eine erneute Zugabe von CTTs zu bereits laufenden Experimenten und gelagerten Blindproben überprüft.

In einem Experiment wurden daher 77 ng B9-1679 nach sechs Tagen erneut zu einer Probe gegeben, die zu diesem Zeitpunkt bereits über 60 ng B9-1679 abgebaut hatte (**ATab. 3**). Ab diesem Zeitpunkt (Tag 6) wurden innerhalb eines Tages statt dem bei sofortiger Zugabe beobachteten Abbau von ca. 65 % nur noch ca. 50 % des zugesetzten B9-1679 abgebaut. Dabei war die gefundene Differenz von rund 30 % der verbliebenen B9-1679-Menge zwischen sofortiger und nach sechstägiger Verzögerung erfolgter Zugabe teilweise auf den in **Kap. 4.1.5** beschriebenen Effekt der Kofaktoren zurückzuführen, der nach sechs Tagen sicher nicht mehr in der gleichen Weise zum Tragen kommt. Da für jeden weiteren Versuch frisch kultivierte Bakterienkulturen verwendet wurden, wirkte sich dieser Unterschied bei der Auswertung der Experimente nicht weiter aus.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass *D. multivorans* über einen langen Zeitraum hinweg in der Lage ist, CTTs abzubauen und dass auch nach sieben Tagen noch rund 85 % der

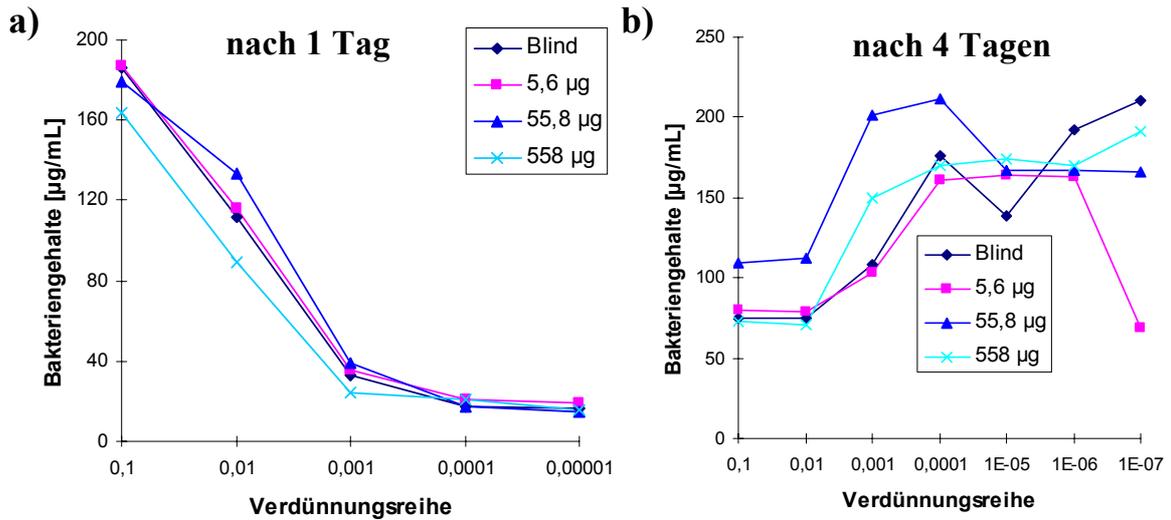
ursprünglichen Effizienz erreicht wird. So konnte auch bei einer Zugabe von B8-1414 zu einer sieben Tage alten Zellsuspension innerhalb von drei Tagen mit > 95 % der eingesetzten Menge fast soviel abgebaut werden wie mit frisch kultivierten Zellen (vgl. **Tab. 10**). Diese geringen Unterschiede im Vergleich zur wiederholten Zugabe des B9-1679 untermauern die Ergebnisse von **Kap. 4.1.5**, da die bisher nicht dechlorierend eingesetzten Zellen noch über das Potential der besonders aktiven ersten Abbauphase verfügen. Trotz der relativ geringen Unterschiede ist mit einem langsamen Absterben der Zellen und einem im Zeitverlauf abnehmenden CTT-Abbau zu rechnen. Deshalb wurde bei *D. multivorans* von einer Langzeit-Dechlorierungsfähigkeit, die zumindest zehn Tage umfasst, ausgegangen.

#### 4.1.7 Toxikologische Effekte von Melipax auf *Dehalospirillum multivorans*

Die in **Kap. 4.1.6** beschriebenen Langzeitstudien hatten bereits signalisiert, dass die dabei eingesetzten Mengen an CTTs auf *D. multivorans* nicht toxisch wirkten. Dies sollte nun durch höhere Dosierungen von Melipax (5,6 µg, 55,8 µg und 558 µg) geprüft werden. Im Falle eines toxischen Effekts von Melipax wären verminderte Zellzahlen oder Vitalität von *D. multivorans*-Zellen die Folge, und dies sollte bei einer Überimpfung auf frisches Pyruvat-Fumurat-Medium (vgl. **Kap. 3.4.1**) durch ein vermindertes Wachstum nachweisbar sein. Da jedoch - wenn überhaupt - nur geringe Effekte zu erwarten waren, wurden die Lösungen vor der Überimpfung auf das neue Medium siebenmal jeweils im Verhältnis von 1:10 verdünnt (**Abb. 22**).

Nach einem Tag wurden nur bei den Ansätzen mit der höchsten Konzentration an Melipax etwas geringere Zelldichten festgestellt (**Abb. 22a**). Die mit zunehmender Verdünnung abnehmende Bakteriendichte belegt, dass das Wachstum von *D. multivorans* im Verlauf des ersten Tages noch stark von den vorgelegten Zellen abhängt (**Abb. 22a**). So konnte ab der tausendfachen Verdünnung kein Anwachsen von *D. multivorans* beobachtet werden.

Nach vier Tagen zeichnete sich ein anderes Bild ab (**Abb. 22b**). In den Proben mit vormals hohen Bakteriengehalten (niedriger Verdünnungsfaktor) wurden jetzt die geringsten Zelldichten gefunden. Offensichtlich befanden sich diese Lösungen nach der anfänglichen exponentiellen Wachstumsphase (log Phase), dem sich ein Gleichgewicht zwischen Absterben und Reproduktion anschließt (stationäre Phase), bereits im Stadium eines vermehrten Absterbens von Bakterienzellen [105]. Als Gründe hierfür sind der Mangel an Nährstoffen, aber auch sich im Medium ansammelnde Abfallstoffe der Mikroorganismen, zu nennen [105].



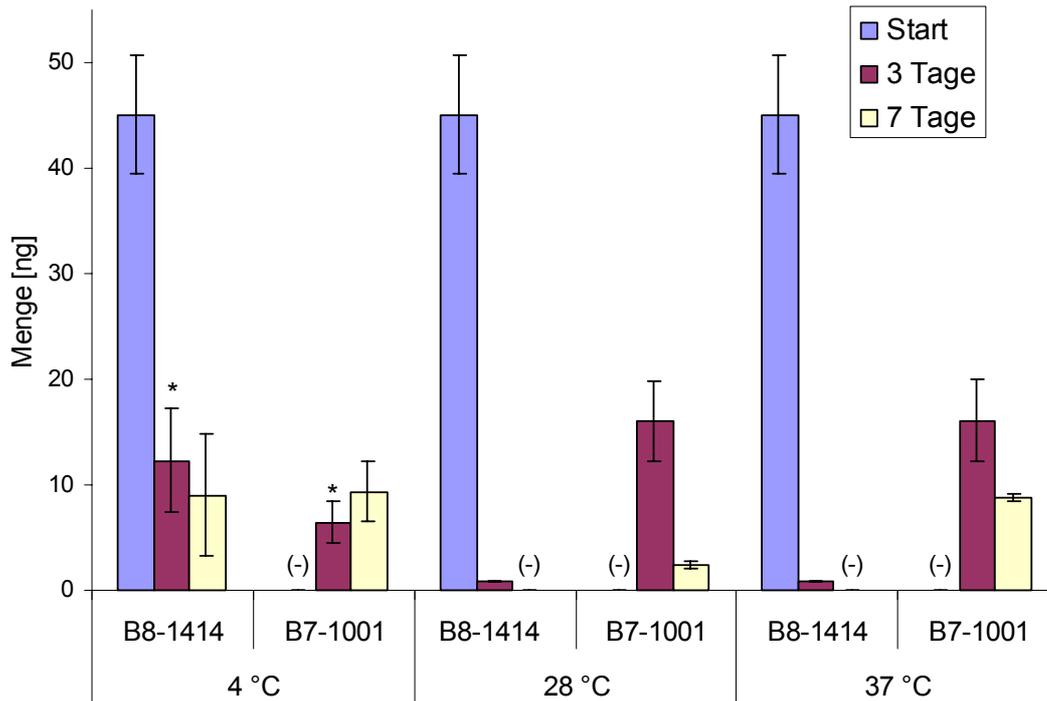
**Abb. 22** *D. multivorans* Zellgehalte in überimpften Lösungen, die zuvor mit unterschiedlichen Toxaphen-Mengen (5,6 µg, 55,8 µg und 558 µg) behandelt wurden. Die Verdünnungsreihen wurden a) einen Tag (nur bis Verdünnung 5) bzw. b) vier Tage nach der Überimpfung vermessen

Dagegen konnte ab der dritten Verdünnung bei allen Toxaphenkonzentrationen eine Zunahme des Bakteriengehaltes (bis ungefähr 150 µg/mL) festgestellt werden (**Abb. 22**). Trotz des Schwankungen, die sich in **Abb. 22b** erkennen lassen, war kein Absterben von *D. multivorans* durch Melipax zu beobachten. Trotzdem sollte die Obergrenze von 558 µg Melipax (112 µg/mL Bakterienlösung) aufgrund der oben genannten Befunde nach einem Tag nicht überschritten werden. Ein negativer Einfluss von *n*-Hexan (im Rahmen der Zugabe der CTTs in maximal 5 µL) auf die Bakterien konnte auch ausgeschlossen werden.

#### 4.1.8 Kontrolle des Temperatureinflusses auf den CTT-Abbau

Der optimale Temperaturbereich für eine Kultivierung von *D. multivorans* liegt bei 25 bis 28 °C [110], wobei der Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Abbau bisher noch nicht näher untersucht worden war [164]. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein CTT-Abbauexperiment bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 28 °C und 37 °C) durchgeführt (**Abb. 23**).

Als Modellverbindung diente B8-1414, wobei sowohl dessen Abbau als auch die Bildung des Metaboliten B7-1001 (vgl. **Kap. 4.3.2.2**) untersucht wurde. Bei 28 °C wurde innerhalb von drei Tagen ein 95-%iger Abbau von B8-1414 zu B7-1001 beobachtet (**Abb. 23**, Mitte). Nach einer anfänglich starken Bildung von B7-1001 (~ 30 % des Startgehaltes von B8-1414) blieb nach sieben Tagen nur noch 1/5 davon übrig (vgl. **Kap. 4.3.2.2**).



**Abb. 23** *Abbauprofil von B8-1414 und dessen Metabolit B7-1001 (vgl. Tab. 9, Versuch 1) durch eine Zellsuspension von D. multivorans unter Einfluss der Lagerungstemperatur über einen Zeitraum von sieben Tagen. Fehlerbalken geben Standardabweichung an. \* nur zwei Proben standen zur Verfügung (Abweichung vom Mittelwert)*

Bei 37 °C verlief der Abbau des B8-1414 ähnlich, der des B7-1001 nach dem dritten Tag jedoch wesentlich langsamer (**Abb. 23**, rechts). Somit scheint die höhere Temperatur zu einer höheren Letalrate der Bakterien zu führen.

Die bei 4 °C gelagerten Proben zeigten sowohl einen erheblich langsameren Abbau von B8-1414 als auch eine deutlich verzögerte Bildung von B7-1001, dessen Gehalt im Gegensatz zu den Experimenten bei höheren Temperaturen auch von Tag 3 bis Tag 7 noch zunahm (**Abb. 23**, links).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf den Abbau von CTTs hat. Es liegt nahe, dass die Temperatur auch beim Abbau in der Umwelt eine Rolle spielt. Somit könnten Unterschiede im CTT-Profil von Umweltproben (vgl. **Kap. 2.3.2**) auch teilweise temperaturbedingt sein.

Insgesamt bestätigte sich, dass eine Umgebungstemperatur von ungefähr 28 °C im anaeroben Zelt günstig für den CTT-Abbau war. Diese Temperatur wurde daher auch bei allen weiteren Ansätzen eingehalten.

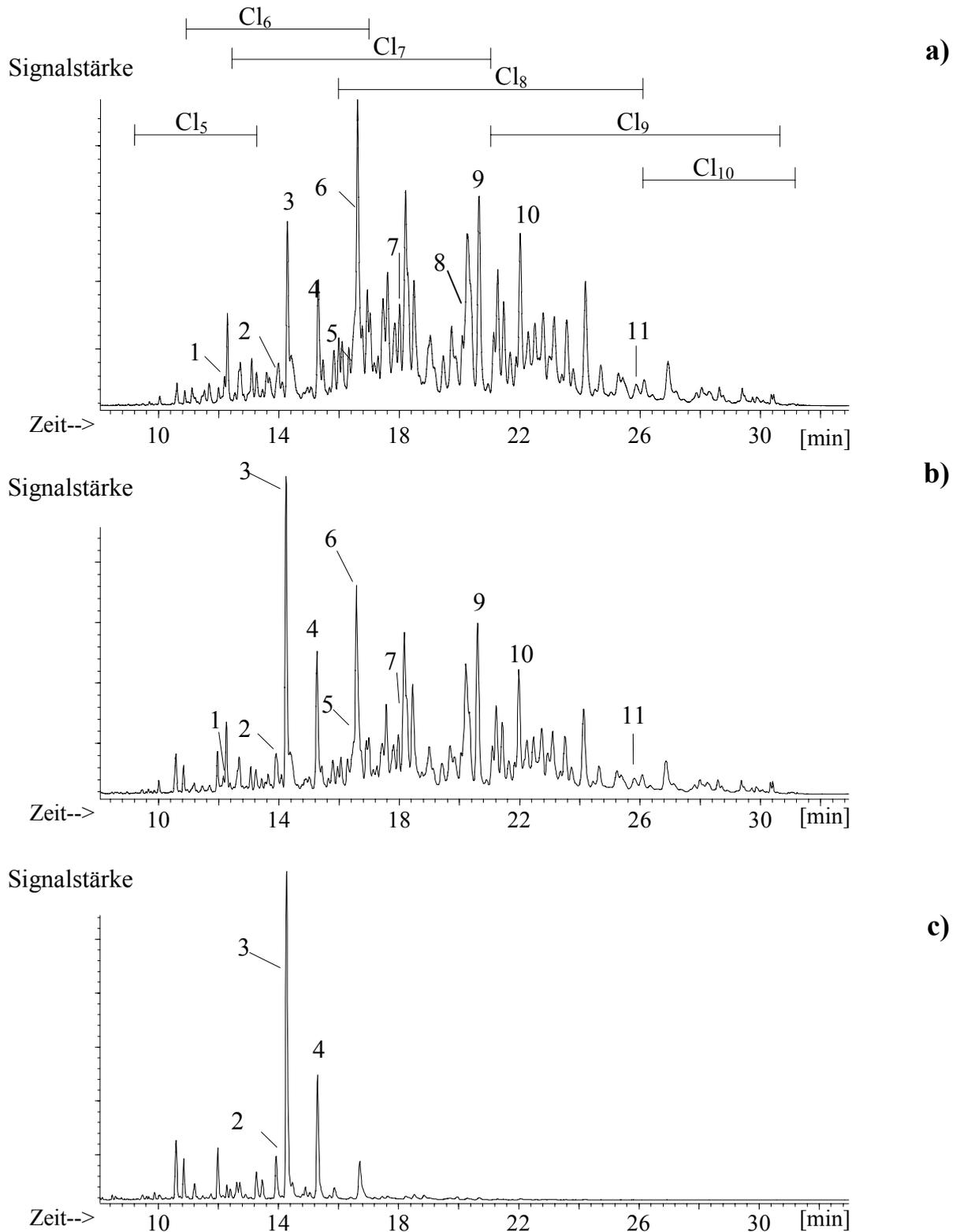
#### 4.1.9 Ergebnisse der Methodvalidierung

Die Untersuchung einzelner Faktoren im Hinblick auf die Validierung des Verfahrens zeigte, dass der Abbau von CTTs mit definierten Bakterienkulturen reproduzierbar durchgeführt werden kann. Bei Mehrfachbestimmungen ergaben sich maximale Unterschiede von 30 %, wobei große Unterschiede nur bei geringen Konzentrationen auftraten (vgl. **Kap. 4.1.1**). Zwar könnten diese Streuungen durch den Einsatz größerer Mengen an CTTs eingegrenzt werden (diesbezügliche Experimente ergaben keine toxische Wirkung von CTTs auf *D. multivorans*, vgl. **Kap. 4.1.7**), doch wurde dieser Ansatz aufgrund der schweren Zugänglichkeit von CTT-Standards nicht weiter verfolgt. Eine höhere Dotierung könnte aber bei der Untersuchung von leichter zugänglichen Organohalogenverbindungen durchaus von Vorteil sein. Auch die Kultivierung der Bakterien und das Einstellen einer bestimmten Zelldichte ließ sich soweit steuern, dass Wiederholungen der Experimente nach mehreren Monaten mit einer maximalen Abweichung von 15 % durchgeführt werden können (vgl. **Kap. 4.1.4**). In diesem Genauigkeitsbereich sollte sich die Methode auch in anderen Labors etablieren lassen. Dabei sollte neben der Einstellung eines günstigen Proteingehaltes von 0,9-1,3 mg/mL (vgl. **Kap. 4.1.4**) auch die Einhaltung der Temperatur (vgl. **Kap. 4.1.8**) kontrolliert werden. Durch Einsatz des internen Standards  $\alpha$ -PDHCH können Verluste bei der Probenvorbereitung sichtbar gemacht werden, wenn dieser unter eine Wiederfindungsrate von 70 % fällt (vgl. **Kap. 4.1.1**).

Somit stand bei Einhaltung der diskutierten Einflussgrößen ein Verfahren zur Verfügung, mit dem der anaerobe CTT-Abbau auf einfache Weise reproduzierbar untersucht werden kann. Das validierte Verfahren wurde im Folgenden für weitere Abbauxperimente, mit dem Ziel der Aufklärung der CTT-Abbauwege sowie der Identifizierung von unbekanntem Abbauprodukten unter Simulierung der in der Natur ablaufenden Prozesse, eingesetzt.

#### 4.2 Anaerober Abbau des technischen Gemisches Melipax

Nach der Validierung der Methode (vgl. **Kap. 4.1**) galt es nun sicherzustellen, dass der CTT-Abbau durch *D. multivorans* in ähnlicher Weise wie mit Mikroorganismen in Sedimenten, Böden und Klärschlämmen erfolgt [8][9][10][12]. Hierzu wurden 55  $\mu$ g Melipax sieben, 13 und 16 Tage lang mit einer Zellsuspension von *D. multivorans* inkubiert (**Abb. 24**, vgl. **ATab. 4**).



**Abb. 24** Abbau von Melipax (55 µg) durch *D. multivorans*; GC/ECNI-MS-SIM-Chromatogramme (Summe der Penta- bis Decachlorbornane, HP-5-Säule), a) vom Start, b) nach sieben Tagen und c) nach 16 Tagen; Markierte Signale entsprechen folgenden CTTs: **1**: B7-1000; **2**: B6-913; **3**: B6-923; **4**: B7-1001; **5**: B8-1413; **6**: B7-1473; **7**: 495/B7-515; **8**: B8-806/B8-809; **9**: B8-2229; **10**: B9-1679; **11**: B9-1025); Cl<sub>x</sub> = Retentionszeitbereich von Isomeren (x = Anzahl der Cl-Atome)

Die Startprobe (vgl. **Kap. 3.4.2.4**) zeigte das bekannte CTT-Muster aus hauptsächlich Hepta- bis Nonachlorbornanen (**Abb. 24a**). Die Verwendung von externen Standards erlaubte die Identifizierung und Quantifizierung von einzelnen CTTs. Ferner konnte der Elutionsbereich der Hepta- bis Nonachlorbornane durch Injektion von B7-1000, B8-1413 und B9-1679, welche jeweils als erstes Isomer von der HP-5-Kapillarsäule eluieren, bestimmt werden.

Nach sieben Tagen zählte B6-923 bereits zu den dominierenden CTTs und nach 16 Tagen konnten nur noch Spuren von Octa-, Nona- und Decachlorbornanen detektiert werden (**Abb. 24b, c**). Aus dem Verhältnis der quantifizierten Hepta- und Nonachlorbornane (**Tab. 12**), das im Verlauf der ersten 13 Tage um mehr als den Faktor zehn zunahm, geht die Verschiebung des CTT-Musters in Richtung niederchlorierter CTTs deutlich hervor (**Tab. 12**).

Betrachtet man einzelne CTTs, so weisen bestimmte Isomere erhebliche Unterschiede im Abbauverhalten auf (vgl. **ATab. 4**). So kann das Signal aus B7-495/B7-515 (**Abb. 24**, Signal 7) im Gegensatz zu allen anderen Heptachlorbornanen nur sieben Tage lang nachgewiesen werden.

Durch Quantifizierung von 27 CTTs im Melipax wurden knapp 20 % des eingesetzten Gehaltes in der Startprobe erfasst [7]. Die bei den Heptachlorbornanen beobachtete Abnahme der Konzentration verbunden mit der gleichzeitigen Bildung einiger Hexa- und Pentachlor-CTTs legt den Schluss nahe, dass der Einsatz von *D. multivorans* einen Abbau zu CTTs mit einem Chlorierungsgrad kleiner sieben ermöglicht (**Abb. 24c**).

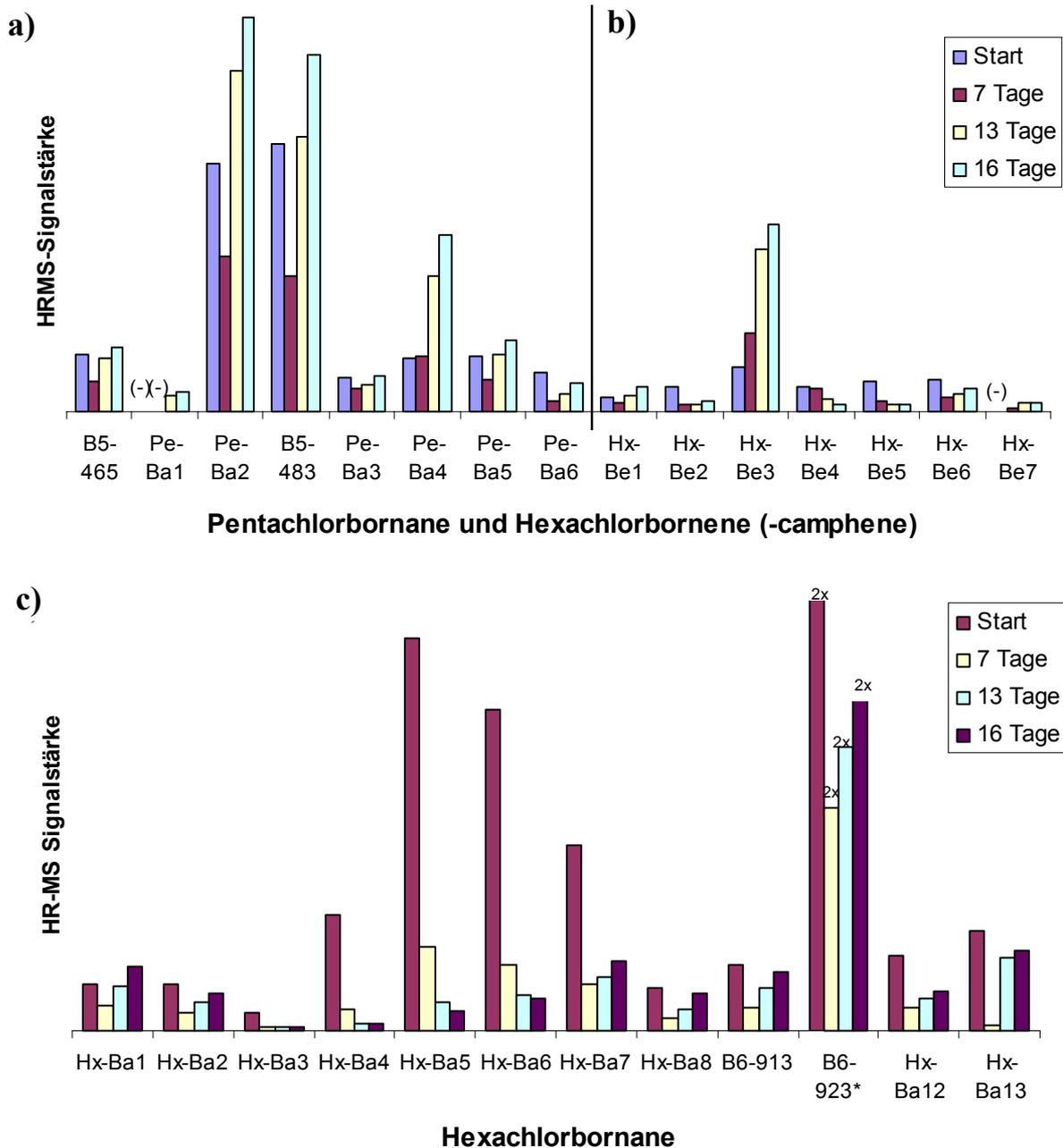
**Tab. 12** CTT-Gehalte beim Abbau von technischem Toxaphen (55 µg) durch *D. multivorans*

	Start [ng]	7 Tage [ng]	13 Tage [ng]	16 Tage [ng]
Σ Heptachlorbornane <sup>b</sup>	1580	295	125	175
Σ Octachlorbornane <sup>b</sup>	3860	455	20	1,6
Σ Nonachlorbornane <sup>b</sup>	3730	230	26	-*
Σ 27 CTT <sup>a, b</sup>	9360	1080	335	365
Σ Heptachlorbornane	0,42	1,28	4,70	-
Σ Nonachlorbornane				

\* < 0,1 ng

<sup>a</sup> 25 CTT-Standard (vgl. **Kap. 3.7**) plus B7-1473, B7-1453 und B8-1412, jedoch ohne B5-595

<sup>b</sup> vgl. **ATab. 4**



**Abb. 25** Abbauprofil von Melipax: a) Pentachlorbornane, b) Hexachlorbornene, c) Hexachlorbornane; gemessen an GC/ECNI-HRMS-SIM (intensivste Fragmentation herangezogen, vgl. Kap. 3.2.4), Retentionszeit siehe Kap. 4.7 bzw. ATab. 5; \* Signalstärke doppelt so groß wie angezeigt

Eine genauere Untersuchung von 27 niederchlorierten CTTs mit Hilfe der GC/ECNI-HRMS (vgl. Kap. 3.2.4) zeigte, dass neben Penta- und Hexachlorbornanen auch ungesättigte CTTs vorlagen (Abb. 25). Dabei handelte es sich mit Ausnahme von B6-923 und B6-913 um strukturell unbekannte CTTs (die Strukturen von B5-465 und B5-483 wurden im Zuge dieser Arbeit aufgeklärt; vgl. Kap. 4.3.2.3, 4.3.3.2). Auch im Fall von Pentachlor- und Hexachlor-CTTs gab es Verbindungen, deren Gehalte im Verlauf des Experimentes zunahm (z.B. Hx-Be3) oder abnahm (z.B. Hx-Ba5). In den ersten sieben

Tagen war bei fast allen CTTs eine Abnahme zu beobachten, jedoch fand im Weiteren (13 bzw. 16 Tage) bei fast allen niederchlorierten CTTs eine Zunahme der Konzentration statt. Aus der Reihe der Pentachlorbornane dominierten bei allen Probenahmen Pe-Ba2 und B5-483 (**Abb. 25a**). Hx-Be3 war das dominierende ungesättigte Hexachlor-CTT (**Abb. 25b**). Neben B6-923 wurden zunächst Hx-Ba5 bis Hx-Ba7 als Haupthexachlorbornane identifiziert, deren Konzentrationen im Verlauf der 16 Tage jedoch stark abnahmen (**Abb. 25c**). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass neben dem Chlorierungsgrad weitere strukturelle Eigenschaften für die Stabilität von CTTs in Suspensionen von *D. multivorans* verantwortlich sein müssen. Die reduktive Dechlorierung von *gem*-Cl<sub>s</sub> war bereits als Hauptweg des anaeroben CTT-Abbaus erkannt worden [1][8]. Allerdings wird das Vorliegen dieses Strukturmerkmals bei niederchlorierten CTTs aufgrund der sieben möglichen C-Atome des Bornangerüsts, die chloriert sein können, immer unwahrscheinlicher. Interessanterweise lagen alle detektierten ungesättigten CTTs bereits in Melipax vor. Aus der Zunahme ihrer Konzentration geht hervor, dass zumindest einige von ihnen durch den Abbau von höherchlorierten Bornanen nach Dehydrochlorierung - oder Camphenen nach Dechlorierung - entstanden.

Der Nachweis von Penta- und Hexachlor-CTTs deckte sich mit Ergebnissen, die nach der Untersuchung von Sedimenten erhaltenen worden waren. Zwei Pentachlorbornane waren kürzlich als Rückstände in einem kontaminierten Sediment aus den südlichen USA beschrieben worden [8][11]. Außerdem waren in dieser Sedimentprobe neben B7-1001 u.a. vier weitere unbekannte Heptachlorbornane (Hepta #A - #D) detektiert worden [8]. Dagegen war nach 16 Tagen Inkubation von Melipax mit *D. multivorans* mit B7-1001 nur ein dominierendes Heptachlorbornan nachweisbar (vgl. **ATab. 4**). Wie bereits berichtet, können die CTT-Rückstandsmuster von Sedimenten in belasteten Ökosystemen stark variieren (vgl. **Kap. 2.3.2**), wobei die dort ermittelten CTT-Muster von einem nahezu vollständigen Abbau zu B6-923 und B7-1001 bis zu einer Dominanz von Octa- und Nonachlor-CTTs schwankten. Dabei sind die in der Umwelt beobachteten CTT-Rückstandsmuster mit dem nach sieben- bis 13-tägiger Behandlung mit *D. multivorans* erhaltenen CTT-Profil vergleichbar. Somit war der CTT-Abbau mit *D. multivorans* zur Beschreibung der Verhältnisse in der Umwelt geeignet. Die einfache Durchführung, die kommerzielle Verfügbarkeit von *D. multivorans* und die Reproduzierbarkeit der beschriebenen Methode sind hierbei von großem Vorteil gegenüber dem Arbeiten mit Boden- und Sedimentproben.

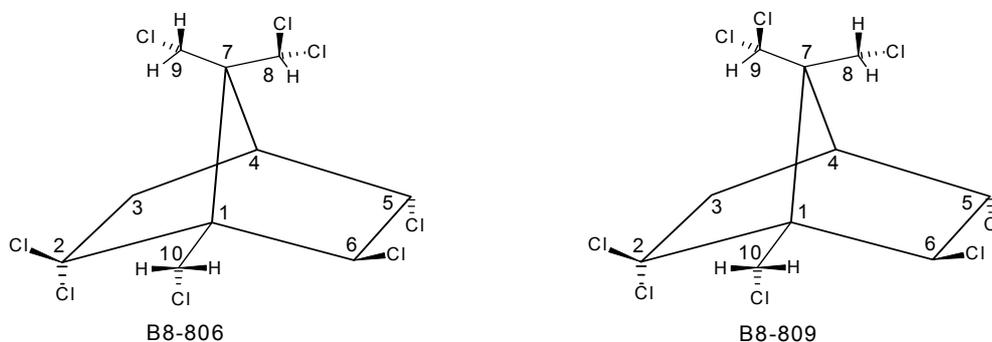
Allerdings verdeutlichen die in **Kap. 4.2** mit Melipax erzielten Ergebnisse, dass eine Aufklärung der Abbauwege aufgrund der Komplexität des Gemisches nicht möglich ist. Um strukturabhängige Befunde zu erhalten, wurden im Folgenden auf CTT-Einzelverbindungen zurückgegriffen. Dabei waren die Möglichkeiten aufgrund der eingeschränkten kommerziellen Verfügbarkeit und des gegebenenfalls hohen Preises erschwert (vgl. **Kap. 2.2.2**). Neben den im Arbeitskreis vorliegenden CTTs B8-1412, B8-806, B8-809, B9-1679, B9-1025, B7-1453 wurden die in dieser Arbeit isolierten B6-923, B7-1001 und B8-1414 (vgl. **Kap. 3.3.1**) eingesetzt.

### 4.3 Regiospezifische Untersuchungen des anaeroben Abbaus von CTT-Einzelstandards mit *Dehalospirillum multivorans*

#### 4.3.1 Abbau von Chlorbornanen mit geminalen Chloratomen an primären und sekundären Kohlenstoffen

##### 4.3.1.1 Inkubation von B8-806 mit *Dehalospirillum multivorans*

Fingerling *et al.* konnten zeigen, dass Toxicant A (Gemisch aus B8-806 und B8-809) im Boden zu B6-923 abgebaut wird [13]. Zu beachten ist, dass die strukturell ähnlichen Diastereomere des Toxicant A an DB-5-Säulen, die bei etwa 90 % aller CTT-Bestimmungen eingesetzt werden [2], koeluierten. Die beiden Vorläufer des B6-923 besitzen je zwei *gem*-Cls, von denen jeweils ein Cl durch ein H ersetzt werden muss, um zu B6-923 zu gelangen. *Gem*-Cls befindet sich am sekundären Kohlenstoff C-2 des Sechsrings und an einem primären Kohlenstoff der Brücke (C-8 bei B8-806 und C-9 bei B8-809) (**Abb. 26**).

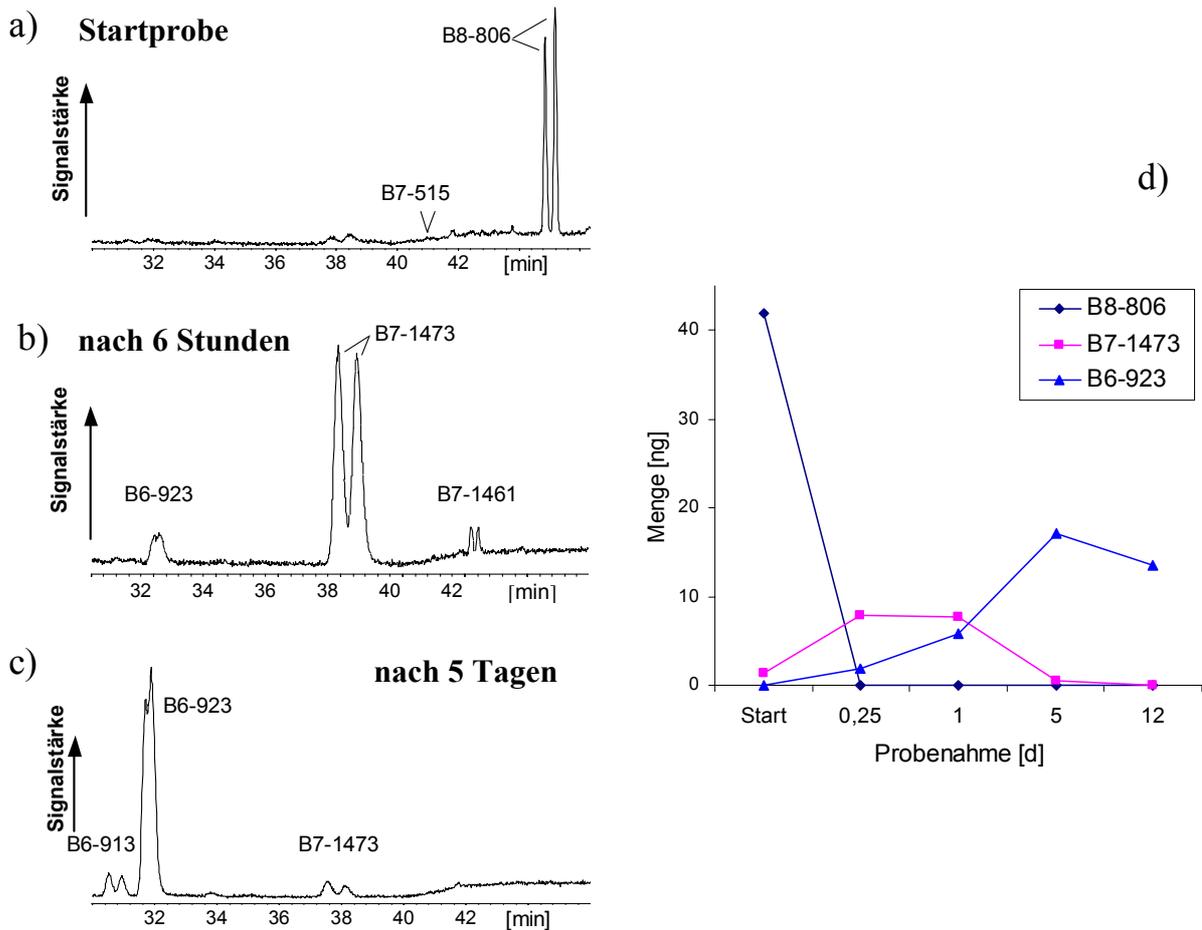


**Abb. 26** Struktur von B8-806 und B8-809

Durch Identifizierung der Zwischenprodukte des Abbaus sollte geklärt werden, ob einer der beiden Kohlenstoffe mit *gem*-Cls bevorzugt angegriffen wird. Hierbei erwies es sich als Glücksfall, dass uns B8-806 schon vor seiner kommerziellen Einführung als

Einzelstandard zur Verfügung stand (vgl. **Kap. 3.7**). Ein rascher B8-806-Abbau mit *D. multivorans* war anhand der Untersuchung von Melipax (vgl. **ATab. 4**) vermutet worden. Deshalb erfolgten die Probenahmen in relativ kurzen Intervallen.

Tatsächlich war B8-806 bereits nach sechs Stunden quantitativ abgebaut. Gleichzeitig wurde ein unbekanntes Heptachlorborman als Hauptmetabolit nachgewiesen (**Abb. 27b**).



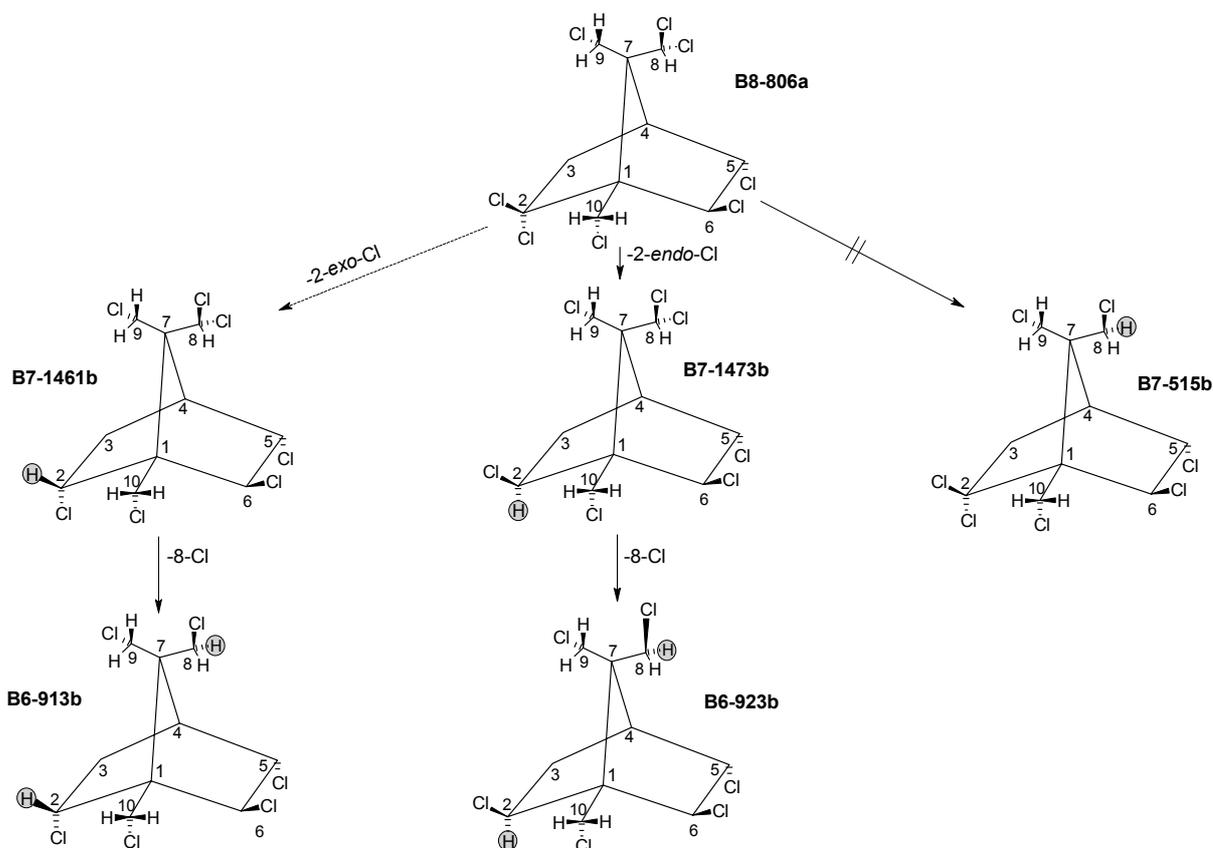
**Abb. 27** Abbau von B8-806 durch Einsatz einer Zellsuspension von *D. multivorans*; Linke Seite: GC/ECNI-MS-SIM-Chromatogramme (chirale  $\beta$ -BSCD-Säule(i), Summe von sechs Ionen), a) Start b) nach sechs Stunden und c) nach fünf Tagen; zu beachten ist, dass der Abbau nicht enantioselektiv abläuft. Rechte Seite: Abbauprofil des B8-806 (keine lineare Zeitachse)

Da B7-515 (Toxicant B, B8-806 minus Cl an C-8) nicht detektierbar war, konnte die beobachtete schnelle Dechlorierung nicht am primären C-8 erfolgt sein (**Abb. 28**). Dies bestätigt Beobachtungen von Fingerling *et al.* [13], die beim Abbau von B8-806/B8-809 in Bodenproben ebenfalls kein B7-515 nachweisen konnten.

Nach fünf Tagen war das unbekannte Zwischenprodukt zu B6-923 abgebaut worden (**Abb. 27c**). Somit war bewiesen, dass der schnelle Abbau an C-2 erfolgt war. Damit war die

Struktur des Zwischenproduktes aufgeklärt, da einzig 2-*exo*,3-*endo*,6-*exo*,8,8,9,10-Heptachlorbornan (B7-1473) aus B8-806 gebildet und weiter zu B6-923 abgebaut werden kann (vgl. **Abb. 28**). Allerdings wäre bei der Reduktion an C-2 nicht nur die Entfernung des 2-*endo*-Cl (Bildung von B7-1473), sondern auch des 2-*exo*-Cl (Bildung von B7-1461) möglich gewesen. In der Tat wurde in der Reaktionslösung nach sechs Stunden ein Minor-Heptachlorbornan entdeckt, das dann weiter zu B6-913 reduziert wurde (**Abb. 27b, c**).

B6-923 und B6-913 lagen in der Probe nach fünf Tagen im Verhältnis von 10:1 vor. Ein ähnlicher Verlauf war auch von Fingerling *et al.* [13] beschrieben worden, und aufgrund deren Untersuchung konnte die Identifizierung von B6-913 anhand seines ECNI-MS-Spektrums, in dem das Molekülion und das  $[M-Cl]^-$  Fragmentation die gleiche Intensität aufweisen, bestätigt werden. Folglich handelt es sich beim zweiten Minor-Heptachlorbornan, das nach sechs Stunden detektiert wurde, um B7-1461 (**Abb. 27b**). Die Messung an einer chiralen Kapillarsäule ( $\beta$ -BSCD) zeigte außerdem, dass der Abbau nicht enantioselektiv abläuft, da sowohl B8-806 als auch die Zwischen- und Endprodukte racemisch vorlagen.



**Abb. 28** CTT-Strukturen und Prozesse, die beim Abbau von B8-806 erkannt wurden, die Buchstaben a und b bezeichnen die einzelnen Enantiomere (vgl. **Kap. 2.2.1**). ○ Positionen des Cl  $\rightarrow$  H-Austausches

Eine Bildung von B6-913 - nach anfänglicher Reduktion - wurde auch beim Abbauxperiment mit Melipax beobachtet (**Abb. 25b**). Dagegen war bei B7-1473 und B7-1461 eine kontinuierliche Abnahme während des Melipax-Abbaus zu verzeichnen (vgl. **ATab. 4**), wobei die schnelle Bildung durch die erst nach sieben Tagen erfolgte erste Probenahme nicht nachzuweisen war.

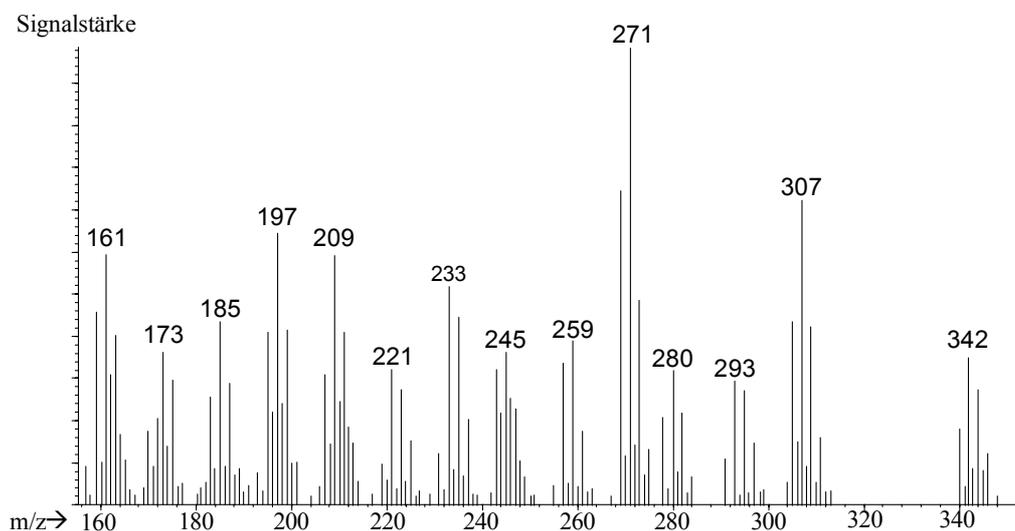
Durch Vergleich der Ergebnisse des B8-806-Abbaus lässt sich ermitteln, dass die Substitution des 2-*endo*-Cl (B8-806→B7-1473) rund zwanzigmal schneller (6 h gegen 5 d) erfolgte als die Reduktion an C-8 (B7-1473→B6-923).

#### *Strukturaufklärung von B7-1473*

Die Richtigkeit der Zuweisung einer Struktur allein aufgrund der Identifizierung einer Abbauzwischenstufe soll am Beispiel des B7-1473 durch spektrometrische Daten (GC/EI-MS und  $^1\text{H-NMR}$ ) exemplarisch belegt werden.

#### *Interpretation des GC/EI-MS Spektrums von B7-1473*

Die Aufnahme eines aussagekräftigen EI-MS-Spektrums war bereits durch Aufkonzentrierung einer B8-806-Abbauprobe, die nach einem Tag mit *D. multivorans* erhalten wurde, möglich (vgl. **Kap. 4.3.1.1**) (**Abb. 29**).



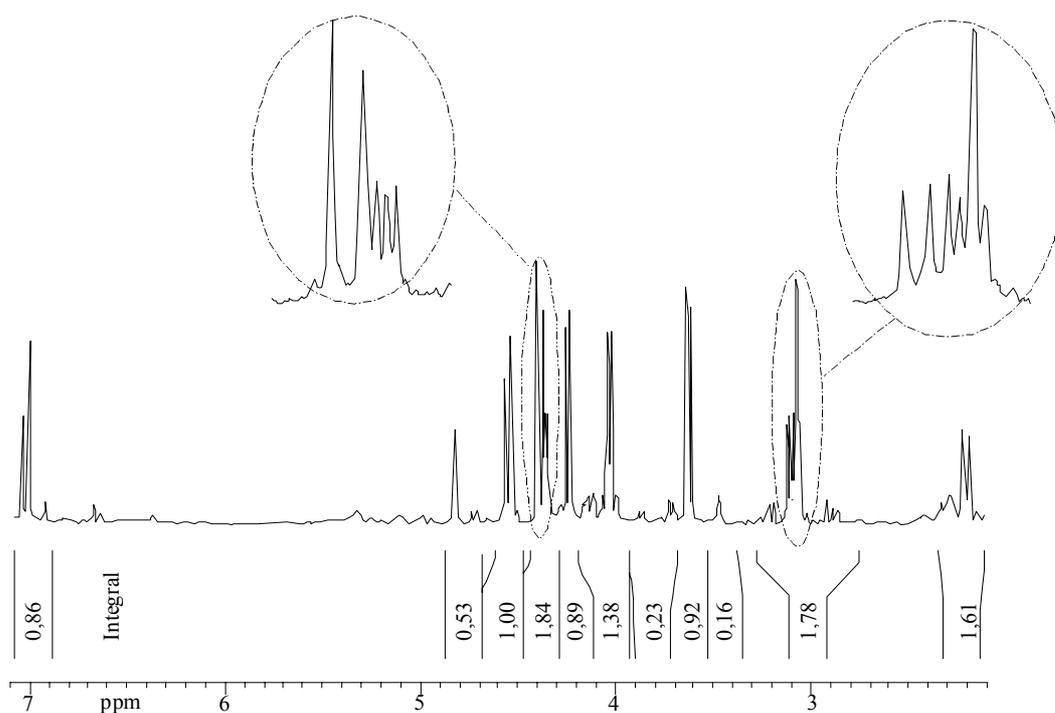
**Abb. 29** GC/EI-MS-Spektrum ( $m/z$  157-400) von B7-1473

Das Molekölion von B7-1473 ( $m/z$  376) konnte nicht beobachtet werden, sondern nur das  $[\text{M-HCl}]^+$ -Fragmention, das gegenüber dem  $[\text{M-Cl}]^+$ -Fragmention dominiert. Das intensivste Massenfragment bei  $m/z$  271 ist Bestandteil des  $[\text{M-Cl-2HCl}]^+$ -Fragmentions.

Das Fragmentation  $m/z$  291 geht auf die Eliminierung einer Chlormethylgruppe und HCl zurück, diese wird von der Eliminierung einer Dichlormethylgruppe aus dem Molekölion ( $m/z$  293) überlagert. Dabei sollten sich anhand der theoretischen Massenmuster folgende prozentuale Häufigkeit ergeben: 38-99-100-51-12 ( $m/z$  291-293-295-297-299) [139]. Diese wurde bis auf den geringen Unterschied  $m/z$  293 $\rightarrow$ 295, der jedoch innerhalb von 10 % lag, auch gefunden (vgl. **Abb. 29**). Ein weiterer Beweis für eine Dichlormethylgruppe war das Fragmentation  $m/z$  221, das auf die Eliminierung einer Dichlormethylgruppe und zwei HCl zurückgeht. Das RDA-Fragment  $m/z$  278 enthielt fünf Cl-Substituenten und wird nach Eliminierung von HCl und  $C_2H_3Cl$  aus dem Molekölion gebildet. Somit enthielt das Molekül auch eine  $CH_2CHCl$  Struktureinheit an C-2/C-3- oder C-5/C-6-Position [27]. Daraus ergibt sich, dass B7-1473 an C-2/C-3- oder C-5/C-6-Position zwei Chlor und entsprechend an der verbliebenen Position nur ein Cl aufweist. Die vier übrigen Cl-Atome verteilen sich auf C-8, C-9 und C-10, die sich aus einer Dichlormethyl- und zwei Chlormethylgruppen zusammensetzen. Somit konnten die bei B7-1473 vorgeschlagenen Strukturelemente bestätigt werden.

#### Strukturaufklärung von B7-1473 mittels $^1H$ -NMR

Um die Identifizierung von B7-1473 zu untermauern, sollte die Verbindung mit Hilfe der  $^1H$ -NMR untersucht werden (**Abb. 30**).



**Abb. 30**  $^1H$ -NMR-Spektrum von B7-1473, zwei Signale wurden vergrößert

Hierzu wurden die mit Hilfe der NP-HPLC gewonnenen Fraktionen, die ca. 6  $\mu\text{g}$  B7-1473 enthielten, eingesetzt. Dies liegt im unteren Bereich für eine Aufnahme von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in einem realisierbaren Zeitrahmen.

Die gefundenen Signale (7 bis 2,2 ppm, vgl. **Tab. 13**) lagen im Bereich der Literaturangaben für CTTs [2][60][61][96][141][165]. Allerdings kam es zur Überlagerung von zwei Signalen, wie dies in den vergrößerten Abschnitten von **Abb. 30** dargestellt ist.

**Tab. 13** führt auch die von Fingerling [96] veröffentlichten NMR-Daten von B6-923 auf. Nach diesen Daten konnten die erhaltenen chemischen Verschiebungen weitgehend mit Sicherheit zugeordnet werden. Die Daten stimmten dabei mit den erwarteten Werten überein.

**Tab. 13**  $^1\text{H-NMR}$ -Daten von B7-1473 und zum Vergleich von B6-923 [96][165]

B7-1473					B6-923			
$\delta^a$ [ppm]	$I^b$	$M^c$	$J$ [Hz] <sup>d</sup>	Pos. $H^e$	$\delta^a$ [ppm]	$M^c$	$J^d$ [Hz]	Pos. $H^e$
7,00	1	d	1,9	H-9	4,27	dd	12,1; 1,2	H-9
4,83	1	ddd	8,9; 6,9; 4,7; 2,1	H-3- <i>exo</i> <sup>f</sup>	4,18	d	12,1	H-9
4,55	1	dd	13,6 1,8	H-8a	4,33	dd	12,1; 1,2	H-8
4,38	1	dd	13,9	H-8b	4,23	d	12,1	H-8
4,35	1	m	8,9; 6,3; 4,4	H-6- <i>endo</i> <sup>f</sup>	3,99	d	4,3	H-2- <i>endo</i>
4,24	1	d	11,7	H-10	4,18	d	11,9	H-10
4,03	1	d	4,7	H-2- <i>endo</i> <sup>f</sup>	4,57	ddd	4,6; 4,3; 2,1	H-3- <i>exo</i>
3,63	1	d	11,6	H-10	3,94	d	11,9	H-10
3,1	2	m	15,9; 9,0; 6,9; 4,7	H-5- <i>endo</i> ; H-4 <sup>f</sup>	3,0	dd	15,5; 9,0	H-5- <i>endo</i>
2,2	1	m	15,9; 4,5; 2,1; 1,9	H-5- <i>exo</i>	2,19	dddd	15,5; 4,7; 4,6; 2,1	H-5- <i>exo</i>
					2,68	dd	4,6; 4,6	H4
					4,28	dd	9,0; 4,7	H-6- <i>endo</i>

<sup>a</sup>  $\delta$  = chemische Verschiebung,

<sup>b</sup>  $I$  = relative Intensität (Anzahl der Protonen)

<sup>c</sup>  $M$  = Multiplizität,  $d$  = Dublett,  $dd$  = dopplettes Dublett,

$ddd$  = dreifaches Dublett,  $dddd$  = vierfaches Dublett,  $m$  = Multiplett

<sup>d</sup>  $J$  = Kopplungskonstante

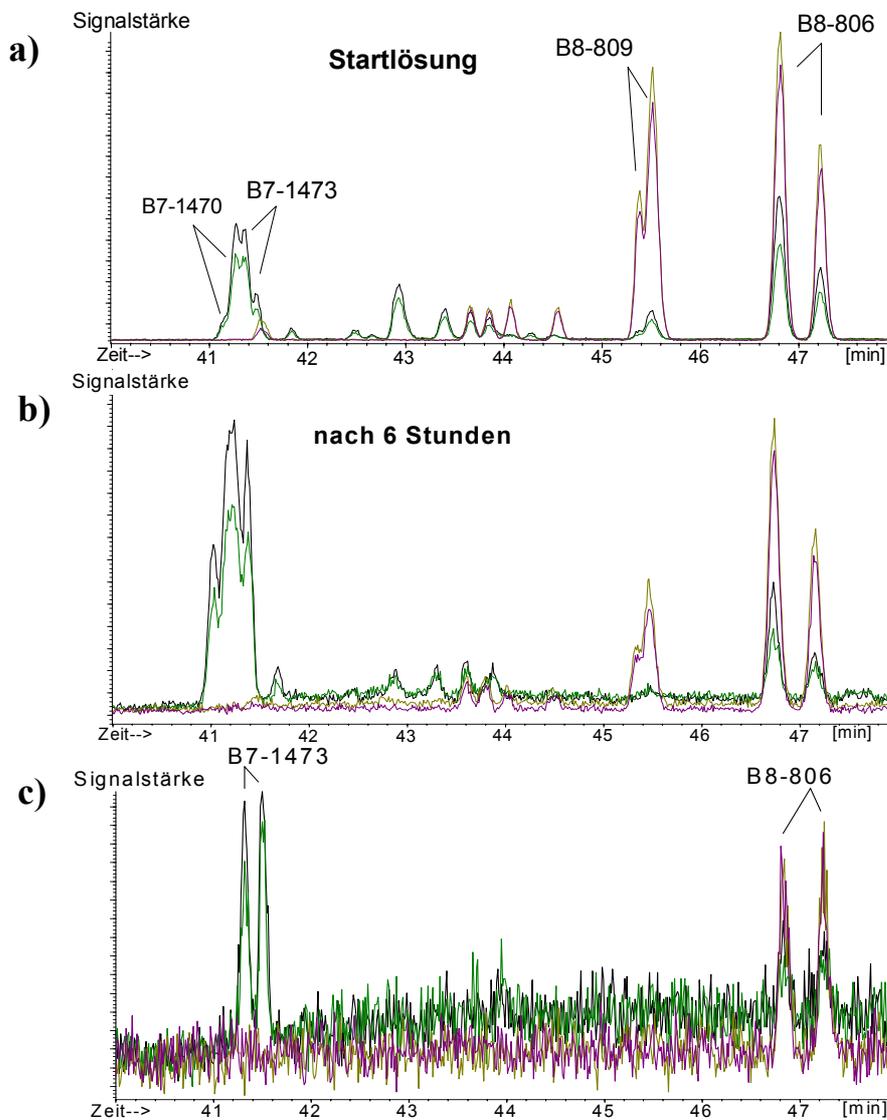
<sup>e</sup> Position der Protonen

<sup>f</sup> Signale wurden anhand des Literaturvergleichs zugeordnet

Ermotigt durch die Identifizierung von zwei unbekanntem CTTs und erste Aufschlüsse bzgl. des Abbauweges wurden weitere Experimente durchgeführt.

#### 4.3.1.2 Einsatz eines Gemisches aus B8-806 und B8-809

Die beim Abbau von B8-806 gewonnenen Ergebnisse sollten nun durch den Einsatz von Toxicant A (B8-806/B8-809) überprüft werden. Für diesen Abbauersuch stand allerdings nur eine Lösung mit geringen B8-806- und B8-809-Gehalten, die außerdem verunreinigt war, zur Verfügung (**Abb. 31**). Aufgrund der Koelution von B8-806 und B8-809 an DB-5-Säulen (vgl. **Kap. 2.6.1**) wurde die chirale  $\beta$ -BSCD-Phase, die eine Trennung der Diastereomere erlaubt, eingesetzt.



**Abb. 31** B8-806/B8-809-Abbau mit *D. multivorans*; GC/ECNI-MS-SIM-Chromatogramme ( $\beta$ -BSCD-Säule (i), Hepta- bis Octachlorbornane), a) Start, b) nach sechs Stunden, c) Standardlösung zum  $t_r$ -Vergleich (B8-806 und B7-1473)

Aus der Startlösung (**Abb. 31a**) wird ersichtlich, dass die Signale der Enantiomere von B8-806, B8-809, B7-1473 und eines weiteren Heptachlorbornans nicht die gleichen Höhen aufwiesen (**Abb. 31a**). Aufgrund der chemischen Synthese einzelner CTTs, die zu Racematen führt, muss davon ausgegangen werden, dass Störsignale für diese Beobachtungen verantwortlich sind.

Aufgrund dieser Verunreinigungen waren quantitative Aussagen nicht möglich, doch konnte anhand der Flächenintegrale ein schnellerer Abbau von B8-809 nachgewiesen werden. So machte B8-809 zu Beginn 55 %, nach sechs Stunden 45 % und nach einem Tag nur noch 30 % der Summe beider Octachlorbornane (B8-809/B8-806) aus (**Abb. 31**). Dies deckt sich nicht mit Ergebnissen von Vetter *et al.* [166], die beim Abbau von Melipax mit Klärschlamm B8-809 und nicht B8-806 als Hauptkomponente identifiziert hatten.

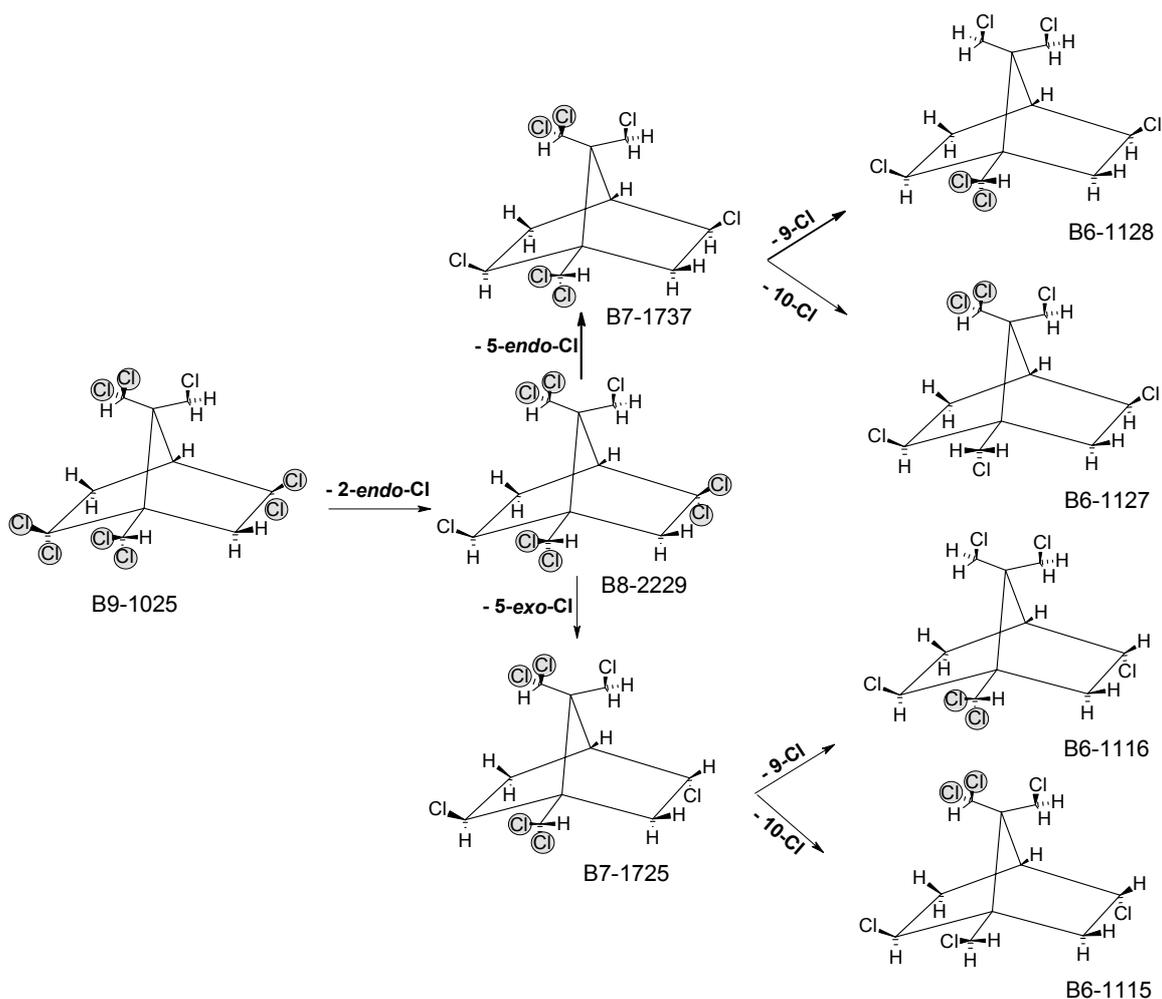
Der Abbau des Gemisches B8-806/B8-809 verlief zwar langsamer als bei Einsatz von reinem B8-806, doch waren nach fünf Tagen ebenfalls keine Ausgangsprodukte, dafür aber B6-923 und B6-913, detektierbar.

B7-1473, der Heptachlormetabolit des B8-806, war bereits in der Ausgangslösung enthalten (vgl. **Abb. 31a**). Zudem zeigte sich, dass B7-1473 von einem weiteren Heptachlor-CTT an  $\beta$ -BSCD-Säulen überlagert wurde (**Abb. 31c**), das sich ebenfalls während der ersten sechs Stunden anreichterte. Die beiden Heptachlorbornane konnten jedoch an DB-5- und HP-5-Säulen getrennt werden (vgl. **Kap. 4.7**). Da der Abbau von B8-809 ebenfalls zu B6-923 führt, kommt als Hauptzwischenprodukt - in Analogie zum B8-806-Abbau - nur 2-*exo*,3-*endo*,6-*exo*,8,9,9,10-Heptachlorbornan (B7-1470) in Frage. Bekräftigt wird diese Hypothese durch die ähnlichen Retentionszeiten von B7-1473 und B7-1470, wie dies auch bei B8-806 und B8-809 der Fall ist.

Der Nachweis weiterer Heptachlorbornane konnte aufgrund niedriger Bildungsraten und der verunreinigten Ausgangslösung nicht erbracht werden. Analog zur Bildung von B7-1461 aus B8-806 war auch die Entstehung von B7-1458 (B8-809 – 2-*exo*-Cl) erwartet worden. Diese Verbindung wäre insofern interessant, als dass sie gegen die empirisch gefundene „Brücke-und-*exo*“-Regel (siehe **Kap. 2.2.1**) verstoßen würde. Diese Regel, von der bisher keine Abweichung bekannt ist, besagt, dass CTTs mit *gem*-Cl an C-9 auch ein 2-*exo*-Cl aufweisen. Dies könnte bedeuten, dass die „Brücke-und-*exo*“-Regel nicht nur bei der Synthese sondern auch beim CTT-Abbau Gültigkeit besitzt.

4.3.1.3 Inkubation von B9-1025 mit *Dehalospirillum multivorans*

In **Kap. 4.2** wurde gezeigt, dass *D. multivorans* alle Octa- und Nonachlorbornane in Melipax abbauen kann. B9-1025, welches eine der Hauptkomponenten in Melipax (vgl. **ATab. 4**) und in Fisch ist [2], weist vier *gem*-Cls auf, die an den sekundären Kohlenstoffen C-2 und C-5 und an den primären Kohlenstoffen C-9 und C-10 zu finden sind (**Abb. 32**). Ein Abbau, der nur an C-Atomen mit *gem*-Cls erfolgt, könnte zur Bildung von sechs Octachlorbornanen führen, von denen nur B8-2229 (- 2-*endo*-Cl) (**Abb. 32**) und B8-786 (- 9-Cl) aus der Literatur bekannt waren.

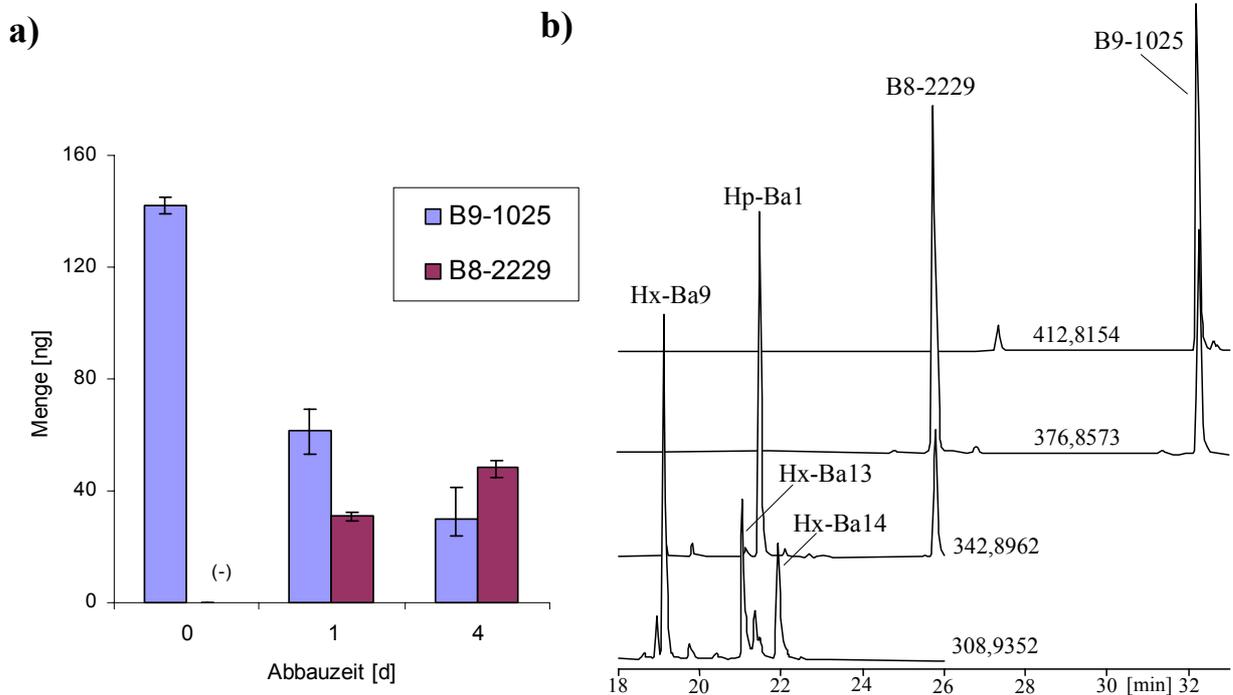


**Abb. 32** Abbauschema des B9-1025 zu vier möglichen Hexachlorbornanen, *gem*-Cls sind grau unterlegt

Rund 60 % des B9-1025 waren nach einem Tag und rund 80 % nach vier Tagen abgebaut (**Abb. 33a**, **Tab. 11**). Dies deckt sich mit dem 95-%igen Abbau von B9-1025 nach sieben Tagen in Melipax (vgl. **ATab. 4**). Zur unserer Überraschung konnte als einziges Octachlorbornan B8-2229 nachgewiesen werden (**Abb. 33b**), dessen Konzentration im Verlauf des Experiments stetig zunahm. Die bevorzugte Abspaltung des 2-*endo*-Cl war

bereits bei B8-806 und B8-809 beobachtet worden. Auch ist die Abspaltung des 2-*exo*-Chloratoms aufgrund der „Brücke-und-*exo*“-Regel (siehe **Kap. 4.3.1.2**) unwahrscheinlich, solange noch *gem*-Cls an C-9 vorliegen.

Die Massenbilanz des Abbaus (Summe der Gehalte von B9-1025 und B8-2229) verdeutlicht, dass nach einem Tag rund 2/3 und nach vier Tagen nur noch die Hälfte der ursprünglich eingesetzten Menge an CTTs nachweisbar ist. Dies deutet auf einen weiteren Abbau des B8-2229 hin, der aufgrund der drei verbliebenen *gem*-Cls an B8-2229 wahrscheinlich war und durch die Detektion eines intensiven Heptachlorbornans (Hp-Ba1) und mehrerer Hexachlorbornane belegt wurde (**Abb. 33b**). Die höhere Stabilität der *gem*-Cls an primären C-Atomen (vgl. **Kap. 4.3.1.1**) deutet auf eine reduktive Dechlorierung der *gem*-Cls am sekundären C-5 hin. Weiterhin ist nach den bisherigen Ergebnissen eine selektive Abspaltung des 5-*exo*-Cl (B7-1725, **Abb. 32**) unwahrscheinlich, so dass es sich bei dem Heptachlorbornan am ehesten um B7-1737 handeln dürfte. Der Nachweis der Hexachlorbornane verdeutlicht, dass bei einem CTT durchaus  $\geq 3$  Chloratome durch Wasserstoff ausgetauscht werden können.



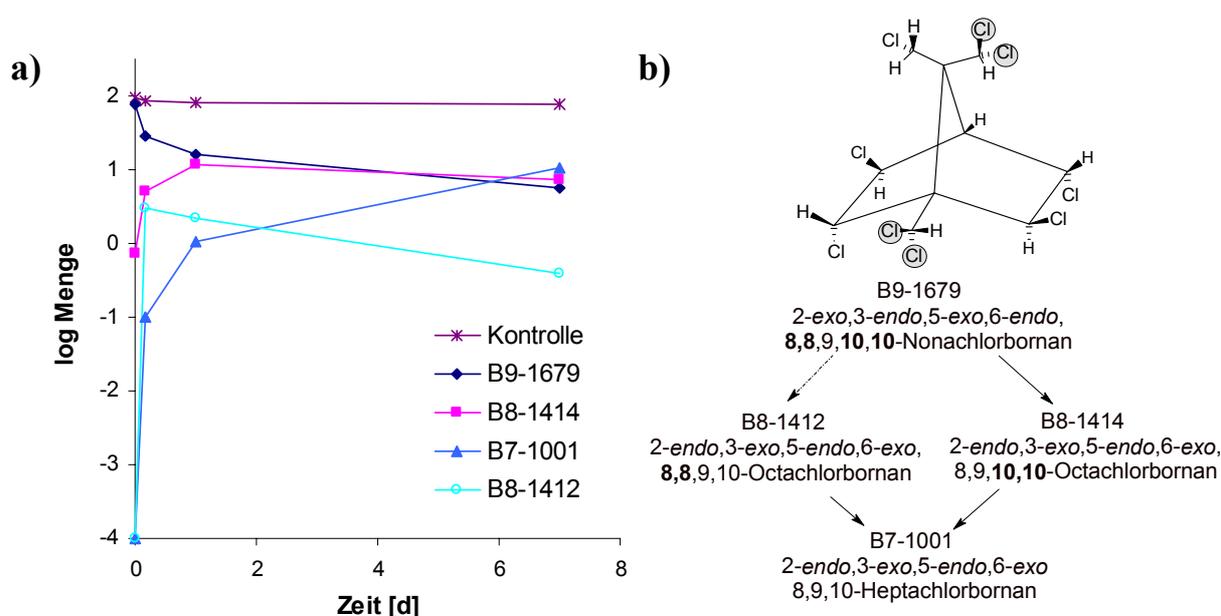
**Abb. 33** *B9-1025-Abbau mit D. multivorans; a) Abbauprofil über einen Zeitraum von vier Tagen, Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung, b) GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme der Probe nach einem Tag (DB-5-Säule, intensive Fragmentationen der Hexa- bis Nonachlorbornane)*

Jedoch zeigt die Detektion von mehr als zwei Hexachlorbornanen, dass der reduktive Abbau von B8-2229 nicht auf die Bildung des B7-1737 beschränkt war und somit ein nicht beobachtetes Minor-Heptachlorbornan - wahrscheinlich B7-1725 - bereits vollständig dechloriert wurde. Somit war mit einer Entstehung von vier Hexachlorbornanen zu rechnen, wobei B6-1115 und B6-1127 aufgrund der *gem*-Cls an C-9 (vgl. **Abb. 32**) früher als die beiden anderen eluieren müssten (vgl.  $t_r$  von B8-1414 und B8-1412, vgl. **Kap. 4.7**). B6-1128 war zudem in der von Nikiforov *et al.* veröffentlichten Retentionszeitliste (DB-5-Säule) von 122 CTTs enthalten [167]. Demnach sollte B6-1128 nach B7-1450 eluieren (vgl. **ATab. 5**), welches als einziges auf Hx-Ba14 zutrif. Dies würde auch die Entstehung des B7-1737 untermauern. Die Richtigkeit dieser Ableitungen könnte durch den Nachweis von B7-1737 beim Abbau von B8-2229 und den Nachweis von B6-1128 beim Abbau von B7-1712 (B7-1712 – 5-*endo*-Cl) überprüft werden.

#### 4.3.2 Abbau von CTTs mit geminalen Chloratomen an primären Kohlenstoffen

##### 4.3.2.1 Inkubation von B9-1679 mit *Dehalospirillum multivorans*

Die Behandlung von B9-1679 mit einer Suspension von *D. multivorans* ergab nach vier Stunden einen 60-%igen und nach sieben Tagen einen nahezu vollständigen Abbau (95 %) dieser wichtigsten Nonachlorverbindung in Säugern (**Abb. 34, ATab. 3**) [86].



**Abb. 34** Abbau von B9-1679 (77 ng) unter Einsatz von *D. multivorans*; a) Profil über einen Zeitraum von sieben Tagen, Kontrolle: B9-1679 ohne Bakterien; vgl. **ATab. 3**, b) Abbauschema des B9-1679 zu B7-1001 mit den detektierten Abbauprodukten (*gem*-Cls markiert)

Aus diesem Verlauf ergibt sich, dass B9-1679 wesentlich langsamer als B8-806 und etwas langsamer als B7-1473 (in vier Tagen > 90 %, siehe **Kap. 4.3.1.1**) abgebaut wird.

Dies entsprach den Erwartungen, da beide *gem*-Cls von B9-1679 an primären Kohlenstoffen lokalisiert sind. Als Primärmetabolite wurden B8-1412 (Cl→H Austausch an C-10) und B8-1414 (Cl→H Austausch an C-8) gebildet (**Abb. 34b**). B8-1414 war dabei das dominierende Produkt, während B8-1412 nur aufgrund seines hohen GC/ECNI-MS-Responsefaktors detektiert werden konnte [168]. Der Gehalt an B8-1412 war nach vier bzw. 24 Stunden ungefähr zweimal bzw. fünfmal geringer als der an B8-1414.

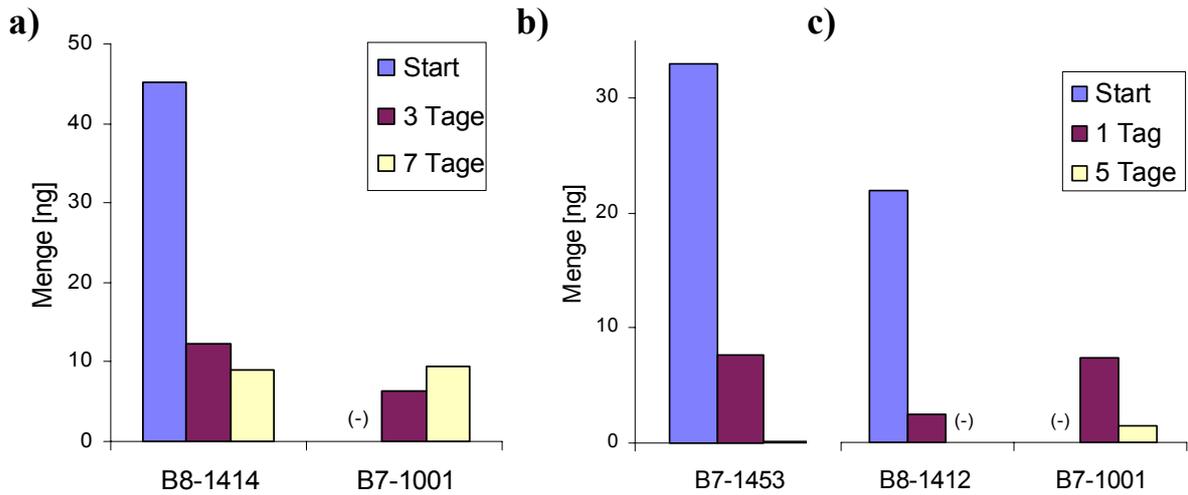
Neben den beiden Octachlorbornanen wurde bereits nach vier Stunden die Bildung von B7-1001 beobachtet, wobei dessen Konzentration bis zum Abschluss des Experimentes anstieg (**Abb. 34a**). Dagegen war bei B8-1414 zunächst eine Zunahme und nach Ablauf des ersten Tages eine rund 40-%ige Abnahme zu verzeichnen. Bei B8-1412 war bereits nach vier Stunden der Maximalgehalt erreicht (**Abb. 34a**).

Dieser Versuch verdeutlicht, dass B8-1414 und B8-1412 sowohl gebildet als auch abgebaut werden. Da es sich bei beiden CTTs um wichtige Kontaminanten in Umweltproben handelt (vgl. **Kap. 2.3**), dürften die detektierten Mengen dieser und vergleichbarer CTTs dort ebenfalls das Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau widerspiegeln. Somit müssen für die Beurteilung, ob die größere Relevanz von B8-1414 auf die bevorzugte Bildung und/oder den schnelleren Abbau von B8-1412 zurückzuführen ist, weitere Experimente, die von B8-1412 und B8-1414 ausgehen, durchgeführt werden.

#### 4.3.2.2 Inkubation von B8-1412 und B8-1414 mit *Dehalospirillum multivorans*

Die Umwandlung von B8-1412, das allerdings nur im Gemisch mit B7-1453 vorlag (vgl. **Kap. 3.7**), in B7-1001 erfolgte nahezu vollständig innerhalb eines Tages (**Abb. 35**). Hingegen wurden noch nach drei Tagen geringe Mengen an B8-1414 nachgewiesen. Die höhere Persistenz von B8-1414 gegenüber B8-1412 (*gem*-Cls an C-8) muss bei gleicher Substitution im C-6-Ring auf die höhere Stabilität der *gem*-Cls an C-10 zurückzuführen sein. Da diese höhere Persistenz der CHCl<sub>2</sub>-Gruppe an C-10 auch auf B9-1679 zutrifft, ist der höhere Gehalt an B8-1414 beim B9-1679-Abbau sowohl eine Folge der bevorzugten Bildung von B8-1414 als auch des schnelleren Abbaus von B8-1412.

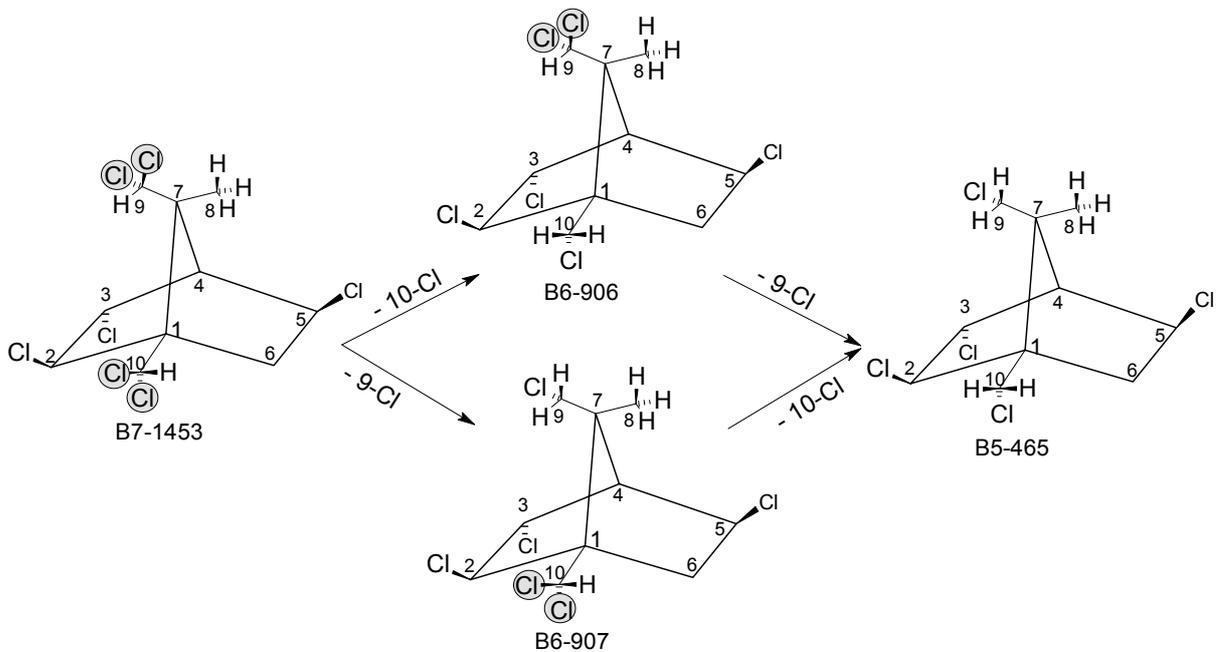
Weiterhin war an Tag 3 die Bildung von B7-1001 zu beobachten, doch nahm die Konzentration danach wieder stark ab (**Abb. 35a, c**). Dies verdeutlicht, dass der CTT-Abbau nicht ausschließlich an das Vorhandensein von *gem*-Cls geknüpft ist (siehe **Kap. 4.3.3**).



**Abb. 35** Inkubation von a) B8-1414 und einem Gemisch aus b) B7-1453 und c) B8-1412 mit *D. multivorans* über einen Zeitraum von fünf Tagen

4.3.2.3 Inkubation von B7-1453 mit *Dehalospirillum multivorans*

Wie B9-1679 besitzt auch B7-1453 zwei *gem*-Cls an primären Kohlenstoff (C-9 und C-10), so dass die Bildung von zwei Hexachlorbornanen, die zu einem Pentachlorbornan abgebaut werden, zu erwarten war (**Abb. 36**). In der Tat wurden innerhalb des ersten Tages 70 % und nach fünf Tagen > 95 % B7-1453 des ursprünglichen Gehaltes abgebaut (**Abb. 35b**).

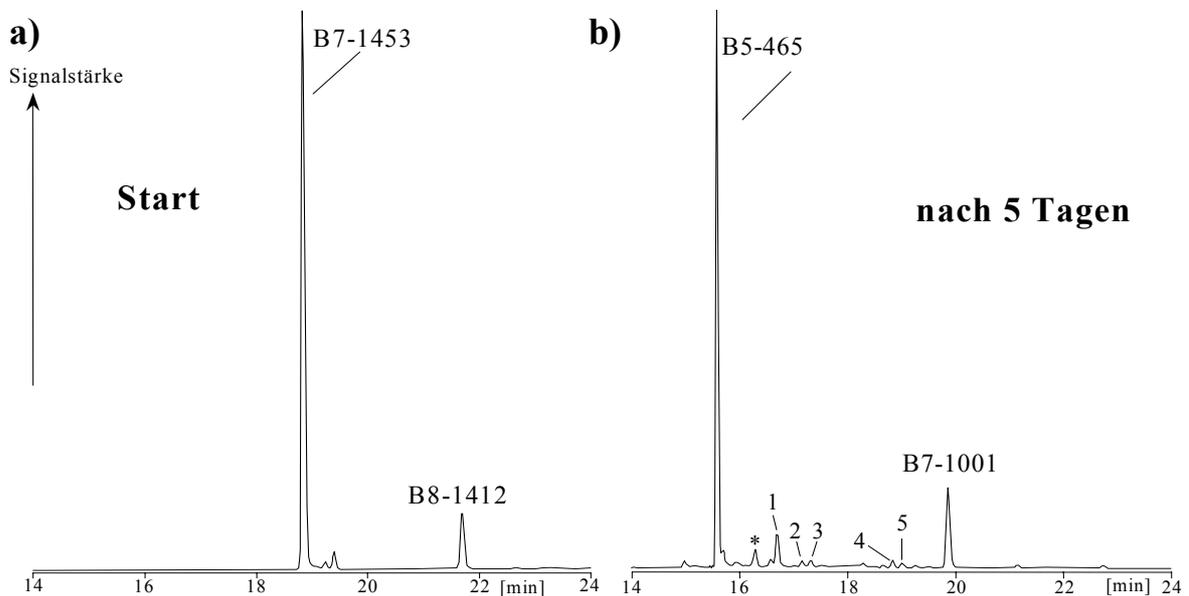


**Abb. 36** Schema des Abbaus von B7-1453 in ein Pentachlorbornan über zwei Zwischenprodukte, *gem*-Cls sind grau unterlegt

Damit erfolgte die Dechlorierung ungefähr so schnell wie beim höherchlorierten B9-1679. Offensichtlich sind bestimmte Strukturmerkmale entscheidender für die Persistenz von CTTs als der Chlorierungsgrad.

Als Hauptmetabolit konnte ein Pentachlorbornan (B5-465) identifiziert werden (**Abb. 37b**), welches analog des B9-1679-Abbaus durch die reduktive Dechlorierung an *gem*-Cl's an C-9 und C-10 gebildet wurde. Die erwarteten Zwischenprodukte (- 9-Cl → B6-907 und - 10-Cl → B6-906) konnten aufgrund der geringen Mengen nicht eindeutig identifiziert werden, da insgesamt vier Hexachlorbornane nachweisbar waren (**Abb. 37b**). Diese könnten teilweise auch bei der Dechlorierung von B8-1412 über B7-1001 entstanden sein, die gegebenenfalls zusätzlich in der Probe vorliegen. Jedoch sollten die Hexachlorbornane vom B7-1453-Abbau sehr früh eluieren, da ein Cl-Atom an C-8 oder C-9 (z.B. B7-1000, B8-1413, B7-1453) bei einer unsubstituierten Methylgruppe an der jeweiligen anderen Position zu einer verkürzten Retentionszeit führt [169].

Insgesamt betrachtet besitzen B6-907 und B6-906 eine geringe Stabilität gegenüber *D. multivorans*, und dies bestätigte sich auch beim Abbau von Hx-Ba3-5 in Melipax (vgl. **Abb. 25b**).



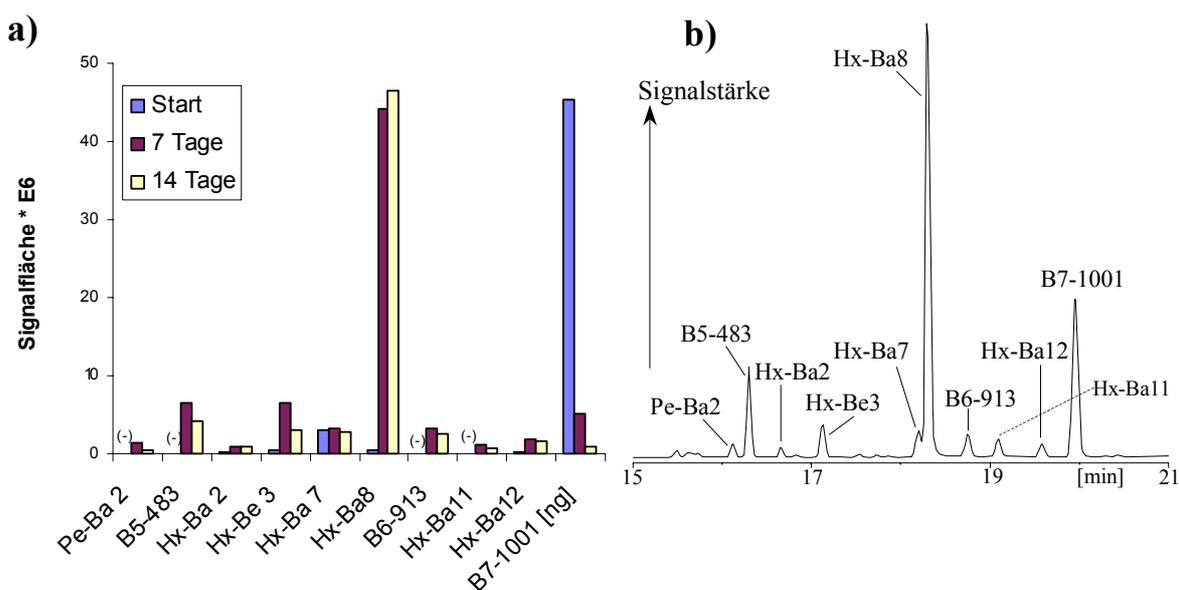
**Abb. 37** Abbau von B7-1453 (35 ng) und B8-1412 (20 ng, zu B7-1001) mit *D. multivorans*; GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme (DB-5-Säule, Penta- bis Octachlorbornane), a) Start und b) nach fünf Tagen; 1: Hx-Ba3, 2: Hx-Ba4, 3: Hx-Ba5; 4: Hx-Ba9, 5: B7-1453, \* Störsignal

### 4.3.3 Untersuchung des Abbauverhaltens von Chlorbornanen ohne geminale Chloratome am Toxaphen Grundgerüst

#### 4.3.3.1 Inkubation von B7-1001 mit *Dehalospirillum multivorans*

Unter der Annahme, dass unter anaeroben Bedingungen nur ein Abbau von *gem*-Cl's möglich ist, wären B7-1001 und B6-923 persistente Endmetabolite des CTT-Abbaus [8][13]. Allerdings hatte sich schon bei den Experimenten mit B8-1412 und B8-1414 gezeigt, dass *D. multivorans* zumindest einen teilweisen Abbau von B7-1001 ermöglicht.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde das für diese Zwecke isolierte B7-1001 (vgl. Kap. 3.3.1.1) mit *D. multivorans* inkubiert. Rund 85 % des ursprünglichen B7-1001-Gehaltes waren innerhalb von sieben Tagen und 98 % innerhalb von 14 Tagen verbraucht (Abb. 38a). Dagegen war beim Abbau von Melipax eine kontinuierliche Zunahme des B7-1001-Gehaltes verzeichnet worden (vgl. ATab. 4). Insgesamt wurden sechs Hexachlorbornane, ein ungesättigtes Hexachlor-CTT und zwei Pentachlorbornane als Abbauprodukte detektiert (Abb. 38a, b). Der weitgehende Abbau von B7-1001 innerhalb der ersten sieben Tage hatte zur Folge, dass die Metabolite anschließend allenfalls noch abgebaut werden konnten (vgl. Hx-Be3 und B5-483, Abb. 38a). So nahm einzig der Gehalt des Hauptmetaboliten Hx-Ba8 (vgl. Abb. 38a und b) noch geringfügig zu. Insgesamt verlief der B7-1001-Abbau allerdings signifikant langsamer als der Abbau von CTTs mit *gem*-Cl's.



**Abb. 38** *B7-1001* und Abbauprodukte bei der Behandlung mit *D. multivorans*; a) relative GC/ECNI-HRMS-Flächen (*B7-1001* Angabe in ng) am Start, nach sieben und 14 Tagen, b) GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramm (DB-5-Säule, Penta- bis Heptachlorbornane) nach 14 Tagen

Das dominierende Hexachlorbornan Hx-Ba8 stellte rund 50 % des gesamten GC/ECNI-MS-Response aller Abbauprodukte. Da B7-1001 keine *gem*-Cl's enthält, ist eine Deutung dieses selektiven Verlaufs nicht einfach. Zudem standen mit B6-923 und B6-913 nur zwei Vergleichsstandards von Hexachlorbornanen zur Aufklärung des B7-1001-Abbaus zur Verfügung.

Eine Bildung von B6-923 aus B7-1001 ist durch reduktive Dechlorierung nicht möglich, doch ist dies im Fall von B6-913 denkbar, und dieses CTT wurde auch in den Proben als Minorkomponente detektiert (**Abb. 38a, b**).

Nikiforov *et al.* veröffentlichten Retentionszeiten ( $t_r$ ) von 67 CTTs an einer DB-5-Säule, die mit der von uns eingesetzten vergleichbar war [67]. Ein reduktiver Abbau des 5-endo-Cl von B7-1001 würde zu dem von Nikiforov *et al.* beschriebenen 2-endo,3-exo,6-exo,8,9,10-Hexachlorbornan (B6-627) führen (**Abb. 39g**), das zwischen B6-923 und B7-1001 eluiert [67]. Zur weiteren Absicherung wurden relative Retentionszeiten von B7-1453, B6-923, B7-1001 und B7-1450 bestimmt und verglichen (**Tab. 14**). Aufgrund der unterschiedlichen GC-Bedingungen ergaben sich große Unterschiede bei den relativen Retentionsindices (RRI) von Nikiforov *et al.* und unserer Untersuchung. Allerdings wurden für CTTs mit sehr ähnlichen Retentionszeiten übereinstimmende Quotienten (B6-923, B7-1001 und B6-627) erhalten. Die gute Übereinstimmung legt somit nahe, dass es sich bei Hx-Ba12 um B6-627 handelt, zumal erst mit zunehmenden  $\Delta t_r$  - wie bei B7-1453 und B7-1450 – etwas größere Abweichungen auftraten, da der Einfluss der Elutionstemperatur auf die CTT-Elution zunahm.

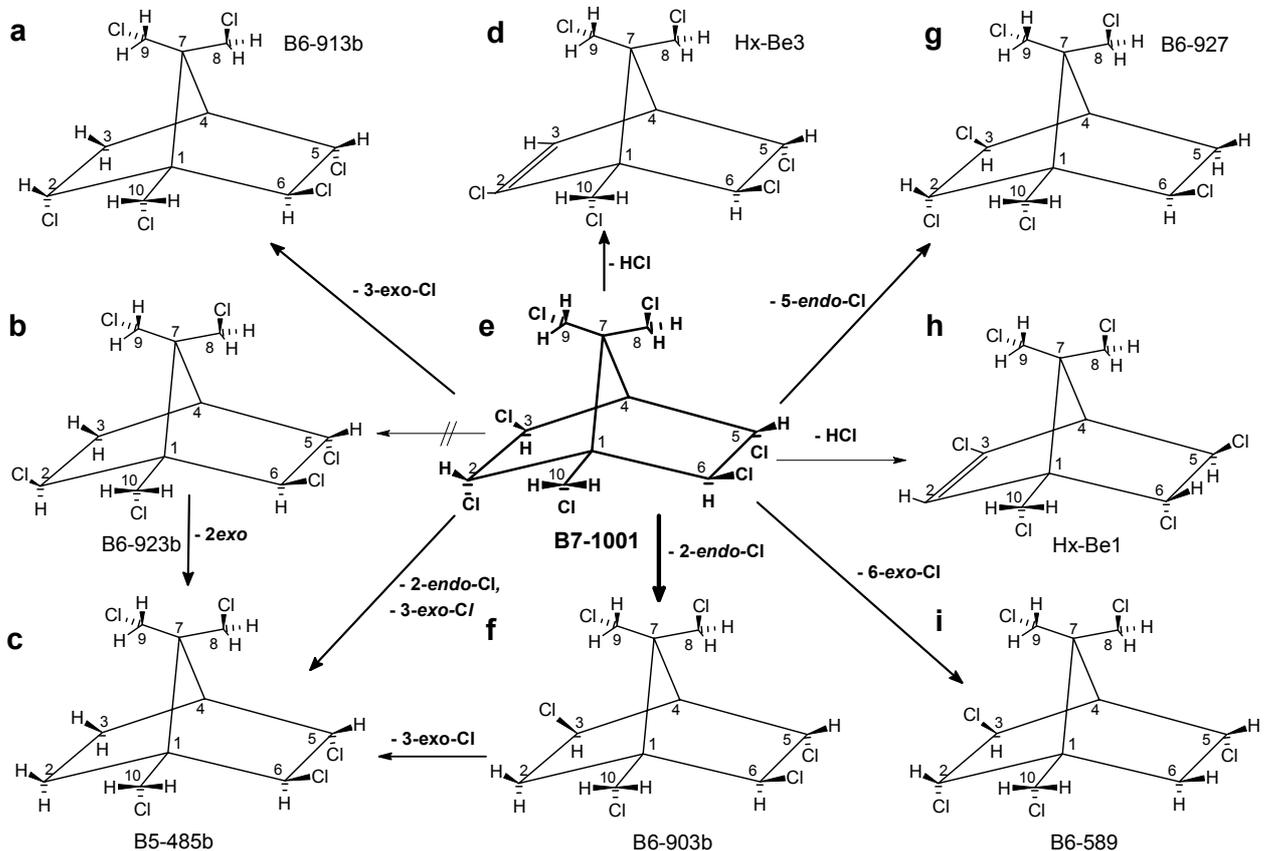
**Tab. 14** Relative Retentionsindices (RRI) von fünf CTTs, Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten [67]

CTT	$t_r$ [min] d. S.* [67]	RRI** d.S.*	RRI** [67]	RRI <sub>d.S.*</sub> / RRI <sub>[67]</sub>
B7-1453	19	9,9	0,5744	0,7639
B6-923	19,1	10,0	0,5909	0,7667
Hx-Ba12/ B6-627	19,3	10,1	0,6002	0,7791
B7-1001	20	10,2	0,6067	0,7875
B7-1450	22,1	10,8	0,6687	0,8319
B9-1025	32,2	13,0	1	1

\* diese Studie

\*\*  $RRI = t_r / t_{r, B9-1025}$

Die Experimente in **Kap. 4.3.1.1-4.3.1.3** zeigten, dass die reduktive Dechlorierung an primären Kohlenstoffen (C-8 bis C-10) langsamer erfolgt als an sekundären (C-2 bis C-6). Demzufolge kommen als weitere Abbauprodukte von B7-1001 vor allem B6-589 (- 6-*exo*-Cl) und B6-903 (- 2-*endo*-Cl) in Frage (**Abb. 39f, i**).

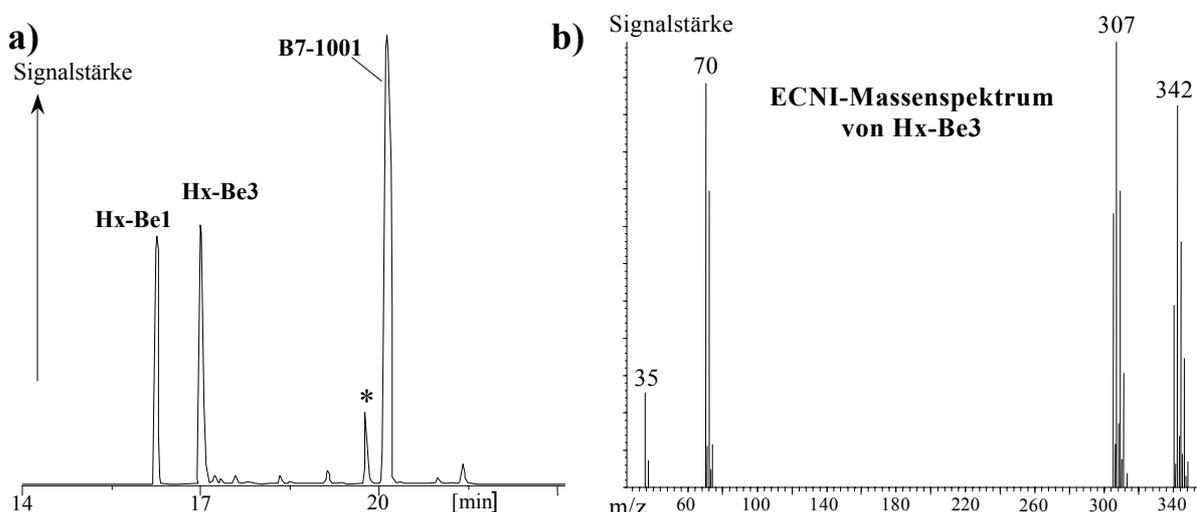


**Abb. 39** Strukturen der CTTs und Prozesse beim Abbau von B7-1001, B5-483 ist sowohl Metabolit von B7-1001 als auch von B6-923, b: Enantiomer b (vgl. **Kap. 2.2.1**)

Da beim anaeroben Abbau von B8-806, B8-809 und B9-1025 jeweils das 2-*exo*-Cl resistenter war als das entsprechende 2-*endo*-Cl, kann als Struktur für das B7-1001-Hauptabbauprodukt Hx-Ba8 2-*exo*,3-*endo*,5-*exo*,8,9,10-Hexachlorbornan (B6-903) (**Abb. 39f**) vorgeschlagen werden.

Das ungesättigte CTT Hx-Be3 (**Abb. 38, Abb. 39d**) war auch in geringen Spuren im eingesetzten B7-1001 Standard enthalten. Jedoch konnte nach sieben Tagen eine deutliche Konzentrationszunahme und damit die Bildung durch *D. multivorans* nachgewiesen werden. Dagegen war nach 14 Tagen nur noch ungefähr die Hälfte der nach sieben Tagen detektierten Menge an Hx-Be3 vorhanden. Allerdings sind die für Hx-Be3 in Frage kommenden Chlorcamphene und Chlorbornene Isomere und können nicht eindeutig

anhand ihrer GC/ECNI-MS-Spektren unterschieden werden [170]. Somit wäre sowohl ein Camphen- (nach Umlagerung) als auch ein Bornengerüst für Hx-Be3 denkbar. Leider reichte die Menge nicht für IR-spektroskopische Untersuchungen aus, wie das von Kimmel *et al.* zur Unterscheidung vorgeschlagen wurde [21]. Turner *et al.* erhielten Chlorbornene durch Reaktion von B7-515 mit ethanolischem Kaliumhydroxid [33]. Theoretisch können dabei drei Hexachlorbornene gebildet werden, doch wurden nur 2,2,5,8,9,10-Hexachlorborn-5-en (Eliminierung des 6-*exo*-Cl und 5-*exo*-H) und 2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Hexachlorborn-2-en (Eliminierung des 2-*exo(endo)*-Cl und 3-*exo(endo)*-H) im Verhältnis von 6:1 gefunden [33]. Die von uns durchgeführte Reaktion von B7-1001 mit methanolischem KOH resultierte in der Bildung von zwei Hexachlorbornenen (Hx-Be1 und Hx-Be3, **Abb. 40a**).



**Abb. 40** Reaktion von B7-1001 mit methanolischem KOH; a) GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramm (DB-5-Säule, Summe der Hexa- und Heptachlorbornane und Hexachlorbornene), b) ECNI-Massenspektrum (Fullscan von  $m/z$  30-400) von Hx-Be3; \* Störsignal

Die ECNI-Massenspektren unterschieden sich signifikant, denn bei Hx-Be3 dominierte das  $[M-Cl]^-$  -Ion (**Abb. 40b**) und bei Hx-Be1 das  $[M]^-$  -Ion. Wie schon Turner *et al.* [33] beobachteten, wurden auch von uns nicht alle vier theoretisch möglichen, sondern nur zwei Hexachlorbornene detektiert. Ein Vergleich der Strukturen lässt vermuten, dass mit alkoholischem KOH nur *cis*-Eliminierungen (E1-Mechanismus) unter Beteiligung von *exo*-ständigen Chloratomen möglich sind. Auf diese Weise würden aus B7-1001 3,5-*exo*,6-*endo*,8,9,10- und 2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Hexachlorborn-2-en gebildet. Letztere Verbindung ist identisch mit dem Nebenprodukt der Reaktion von B7-515 mit KOH [33]. Des Weiteren wurde für 2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Hexachlorborn-2-en eine bevorzugte Bildung des  $[M-Cl]^-$

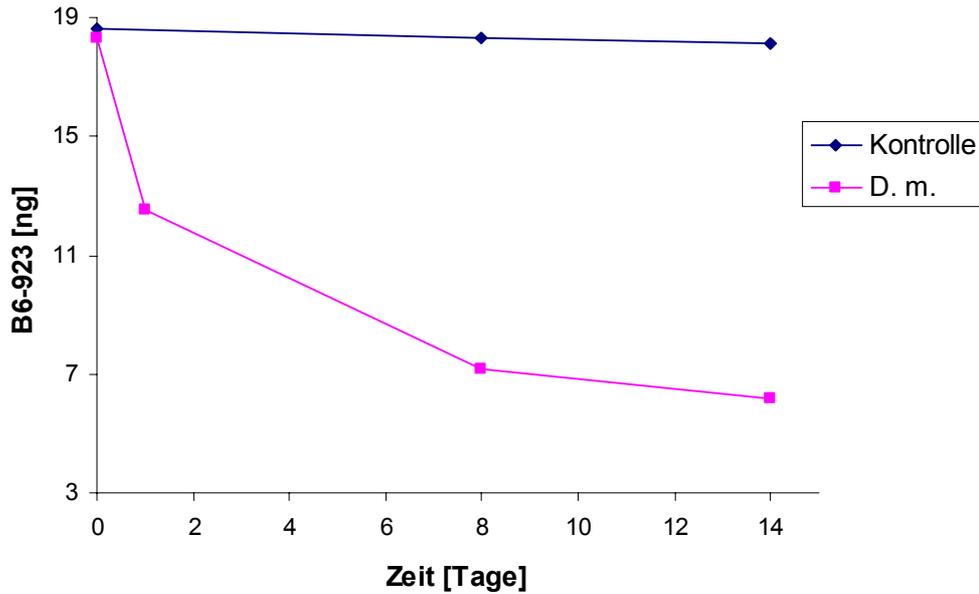
-Fragmentationenclusters bei GC/ECNI-MS-Messungen beschrieben [33][121]. Somit handelt es sich bei He-Be<sub>3</sub> mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit um 2,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Hexachlorborn-2-en (vgl. **Abb. 40b**). Unterstützt wird dies durch Ergebnisse von Nikiforov *et al.* [167], die ebenfalls mittels Dehydrochlorierung diese zwei und weitere Chlorbornene herstellen konnten. Mit der dort gemachten Angabe der relativen Retentionszeiten an einer DB-5-Säule (ähnlich der hier verwendeten) wurde die Zuordnung zusätzlich untermauert.

Interessanterweise war das später eluierende Hexachlorbornen des KOH-Abbaus von B7-1001 identisch mit dem bei der mikrobiellen Dehydrochlorierung (*D. multivorans*) von B7-1001 erhaltenen Hx-Be<sub>3</sub> (**Abb. 38, 40a**). Somit ist der Beweis erbracht, dass es sich bei dem ungesättigten Hexachlor-CTT des *D. multivorans*-Abbaus um ein Hexachlorbornen handelt. Übrigens konnten bereits in Melipax Spuren von Hx-Be<sub>3</sub> und Hx-Be<sub>1</sub> nachgewiesen werden, die im Laufe des Melipax-Abbaus mit *D. multivorans* angereichert wurden (vgl. **Abb. 25b**). Folglich wird auch Hx-Be<sub>1</sub> durch Behandlung von CTTs mit *D. multivorans* gebildet, doch nicht aus B7-1001. Die ausschließliche Bildung von Hx-Be<sub>3</sub> durch *D. multivorans* lässt einen selektiven Angriff der Enzyme vermuten, der wahrscheinlich sterische oder ladungsbedingte Ursachen hat.

Im Folgenden wurden die Lösungen früherer Inkubationen mit einzelnen CTTs erneut untersucht, doch konnten dabei keine weiteren ungesättigten Verbindungen entdeckt werden, die nicht auf B7-1001 zurückzuführen waren. Dem steht der Nachweis von sieben ungesättigten Verbindungen beim Melipax-Abbau entgegen (vgl. **Abb. 25b**). Allerdings nimmt die Fähigkeit von *D. multivorans*, reduktiv zu dechlorieren, mit Fortschreiten des Abbauprozesses ab (vgl. **Kap. 4.1.6**). Die niedrigen Bildungsraten erschwerten eine Detektion von Chlorbornenen zusätzlich. Es ist auch wahrscheinlich, dass der alternative Abbau mittels Dehydrochlorierung nur bei niederchlorierten CTTs mit einer geringeren Elektronendichte eintritt. Um dies weiter zu untersuchen, wurde der Abbau von B6-923, das keine *gem*-Cls und auch kein *endo*-Cl an C-Atomen vicinal zu C-1 aufweist, beobachtet.

#### 4.3.3.2 Inkubation von B6-923 mit *Dehalospirillum multivorans*

Von den ungefähr 20 ng B6-923, die beim Abbauersuch mit *D. multivorans* eingesetzt wurden, waren nach acht Tagen noch rund 40 % und nach 14 Tagen noch rund 30 % vorhanden (**Abb. 41**).



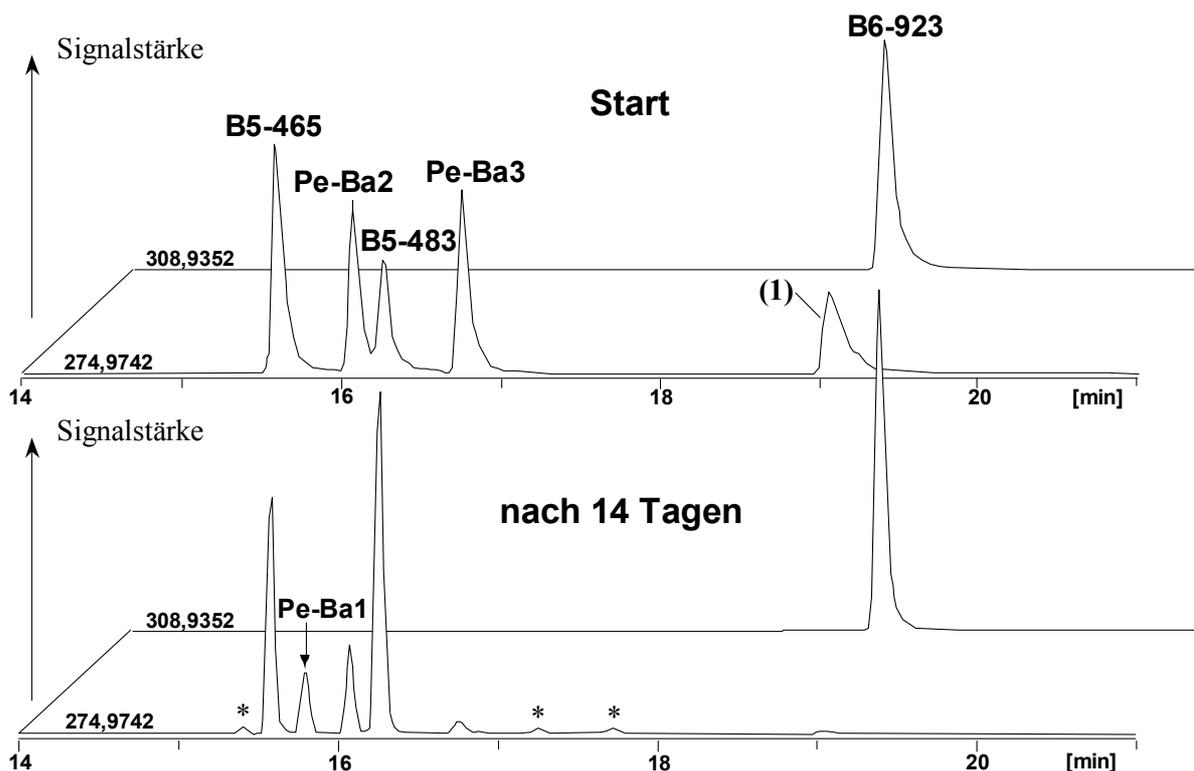
**Abb. 41** Abbau von B6-923 durch *D. multivorans* (*D. m.*) bzw. Kontrolle (ohne Bakterien) über einen Zeitraum von 14 Tagen

Im Gegensatz dazu war B6-923 als sogenanntes „Dead-end-Metabolit“ im Boden nicht abgebaut worden [13]. Das verdeutlicht die außerordentliche Dechlorierungsfähigkeit von *D. multivorans* beim Abbau von CTTs.

Wie bereits bei B7-1001 beobachtet, war der Abbau von B6-923 nicht an das Vorhandensein von *gem*-Cls gebunden, obwohl die reduktive Dechlorierung ohne dieses Strukturmerkmal wesentlich langsamer erfolgte. Zur eindeutigen Detektion der Produkte wurde ein Experiment mit höherem B6-923-Gehalt (50 ng) durchgeführt.

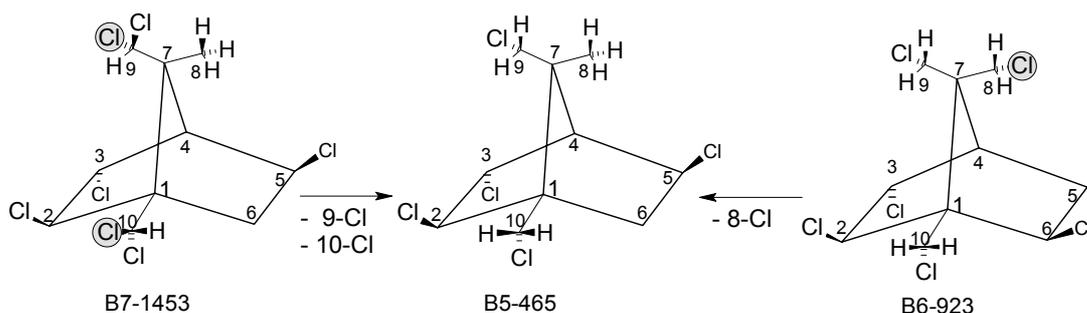
Da die Probe auch Spuren von fünf Pentachlorbornanen enthielt (**Abb. 42**, oben), war auch deren Verbleib im Verlauf des Experimentes zu untersuchen. So war die Hauptverunreinigung der Ausgangslösung (Pe-Ba3) nach 14 Tagen nur noch in Spuren nachweisbar. Dies zeigt, dass mit *D. multivorans* sogar der Abbau von Pentachlorbornanen möglich ist, wie dies bereits beim Abbau des technischen Gemisches beobachtet worden war (vgl. **Abb. 25a**). Dagegen weisen die im Verlauf des Experimentes nur marginalen Veränderungen von Pe-Ba2 entweder auf dessen relative Persistenz oder auf ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Bildung hin (**Abb. 42**). Pe-Ba1 lag in der Ausgangslösung nicht vor. Der Gehalt von B5-483 nahm um eine Größenordnung und der von B5-465 um das Doppelte zu, so dass B6-923 mindestens zu drei Hauptpentachlorbornanen abgebaut wurde. Daneben war noch die Bildung von drei Minor-Pentachlor-CTTs nachweisbar (**Abb. 42**, unten).

B5-483 wurde nicht nur beim Abbau von B6-923, sondern auch beim Abbau von B7-1001 identifiziert, und diese Beobachtung reichte für einen Strukturbeweis aus (**Abb. 39b, c, e**). Die einzig mögliche Pentachlorverbindung, die aus B6-923 (- 2-*exo*-Cl) und B7-1001 (- 2-*endo*-Cl und - 3-*exo*-Cl) gebildet werden kann, ist 5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Pentachlorbornan (B5-483). Somit gelang durch Verknüpfung zweier Abbauprodukte die Aufklärung eines der Hauptpentachlorbornane des Abbaus von Melipax (vgl. **Abb. 25a**).



**Abb. 42** B6-923-Abbau (50 ng) durch Zellsuspensionen von *D. multivorans*, GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme (DB-5-Säule,  $m/z$  274,9742 für Penta- und  $m/z$  308,9352 für Hexachlorbornane) vom Start (oben) und nach 14 Tagen (unten); \* Spuren von gebildeten Pentachlor-CTTs; (1): Fragmentation  $m/z$  274,9554 ( $C_{10}H_{11}^{35}Cl_2^{37}Cl_2$ ) von B6-923 überlagert mit  $m/z$  274,9742

Das gleiche gelang auch im Fall von B5-465, das auch als Abbauprodukt des B7-1453 beobachtet worden war (vgl. **Kap. 4.3.2.3**). Wieder war nur ein gemeinsamer Metabolit möglich, und zwar durch Cl $\rightarrow$ H-Austausch an den *gem*-Cls (C-9, C-10) von B7-1453 und an dem 8-Cl von B6-923 (**Abb. 43**). B5-465 könnte darüber hinaus auch beim Abbau von B7-1001b (- 6-*endo*-Cl, - 8-Cl) entstehen. Jedoch lagen dafür keine Hinweise vor (vgl. **Kap. 4.3.3.1**), so dass die Produktvielfalt beim B7-1001-Abbau weiter eingengt werden konnte.



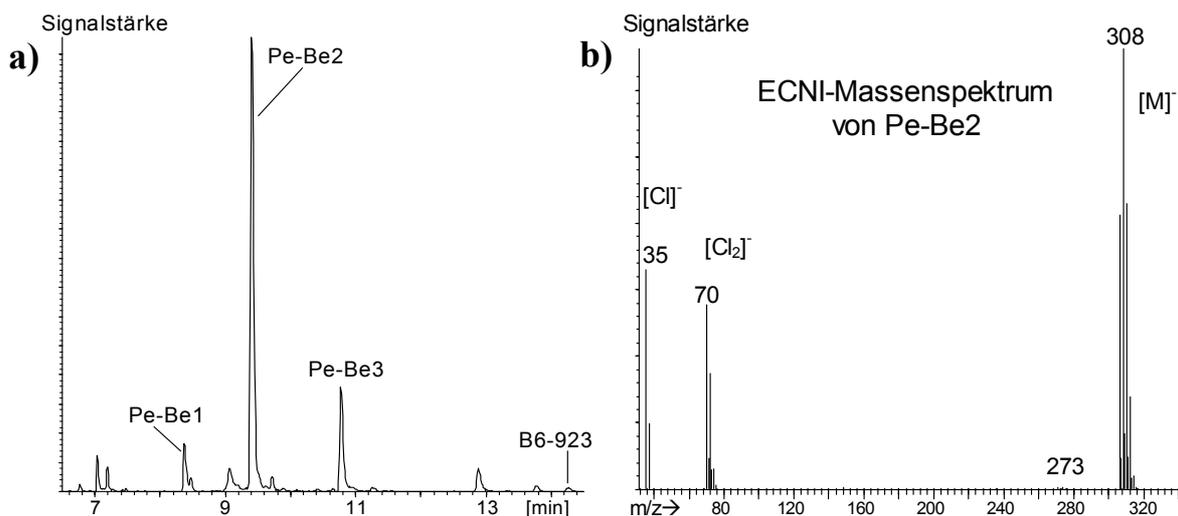
**Abb. 43** Schema der Bildung von B5-465 ausgehend von B7-1453 (vgl. **Abb. 36**) und von B6-923, Positionen des Cl→H Austausch sind grau unterlegt

Chorbornene konnten beim Abbau von B6-923 mit *D. multivorans*, im Gegensatz zu B7-1001, nicht detektiert werden (vgl. **Kap. 4.3.3.1**). Die Experimente mit B7-1001 in Verbindung mit *D. multivorans* hatten nahe gelegt, dass die Dehydrochlorierung wahrscheinlich in *cis*-Stellung erfolgte.

B6-923 (Enantiomer b) und B7-1001 weisen das gleiche Substitutionsmuster an C-5, C-6 und an den primären Kohlenstoffen auf, jedoch besitzt B6-923 kein 3-*exo*-Cl, welches beim B7-1001-Abbau mit *D. multivorans* eliminiert wurde, und das 2-Cl ist *exo*-ständig angeordnet. Wenn man eine *cis*-Eliminierung von oben (vgl. **Kap. 4.3.3.1**) und die relative Stabilität von vicinal zu C-1 stehenden *exo*-Cl's beim Abbau mit *D. multivorans* annimmt, war auch nicht mit einer Bildung von Chlorbornenen zu rechnen.

Weitere Hinweise sollten bei der Reaktion von B6-923 mit KOH gefunden werden. In der zweiten *n*-Hexan-Fraktion (vgl. **Kap. 3.5.2**) wurden drei Pentachlorbornene anhand ihres Molekülions und des Cl-Isotopenmusters in den ECNI-Massenspektren (**Abb. 44b**) sowie aufgrund vorheriger Befunde (vgl. **Kap. 4.3.3.1**) eindeutig identifiziert (**Abb. 44a**).

In Analogie zu den Ergebnissen von B7-1001 kann als Struktur für die Hauptkomponente Pe-Ba2 3,6-*exo*,8,9,10-Pentachlorborn-2-en vorgeschlagen werden. Die Ergebnisse des B7-515-Abbaus mit methanolischem KOH unterstützen diesen Strukturvorschlag, da auch im Fall des B7-515 das 6-*exo*-Cl bevorzugt abgespalten wurde [33]. Haupt- und Nebenprodukte des B7-515- und B6-923-Abbaus entstanden (vgl. ECNI-Signalstärke von Pe-Be2 und Pe-Be3) im Verhältnis 6:1, so dass es sich bei Pe-Be3 vermutlich um das 5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-Pentachlorborn-2-en handelt. Bestätigt wird dies durch Ergebnisse von Nikiforov *et al.*, die ebenfalls mittels Dehydrochlorierung beide Pentachlorbornene gewinnen konnten [167]. Weiterhin wurde die frühere Elution des Pe-Ba2 unterstützt [167]. Das dritte Pentachlorbornen (Pe-Be1) müsste dann durch HCl-Eliminierung des 5-*endo*-Cl und 6-*endo*-H erfolgen, obwohl dieser Abbauweg bei der Behandlung von B7-1001 mit KOH nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. **Kap. 4.3.3.1**).



**Abb. 44** Reaktion von B6-923 mit methanolischem KOH; a) GC/ECNI-MS-Chromatogramm (HP-5-Säule, Fullscan,  $m/z$  30-400), b) ECNI-Massenspektrum des Hauptabbauproduktes Pe-Be2

#### 4.3.4 Inkubation eines Einzelenantomers mit *Dehalospirillum multivorans*

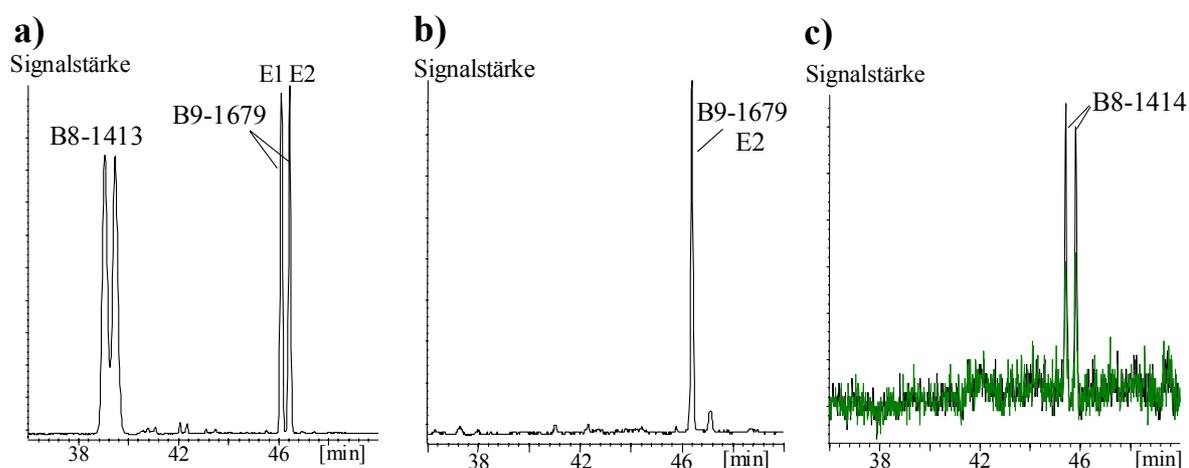
In den vergangenen Jahren wurde der Untersuchung von enantioselektiven Prozessen beim Abbau von chiralen Chlorkohlenwasserstoffen größere Beachtung geschenkt [131][146][171][172][173]. Da mehr als 97 % aller CTTs chiral sind und in Umweltproben bisher nur chirale CTTs identifiziert wurden, sollte dieser Aspekt auch in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. In einigen Studien mit CTT-Hauptkongeneren konnten in Säugetieren und Fischen enantioselektive Prozesse nachgewiesen werden [131][172][174][175][176]. Im Gegensatz dazu lagen B6-923 und auch andere CTTs in Boden- und Sedimentproben als Racemate vor [8][13]. Eine Ausnahme wurde für B7-1001 im hochkontaminierten Hanson-See (Kanada) mit einem Enantiomerenverhältnis von rund 0,8 beschrieben [177]. Ein racemischer Abbau von CTTs durch Bakterien wird auch durch die Befunde dieser Arbeit mit *D. multivorans* unterstützt (siehe **Abb. 27, 31**).

Die absolute Konfiguration der CTTs ist bisher unbekannt, jedoch sollte der Abbau eines einzelnen Enantiomers Zusammenhänge mit den Enantiomeren anderer CTTs hergestellt werden können.

Bisher konnte dieser Sachverhalt nicht geprüft werden, da einzelne CTT-Enantiomere nicht verfügbar waren. Erst vor kurzem konnte ein Isolat des von der  $\beta$ -BSCD zweiteluierenden Enantiomers von B9-1679 (B9-1679-E2) gewonnen werden [166], welches zur Untersuchung eingesetzt wurde (**Abb. 45b**). Zu unserer Überraschung führte

der Abbau des B9-1679-E2 innerhalb von fünf Tagen zur Bildung des Racemates B8-1414 (Abb. 45c).

B9-1679 besitzt sieben asymmetrische Kohlenstoffe (C-1 bis C-7), so dass die Entstehung von racemischen B8-1414 (Cl→H-Austausch) mit einer Spaltung und Neubildung von Kohlenstoffbindungen einhergehen müsste, jedoch kann diese Reaktion mit *D. multivorans* nicht ablaufen (vgl. Kap. 2.4). Auch konnte eine Kontamination ausgeschlossen werden, zumal dieses Ergebnis nach Doppelbestimmung erhalten wurde. Eine Wiederholung des Abbau mit größeren Mengen an B9-1679-E2 bzw. weiteren CTT-Enantiomeren würden zur Aufklärung beitragen, jedoch müssten diese erst gewonnen werden.



**Abb. 45** Abbau eines Einzelantimomers (E2) von B9-1679 durch *D. multivorans*; GC/ECNI-MS-Chromatogramme ( $\beta$ -BSCD-Säule (i)), a) Racemat B8-1413 und B9-1679 (TIC) als Vergleichsstandard, b) enantiomerenreines B9-1679 zu Beginn des Experiments (TIC) c) racemisches Abbauprodukt B8-1414 (SIM-Massen 375, 377 der Octachlorbornane)

#### 4.3.5 Auswertung des regiospezifischen Abbaus von CTTs mit *Dehalospirillum multivorans*

Die in Kap. 4.2-4.3.4 aufgeführten Ergebnisse zeigten, dass der anaerobe Abbau von CTTs bei Verwendung einer aktiven Bakterienkultur und geeigneten Einzelstandards weitgehend entschlüsselt werden kann. Als dominierender Prozess wurde die reduktive Dechlorierung an *gem*-Cls bestätigt. Der Cl→H-Austausch an *gem*-Cls erfolgte bevorzugt an sekundären Kohlenstoffen, gefolgt von den primären Kohlenstoffen C-8 oder C-9 und letztlich C-10. Es wurde auch gezeigt, dass im Fall von *gem*-Cls an C-2 das *endo*-ständige wesentlich schneller als das entsprechende *exo*-ständige Cl abgebaut wird. Damit scheinen CTTs, die

*gem*-Cls an C-2 besitzen, unter reduktiven Bedingungen am leichtesten abbaubar zu sein. So wurde beim Abbauxperiment mit technischem Toxaphen bereits nach 13 Tagen eine vollständige Transformation von B7-515/B7-495 (weisen *gem*-Cls an C-2 auf) beobachtet, während alle übrigen Heptachlorbornane bis auf B7-1059 noch nach 16 Tagen detektierbar waren. Ähnliches war auch bei den Octachlorbornanen festzustellen, denn nach 13 Tagen waren drei von zehn abgebauten Isomeren vollständig eliminiert, und zwei von ihnen wiesen *gem*-Cls an C-2 auf (vgl. **ATab. 4**).

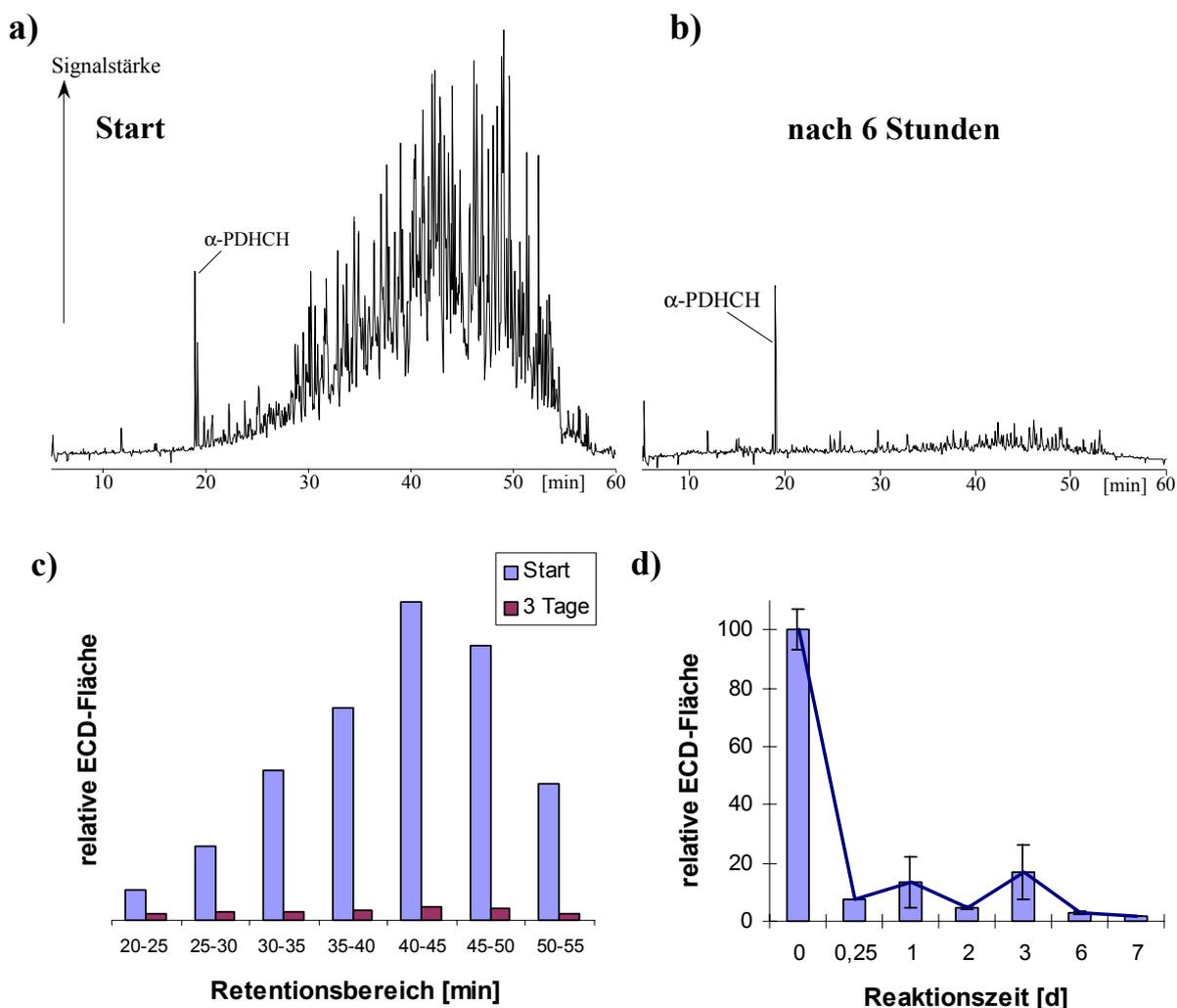
Die Anzahl theoretisch möglicher Chlorbornane liegt bei 16640 (Summe der Enantiomerenpaare und achiralen Chlorbornane) [27]. 7232 (43 %) davon weisen *gem*-Cls an der C-2-Position auf (bestimmt mit dem Programm von Andrews und Vetter [64], vgl. **Kap. 2.2.1**). Parlar *et al.* sagten voraus, dass 70 % aller Chlorbornane im Sechsring *gem*-Cls und ein zusätzliches  $\alpha$ -ständiges Chloratom aufweisen [10]. Weiterhin besitzen 31 von 79 bisher bekannten Penta- bis Decachlorbornane *gem*-Cls an C-2 (vgl. **ATab. 1**). Die besondere Bedeutung der C-2-Position wird bereits bei der Toxaphensynthese ersichtlich, bei der nach der Cl-Addition am endständigen  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoff des Camphens, der Wagner-Meerwein-Umlagerung und der erneuten Addition eines Cl-Atoms 2-*exo*,10-Dichlorbornan (B2-20) entsteht [1][2].

#### 4.4 Abiotischer Abbau von Toxaphen

Die Experimente mit hitzedeaktiviertem *D. multivorans* (vgl. **Kap. 4.1.5**) hatten gezeigt, dass abiotische Bestandteile der Bakterienkulturen einen teilweisen Abbau von CTTs ermöglichen. Als Katalysatoren für diesen Abbau kamen Kofaktoren und hierbei insbesondere das Corrinoide NCA in Frage [107]. So ist bekannt, dass reduzierte Corrinioide hochchlorierte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie PCBs, Trichloracetat und Hexachlorethan, dechlorieren können [126][130]. Das aus der PCE-Dehalogenase isolierte NCA stand nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung, so dass für die Untersuchung des abiotischen Abbaus die strukturell ähnlichen Corrinioide CCA und DCC (vgl. **Kap. 3.5**) eingesetzt wurden.

##### 4.4.1 Untersuchung des Abbaus von CTTs mit Dicyanocob(I)inamid (DCC<sub>s</sub>)

Beim Einsatz von 5  $\mu$ M DCC<sub>s</sub> konnte ein schneller und fast vollständiger Abbau von 55  $\mu$ g Melipax erreicht (**Abb. 46**) werden, wobei alle CTTs gleichermaßen betroffen waren (**Abb. 46c**).



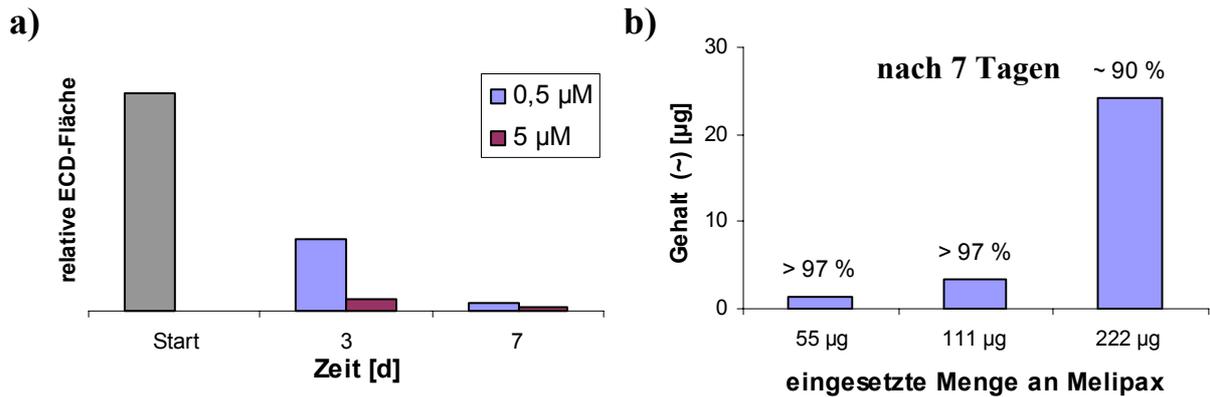
**Abb. 46** Melipax-Abbau (55  $\mu$ g) mit superreduziertem DCC (5  $\mu$ M DCC), GC/ECD-Chromatogramm (GCI/a vgl. Kap. 3.2.2); a) Start, b) nach sechs Stunden; c) integrierte Fläche (fünf Minuten Abschnitte) der Startprobe und nach drei Tagen, d) integrierte Gesamtfläche von 20-55 min der Probenahmen innerhalb von sieben Tagen

Zur semiquantitativen Erfassung des Abbaus wurden die erhaltenen GC/ECD-Chromatogramme über den ganzen CTT-Elutionsbereich (20-55 min) bzw. in Schritten von fünf Minuten integriert.

Es konnte bereits nach sechs Stunden Reaktion mit DCC<sub>s</sub> ein nahezu vollständiger Umsatz des Melipax beobachtet werden. Zwar wurden innerhalb der ersten drei Tagen noch geringe Schwankungen gefunden (Abb. 46d), doch waren nach sechs Tagen nur noch Spuren von CTTs nachweisbar. Die Kontrollen ohne den Zusatz des Reduktionsmittels Ti(III)citrat zeigten dagegen über den gesamten Versuchszeitraum keine Verluste an Melipax an (vgl. Kap. 4.4.2).

Durch Variation der eingesetzten DCC<sub>s</sub>- und Ti(III)citrat-Mengen konnte die Abbaugeschwindigkeit beeinflusst werden (Abb. 47). Bei Ansätzen mit 0,5  $\mu$ M DCC<sub>s</sub>

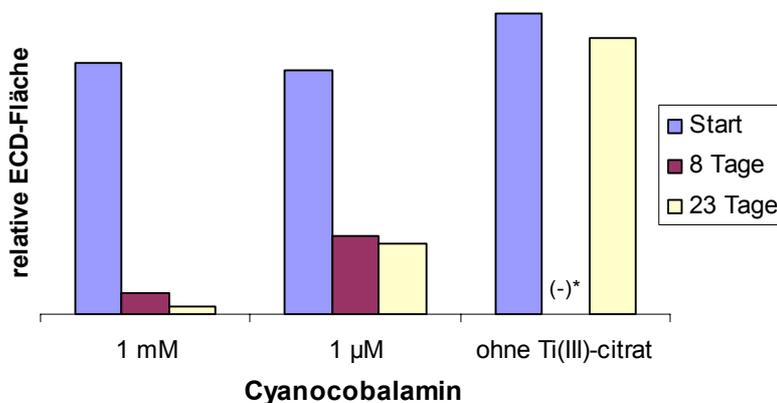
wurde vor allem in der Anfangsphase ein langsamerer Abbau als bei Ansätzen mit der zehnfachen Menge an DCC<sub>s</sub> beobachtet. Jedoch erfolgte auch hier im Laufe des Versuchs ein nahezu vollständiger Abbau von Melipax (**Abb. 47a**). 5 µM DCC<sub>s</sub> reichten aus, um 55 und 111 µg Melipax nahezu vollständig abzubauen, und auch bei Einsatz von 222 µg Melipax konnten noch rund 90 % abgebaut werden (**Abb. 47b**). Allerdings gelang es nicht, Abbauprodukte nachzuweisen.



**Abb. 47** Einflussparameter auf den Abbau von Melipax mit superreduziertem Dicyanocob(I)inamid (DCC<sub>s</sub>); a) unterschiedliche DCC-Konzentrationen (0,5 µM und 5 µM) beim Abbau von 55 µg Melipax, b) Melipax-Mengen nach Abbau von 55, 111 und 222 µg Melipax mit 5 µM DCC<sub>s</sub> nach sieben Tagen, mit Angabe des prozentualen Abbaus

#### 4.4.2 Untersuchung des Abbau von CTTs mit Cyanocob(I)inamid (CCA<sub>s</sub>)

Der Abbau mit CCA<sub>s</sub> verlief dagegen wesentlich langsamer, da auch bei Einsatz von 1 mM CCA<sub>s</sub> (d.h. der 200 bis 2000-fachen der DCC-Konzentration) und nach acht Tagen nur ~ 90 % von Melipax abgebaut wurden (**Abb. 48**).



**Abb. 48** Abbau von Melipax mit unterschiedlichen Konzentrationen an superreduziertem Cyanocobalamin (CCA<sub>s</sub>) (1 mM, 1 µM) über einen Zeitraum von 28 Tagen, \* nach acht Tagen erfolgte keine Kontrolle

Bei 1  $\mu\text{M}$   $\text{CCA}_s$  blieben unter sonst identischen Bedingungen noch über 30 % des eingesetzten Melipax zurück. Auch bei den Experimenten mit  $\text{CCA}_s$  konnten keine Abbauprodukte identifiziert werden.

#### **4.4.3 Auswertung des abiotischen Melipaxabbaus mit superreduziertem DCC und CCA**

Sowohl nach Einsatz von  $\text{DCC}_s$  als auch von  $\text{CCA}_s$  war eine Detektion von Abbauprodukten nicht möglich. Bei der Untersuchung anderer halogener Verbindungen mit Corrinoiden war ein stufenweiser Abbau durch reduktive Dechlorierung, reduktive Eliminierung und/oder Dehydrochlorierung beobachtet worden [115][126][178]. Dabei verlangsamte sich der Abbau mit abnehmendem Chlorierungsgrad [127]. Jedoch ist der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt und auch nur bei wenigen Standardsubstanzen untersucht.

Die erwartete Bildung niederchlorierter Bornane oder Bornene (Tri- bis Hexachlor-CTTs) - auch in Form einer Verschiebung des Elutionsprofils in Richtung früheluiender Verbindungen - konnte mittels GC/ECD und GC/ECNI-MS nicht nachgewiesen werden. Daher kann eine vollständige Dechlorierung der CTTs, wie es beim Abbau von 1,1,2,2-Tetrachlorethan [115] zu Ethen und von 1,1,1-Trichlorethan zu Ethan beobachtet wurde, nicht ausgeschlossen werden .

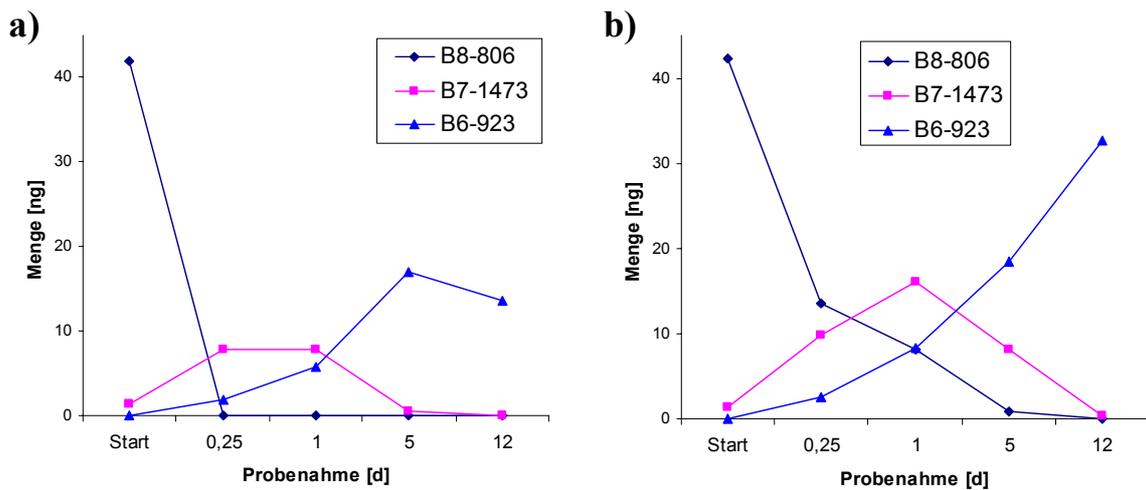
Die abiotische Dechlorierung mit  $\text{DCC}_s$  und teilweise auch mit  $\text{CCA}_s$  erwies sich als ein effizientes Verfahren, um in relativ kurzer Zeit erhebliche Mengen an CTTs abzubauen. Da hierbei anaerobe Bedingungen strikt einzuhalten sind, bietet diese Methode nur wenige Anwendungsmöglichkeiten, wie die Beschleunigung bereits ablaufender anaerober Prozesse.

Allerdings eignet sich die abiotische Dechlorierung nicht zur Beschreibung der in Sedimenten, Böden und Klärschlamm ablaufenden Prozesse, und sie wurde daher im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weiter mechanistisch untersucht.

#### **4.5 Vergleich der Abbauraten von Toxaphen durch *Escherichia coli* und *Dehalospirillum multivorans***

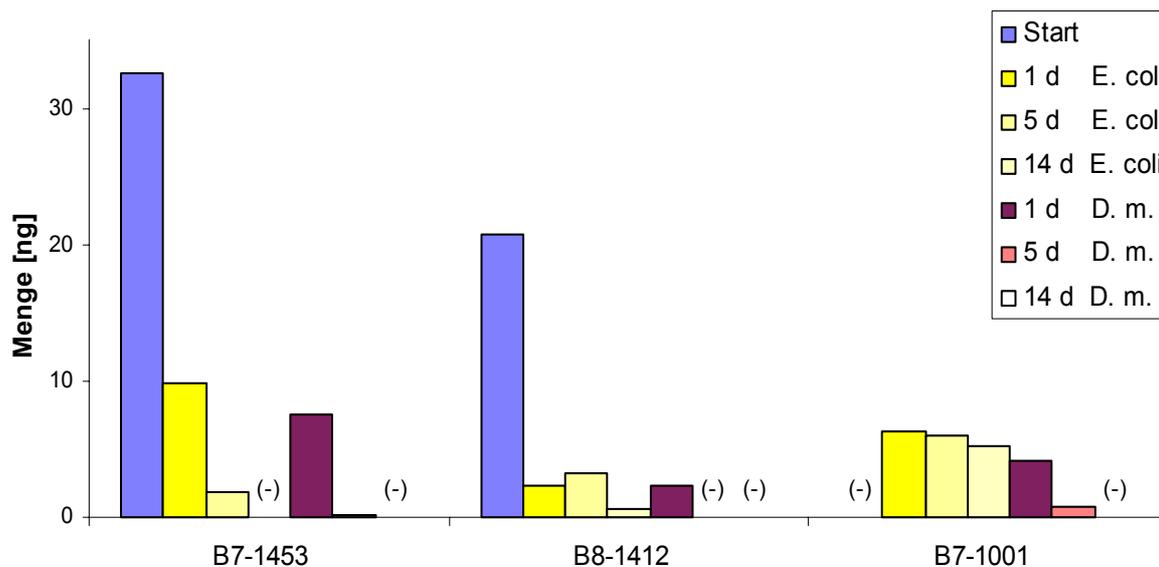
Die große Variationsbreite der CTT-Rückstandsmuster in Umweltproben hatte bereits zu der Vermutung geführt, dass neben den äußeren Faktoren auch die Art der Bakterien eine

Rolle spielt (vgl. **Kap. 2.3.2**). *D. multivorans* war in der Lage, Toxaphen in relativ kurzer Zeit sehr stark abzubauen. Mit *E. coli* wurde ein Bakterium als Vergleichskultur ausgewählt, von dem bisher nicht bekannt war, dass er zur Dechlorierung fähig ist [17]. Wie bereits gezeigt wurde, konnte B8-806 von *D. multivorans* in wenigen Stunden vollständig abgebaut werden (**Abb. 49a** bzw. **Kap. 4.2.1.1**). Zwar gelang auch mit *E. coli* ein weitgehender Abbau, doch war in diesem Fall B8-806 auch nach 12 Tagen noch detektierbar. Die wesentlich geringere Abbaufähigkeit von *E. coli* bestätigte sich auch in den Abbau- produkten (**Abb. 49**), denn es kam zu einer langsameren Bildung von B7-1473 und B6-923. Dies zeigte sich ebenso in der Stoffbilanz ( $\Sigma$ B8-806 + B7-1473 + B6-923), denn nach fünf oder 12 Tagen war bei *D. multivorans* etwa 1/3 der ursprünglich eingesetzten Menge nachweisbar und bei *E. coli* rund 2/3. Folglich war der Abbau bei *D. multivorans* nicht auf die Bildung des B6-923 beschränkt, sondern ging zu nicht erfassten CTTs weiter.



**Abb. 49** B8-806-Abbau beim Einsatz von *D. multivorans* (a) und *E. coli* (b) über einen Zeitraum von 12 Tagen, zu beachten ist die nicht lineare Zeitachse

Auch beim Abbau von B7-1453 und B8-1412 ergaben sich ähnliche Befunde (**Abb. 50**). Zwar war der Unterschied zwischen *D. multivorans* und *E. coli* nach einem Tag noch gering, doch im weiteren Verlauf erfolgte bei *E. coli* lediglich ein unvollständiger Abbau des B8-1412. Im Gegensatz dazu konnten B7-1453 und B8-1412 bei Verwendung von *D. multivorans* bereits nach fünf Tagen nur noch in Spuren detektiert werden (**Abb. 50**). Am deutlichsten trat das unterschiedliche Abbaupotential bei B7-1001 zutage. *D. multivorans* war in der Lage B7-1001, das aus B8-1412 gebildet wurde, abzubauen, dagegen war bei *E. coli* das nach einem Tag gebildete B7-1001 über den ganzen Abbauzeitraum nachweisbar.



**Abb. 50** Abbau von B7-1453, B8-1412 und dessen Metabolit B7-1001 mit Suspensionen von *D. multivorans* (*D. m.*) und *E. coli* über einen Zeitraum von 14 Tagen

In beiden Fällen B8-806→B6-923 und B8-1412→B7-1001 konnte zwar der Abbau von CTTs mit *gem*-Cl<sub>s</sub> durch *E. coli* beobachtet werden, doch war ein Abbau von CTTs ohne dieses Strukturmerkmal nicht nachweisbar.

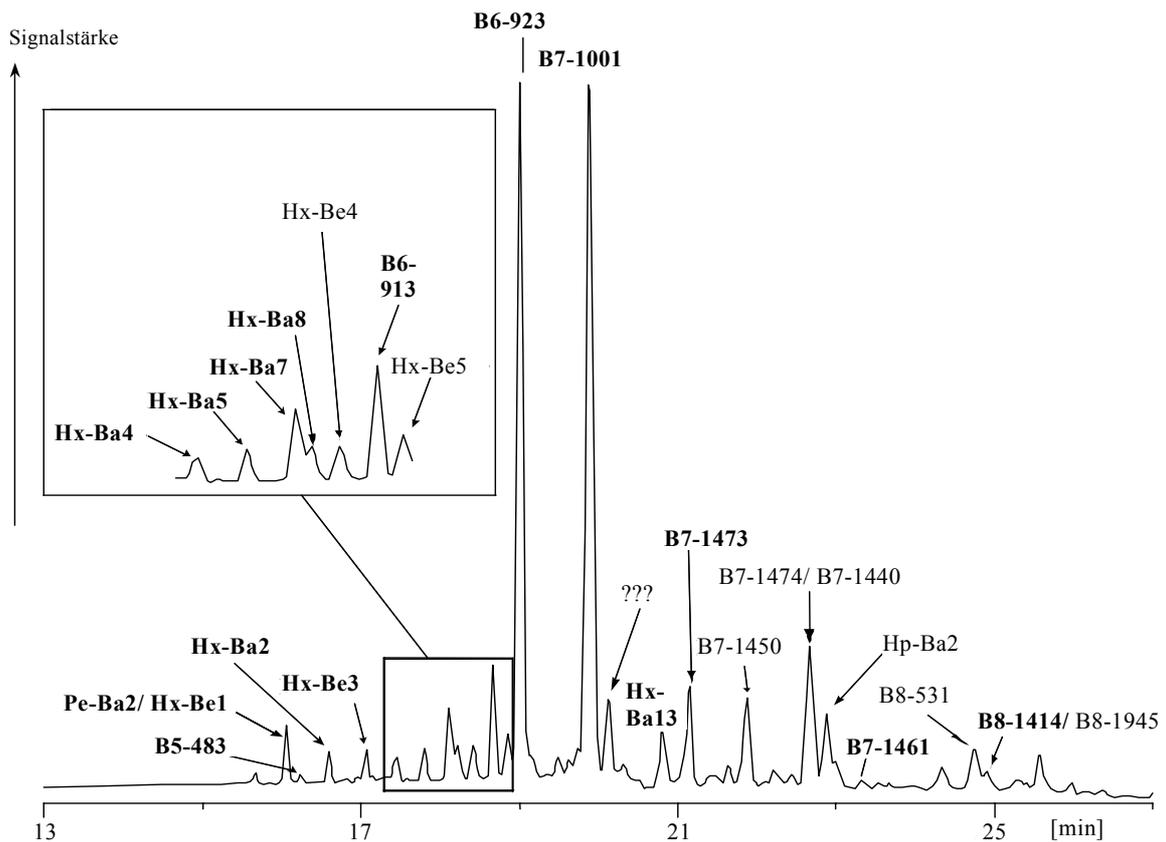
Wie erwartet, war die Abbaurate des Toxaphens von der Art der verwendeten Bakterienkultur abhängig, wobei die reduktive Dechlorierung in beiden Fällen beobachtet wurde. Insgesamt zeigte *E. coli* bei CTTs ein deutlich geringeres Dechlorierungsvermögen als *D. multivorans*, jedoch ein höheres als angesichts der Literaturbefunde zu erwarten gewesen wäre.

#### 4.6 Umweltrelevanz der erbrachten Ergebnisse mit *Dehalospirillum multivorans*

Da bislang kaum Erkenntnisse über das Vorkommen von Penta- und Hexachlor-CTTs in belasteten Umweltproben vorliegen, war zu prüfen, ob die in **Kap. 4.2-4.3** beschriebenen und in **Kap. 4.7** und **ATab. 5** aufgeführten CTTs auch in Umweltproben vorkommen. Dazu wurden Proben aus Kanada eingesetzt, da von dort relativ hohe Toxaphenbelastungen bekannt geworden waren (vgl. **Kap. 2.3.2**) [6][5][12].

#### 4.6.1 Sedimentprobe aus dem Ontario-See

Der Ontario-See ist mit einer Fläche von 19000 km<sup>2</sup> zwar der kleinste der fünf Großen Seen Nordamerikas, damit aber immer noch der vierzehntgrößte See der Erde. In den siebziger Jahren kam es dort u.a. durch Einträge aus der umgebenden Industrie und Landwirtschaft zu einer Sedimentierung von ungefähr 10 t Toxaphen [5]. Nach dem Toxaphenverbot Anfang der achtziger Jahre verminderte sich der direkte Eintrag, doch kam es vor allem durch den atmosphärischen Eintrag aus den Südstaaten der USA zu einer zusätzlichen Belastung [93]. Die Toxaphen-Gehalte in den Oberflächensedimenten der Großen Seen lagen dabei 1997 immer noch bei 2 bis 40 ng/g [93]. Die in **Abb. 51** dargestellte Sedimentprobe vom Ontario-See wies ein CTT-Rückstandsmuster auf, das dem nach sieben- bis 13-tätigen Melipaxabbau mit *D. multivorans* glich (vgl. **Kap. 4.2**). Die dominierenden Verbindungen waren B6-923 und B7-1001.



**Abb. 51** CTT-Rückstandsmuster in einem aufgearbeiteten Sedimentbohrkern (2-3 cm, Ablagerung von 1989-92) aus dem Ontario-See (Kanada), GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramm (DB-5-Säule, Summe der Penta- bis Nonachlorbornane und Hexachlorbornene); fett unterlegt sind die beim Abbau von Einzelstandards nachgewiesenen CTTs

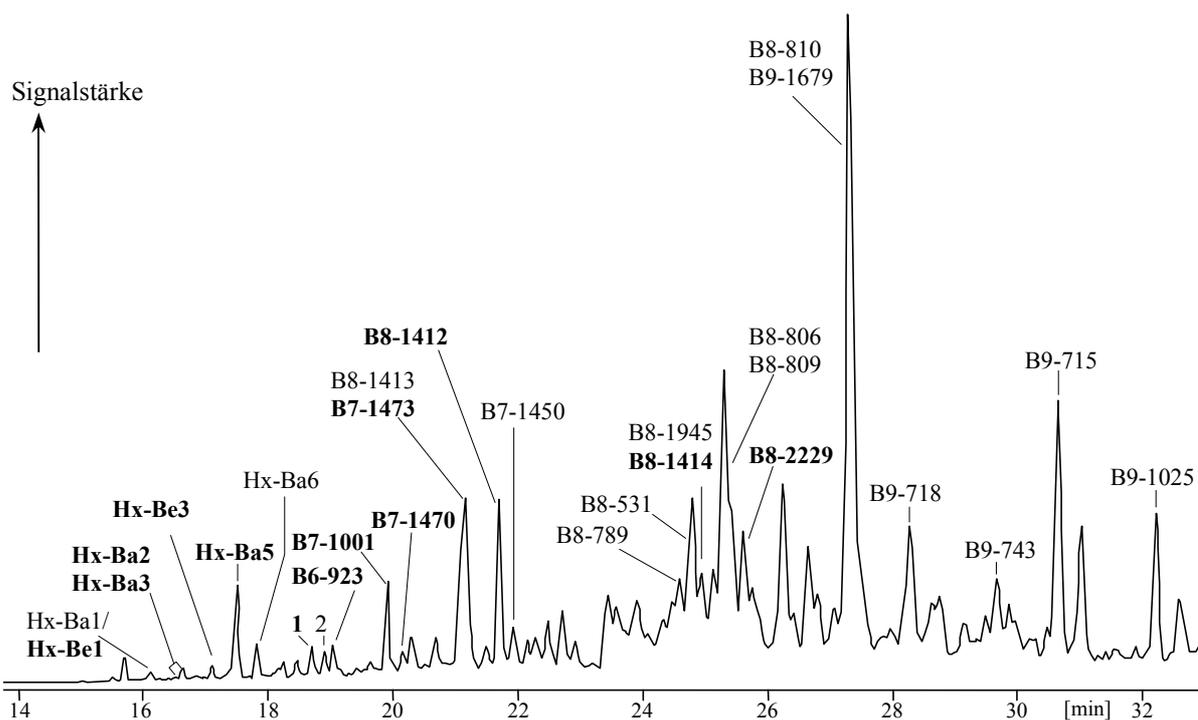
Der unvollständige Abbau ließ sich durch den Nachweis von Spuren höherchlorierter CTTs belegen, wobei mit Ausnahme von B8-531 keine CTTs mit *gem*-Cls an sekundären Kohlenstoffen nachweisbar waren. Dagegen wurde eine Vielzahl von niederchlorierten CTTs identifiziert (**Abb. 51**), deren Muster mit dem in Melipax gefundenen nahezu übereinstimmt (**Kap. 4.7**). Jedoch lagen beim Melipax-Abbau mit *D. multivorans* Pentachlorbornane und auch ungesättigte Hexachlorbornene stärker angereichert vor als in der Sedimentprobe des Ontario-Sees.

Insgesamt konnten bis auf B6-627 alle Abbauprodukte von B7-1001 (vgl. **Kap. 4.3.3.1**) in der Sedimentprobe identifiziert werden. Dass weder B5-465 noch Pe-Ba1 nachweisbar waren, deutet darauf hin, dass B6-923 kaum abgebaut wurde (vgl. **Kap. 4.3.3.2**). Der Nachweis intensiver Signale von B7-1473, B7-1461 und B7-1470 (teilweise überlagert vom B7-1001) belegt, dass der Abbau zu B6-923 noch nicht abgeschlossen war (vgl. **Abb. 56d**) oder die im Sediment vorhandenen Mikroorganismen dazu nicht in der Lage waren. Der Blick in **Abb. 51** verdeutlicht, dass mit den in **Kap. 4.2-4.3** identifizierten und den kommerziell erhältlichen Verbindungen das Rückstandsmuster fast vollständig beschrieben werden kann.

#### 4.6.2 Sedimentproben aus dem Großen Sklaven-See

Der Große Sklaven-See ist aufgrund seiner Größe von 28400 km<sup>2</sup> sehr bedeutend für die aquatischen Ökosysteme Nordkanadas. Die Region ist vom Nordkontinentalklima, d. h. von langen kalten Wintern (Ø -23 °C) und heißen Sommern (Ø 16,5 °C), geprägt. Die Sedimentierungsrate des Großen Sklaven-Sees (ca. 550-700 g/m<sup>2</sup>/Jahr) liegt ungefähr im Bereich von Ontario- und Erie-See und damit wesentlich über der von typischen subarktischen Seen [155][179]. Zur Untersuchung standen zwei Bohrkern aus dem Jahr 1993 zur Verfügung (vgl. **Kap. 3.1**) [155]. Die Proben stammten von den Segmenten aus 3,5-4 cm (entspricht ~ 1965, GSL-12b) und 2,5-3 cm Tiefe (entspricht ~ 1975, GSL-19b). Die Unterschiede der CTT-Rückstandsmuster in den Sedimentproben aus dem Ontario-See (**Abb. 51**) und dem Großen Sklaven-See (GSL 19b, **Abb. 52**) verdeutlichen einmal mehr die große Variationsbreite des anaeroben Abbaus von Toxaphen in der Umwelt.

Der kaum erfolgte CTT-Abbau geht aus den beträchtlichen Mengen an höherchlorierten CTTs, wie B9-1025, B9-715, B9-1679 und B8-810, hervor (vgl. **Tab. 15**). Die üblicherweise in Sedimenten dominierenden B6-923 und B7-1001 konnten nur in Spuren nachgewiesen werden (**Abb. 52**).



**Abb. 52** CTT-Rückstandsmuster in einem Sedimentbohrkern des Großen Sklaven-Sees aus 2,5-3 cm Tiefe (GSL-19b), GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramm (DB-5-Säule, Summe der Hexa- bis Nonachlorbornane und der Hexachlorbornene); 1: B6-913, 2: B7-1453; fett unterlegt sind die beim Abbau von Einzelstandards nachgewiesenen CTTs

Der geringe CTT-Abbau schlug sich im Quotienten der quantifizierten Hepta- und Nonachlorbornane nieder, der in beiden Segmenten der Sedimentbohrkerne unter dem von Melipax lag (vgl. **Tab. 12**). In Nordamerika wurden allerdings nicht Melipax sondern andere technische Gemische wie Toxaphene<sup>®</sup> und Strobane T<sup>®</sup> verwendet.

Insgesamt enthielt die ältere Probe GSL-12b nicht nur eine höhere Konzentration an CTTs, sondern auch höhere Anteile an niederchlorierten CTTs und damit einen dreimal so großen Quotienten der quantifizierten Hepta- und Nonachlorbornane wie GSL-19b. Hierfür kann als wesentlicher Grund der Zeitfaktor genannt werden, da Sedimente in tieferen Schichten früher abgelagert wurden und CTTs somit über einen längeren Zeitraum hinweg abgebaut werden konnten. Eine Anreicherung von niederchlorierten Verbindungen wurde auch im Sedimentprofil des Lochnagar-Sees (Schottland) gefunden, wo mit zunehmender Tiefe höhere Anteile an B6-923 und B7-1001 und niedrigere an Octa- und Nonachlorbornanen gefunden wurden [94].

**Tab. 15** CTT-Belastung von Sedimentproben aus dem Großen Sklaven-See

Quantifizierte CTTs	GSL-12b (3,5-4 cm, ~ 1965) [pg/g]	GSL-19b (2,5-3 cm, ~ 1975) [pg/g]	weitere CTTs	GSL-12b (3,5-4 cm, ~ 1965) [pg/g] <sup>a</sup>	GSL-19b (2,5-3 cm, ~ 1975) [pg/g] <sup>a</sup>
B6-923	29	2	Hx-Be1	-*	-*
B7-1453	21	5	Hx-Be2	0,3	-*
B7-1001	90	21	Hx-Be3	2,2	0,2
B7-1473	10	2	Hx-Be4	-*	-*
B7-1450	89	17	Hx-Be5	0,6	0,1
B7-495/515	165	43	Hx-Be6	3,4	-*
B7-1474/B7-1440	20	4	Hx-Ba1	1,2	0,2
B7-1059	73	5	Hx-Ba2	3,2	0,2
B8-1413	225	93	Hx-Ba3	-*	0,2
B8-1412	270	110	Hx-Ba4	2,2	-*
B8-789	245	51	Hx-Ba5	4,1	0,4
B8-531	220	50	Hx-Ba6	3,5	0,3
B8-1414/ B7-1945	67	15	Hx-Ba7	2,1	-*
B8-806/ B8-809 <sup>b</sup>	355	110	Hx-Ba8	2,0	-*
B8-2229	0	71	B6-913	1,1	0,2
B8-810	1350	245	Hx-Ba12	0,9	-*
B8-1471	0	82	Hx-Ba9	1,1	-*
B9-1679	425	335	B7-1470	2,6	0,8
B9-718	280	230	Hp-Ba2	-*	-*
B9-743	425	200	B7-1461	2,2	0,2
B9-2006	-*	-*			
B9-1046	-*	-*			
B9-715	730	340			
B9-1025	220	115			
Summe	5300	2150			
Verhältnis Hepta/Octa	0,175	0,06			

<sup>a</sup> Quantifizierung anhand des Responsefaktors von B6-923

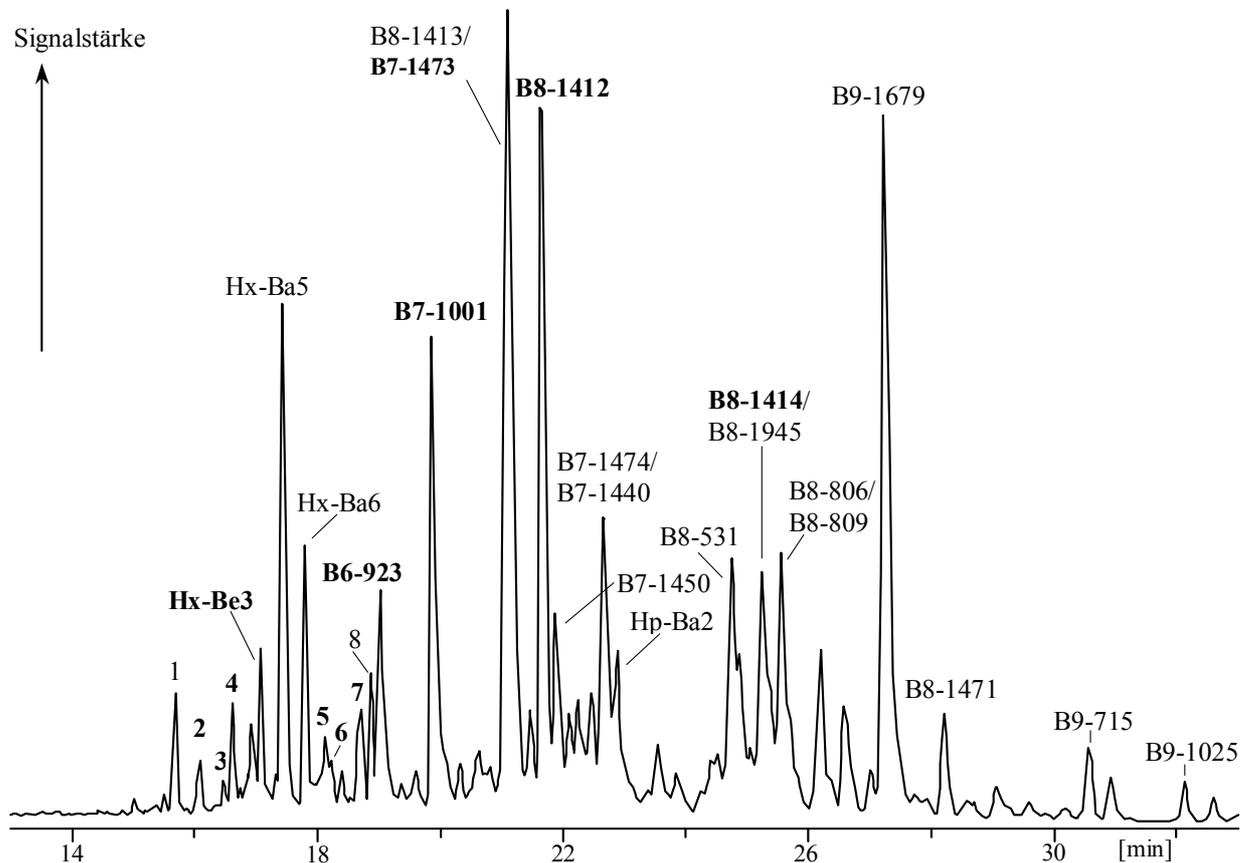
<sup>b</sup> B8-809 wurde mit den Responsefaktor von B8-806 bestimmt

\* < 0,1 pg/g

#### 4.6.3 Invertebraten aus dem Kanadischen Becken

Als weitere Umweltprobe standen uns Amphipoden (*T. libellula*) aus dem Kanadischen Becken zur Verfügung. In einer kürzlich vorgestellten Studie konnten Hoekstra *et al.* [180] im marinen Zooplankton (*Lalanus glacialis* und *C. hyperboreus*) aus der gleichen Region Gesamttoxaphengehalte von 38 ng/g Trockenmasse bestimmen. Dabei wurden B6-923 und

B7-1001 als Hauptkongenere ( $\sim 2$  ng/g) und 18 weitere, teilweise höherchlorierte CTTs nachgewiesen. In dieser Größenordnung (Summe von 27 CTTs: 69 ng/g Trockenmasse) lag auch das CTT-Spektrum von Amphipoden (*T. libellula*) aus dem Kanadischen Becken (Abb. 53).



**Abb. 53** CTT-Rückstandsmuster in Amphipoden aus dem Kanadischen Becken, GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramm (DB-5-Säule, Summe der Penta- bis Nonachlorbornane und Hexachlorbornene); gekennzeichnete Signale: **1**: unbekanntes Hexachlorbornen (-camphen), **2**: Hx-Ba1/Hx-Ba1, **3**: Pe-Ba3, **4**: Hx-Ba2, **5**: Hx-Ba7, **6**: Hx-Ba8, **7**: B6-913, **8**: B7-1453; fett unterlegt sind die beim Abbau von Einzelstandards nachgewiesenen CTTs

In dieser Probe konnten mehr als 25 CTTs identifiziert werden, wobei die höherchlorierten Bornane B8-1413, B8-1412 und B9-1679 überwogen. Für die CTT-Akkumulation in Invertebraten spielen die CTT-Konzentrationen im Sediment und im umgebenden Wasser sowie speziesspezifische Faktoren (z.B. das Enzymsystem der Organismen) eine Rolle. So dominierte zwar B6-923 ( $> 50$  % aller CTTs) im Wasser aus Holman (Kanadische Becken), doch im dort gefangenen Zooplankton (Fettgehalt 49 % des Trockengewichts) stellte dieses CTT nur rund 20 % des CTT-Gehaltes [180]. Die *T. libellula* enthielten auch eine Reihe von niederchlorierten CTTs als Folge des anaeroben Abbaus (vgl. Kap. 4.3).

Neben B7-1473 (B8-806 - 2-endo-Cl) konnten mit Hx-Ba5 und Hx-Ba6 auch zwei Metabolite von B7-1453 identifiziert werden. Die Detektion von Hx-Ba7, Hx-Ba8, B6-913, Hx-Be3 und Pe-Ba2 deutet an, dass auch B7-1001 teilweise abgebaut wurde. Jedoch konnten bis auf Pe-Ba2 alle CTTs in Melipax nachgewiesen werden, so dass die niederchlorierten CTTs nicht nur aus dem Abbau, sondern auch aus den ursprünglich eingetragenen CTTs stammen können.

Der Nachweis eines zusätzlichen Hexachlorbornens bzw. -camphens (Signal 1 in **Abb. 53**), das beim Abbau von Melipax nicht nachgewiesen werden konnte, könnte auf Unterschiede in den technischen Produkten zurückzuführen zu sein und damit eventuell als Indikatorverbindung für den Nachweis von Toxaphen (und nicht von Melipax) herangezogen werden.

Weitere ungesättigte CTTs wurden im Terry/Dupree Creek (Georgia, USA), das von einem Toxaphen produzierenden Betrieb kontaminiert wurde, nachgewiesen. Das dort detektierte unbekannte Hexachlorbornen war identisch mit Hx-Be3 (**Abb. 5**) [8]. Auch ein von Buser *et al.* [9] beschriebenes ungesättigtes Hexachlor-CTT X1, das in relativ großen Mengen nach einem Toxaphenabbau in Klärschlamm gefunden wurde, könnte dem Elutionsverhalten zufolge Hx-Be3 sein. Zwar erzielten Buser *et al.* im Gegensatz zu Maruya und Vetter [8] und der vorliegenden Arbeit keine Trennung der Enantiomere von X1 bzw. Hx-Be3, doch sind bei Verwendung von  $\beta$ -BSCD-Phasen synthesebedingte Variationen und Abnahmen in der Trennleistung mit zunehmender Nutzung bekannt geworden [181].

Zusätzlich wurden in der oben genannten Studie aus den USA vier unbekannte Heptachlorbornane (#A – #D) identifiziert [8], wobei mit dieser Arbeit der Nachweis erbracht werden konnte, dass B7-1473 mit #A und B7-1461 mit #D identisch sind. B7-1470, das Abbauprodukt von B8-809, konnte – nur teilweise von #A abgetrennt ( $\beta$ -BSCD-Säule) - ebenfalls identifiziert werden. Auch Muir und Karlsson detektierten mehrere Heptachlorbornane in kanadischen Sedimenten [182], die mit den hier beschriebenen übereinstimmen könnten.

Pentachlorbornane konnten in der Sedimentprobe aus dem Ontario-See (Pe-Ba2 und B5-483) und in den untersuchten Amphipoden (Pe-Ba2) nachgewiesen werden. Das Fehlen von B5-465 und Pe-Ba1 zeigt, dass B6-923 in natürlichen Proben kaum abgebaut wird. Zwei Pentachlorbornane wurden in einem Sediment vom Terry/Dupree Creek (Georgia, USA) beschrieben [11]. Die Enantiomertrennung ( $\beta$ -BSCD) war dabei nicht beim erst-, sondern nur beim zweiteluierenden Pentachlorbornan gelungen. Somit verhielten sich

beide wie im Fall von Pe-Ba2 und B5-483. Daher sind die von Maruya *et al.* beobachteten Pentachlorbornane wahrscheinlich identisch mit Pe-Ba2 und B5-483. Ein weiteres Indiz ist ihre Detektion in Melipax, welches auf Pe-Ba2, B5-483 und auf die von Maruya *et al.* beschriebenen Pentachlorbornane zutrifft [11].

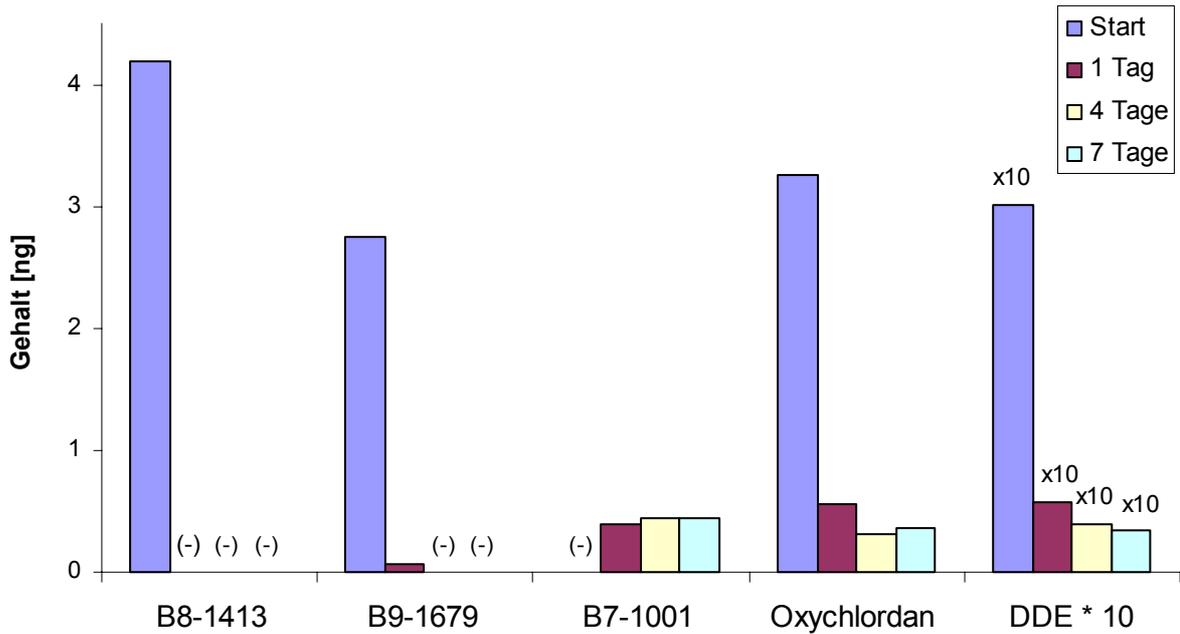
Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass der anaerobe Abbau von Toxaphen in Sedimenten, Böden, Klärschlämmen sowie mit isolierten Bakterienkulturen den gleichen Mechanismen folgt. Jedoch laufen die Umsetzungen unterschiedlich schnell und mit unterschiedlichem Ausmaß ab. Sowohl unterschiedliche Bakterienzusammensetzungen als auch chemische Beschaffenheiten und vorherrschende Temperaturen (vgl. **Kap. 4.1.9**) sind Schlüsselfaktoren für den Abbau von Toxaphen. Diese könnten die Ursache für die sehr unterschiedlichen CTT-Rückstandsmuster in Umweltproben sein, wie sie in dieser Arbeit, aber auch von Stern *et al.* [12] und von Maruya *et al.* [8] erhalten wurden.

#### 4.6.4 Abbauxperiment mit den Organochlorrückständen aus Skuaeiern

Im Gegensatz zu anaeroben Umweltkompartimenten reichern sich in höheren Organismen mit B8-1413 und B9-1679 vor allem höherchlorierte CTTs an (vgl. **Kap. 2.3.1**). Auch war bereits gezeigt worden, dass Fische die wichtigsten Metabolite des anaeroben Abbaus (B6-923 und B7-1001) leicht weiter abbauen können [175]. Im Folgenden sollte nun der Abbau der in höheren Organismen persistenten chlorierten Kohlenwasserstoffe mit Zellsuspensionen von *D. multivorans* untersucht werden.

Hierzu wurde ein Extrakt von Skuaeiern mit Hilfe von *D. multivorans* abgebaut. In der Probe lagen neben B8-1413, B8-1412, B8-1414, B8-2229, B9-1679 und B9-1025 auch p,p'-DDE und Oxychloridan angereichert vor (**Abb. 54**) [149]. Allerdings waren die Gehalte der meisten CTTs, mit Ausnahme von B8-1413 und B9-1679, so gering, dass diese nach der notwendigen Verdünnung (vgl. **Kap. 3.4.2.4**) nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Das bedeutende Octachlorbornan B8-1413 war bereits nach einem Tag nicht mehr nachweisbar. Auch B9-1679 war nach vier Tagen vollständig abgebaut, wie dies bereits in **Kap. 4.3.2.1** gezeigt worden war. Nach einem Tag konnte durch den Nachweis von B7-1001 belegt werden, dass innerhalb dieses kurzen Zeitraums schon ein Cl→H-Austausch an zwei *gem*-Cl (- 8-Cl, - 10-Cl) von B9-1679 erfolgt war. Dementsprechend liegt nahe, dass B8-1413 zu B7-1002 (- 8-Cl), B7-1000 (- 10-Cl) und zu B6-583 (- 8-Cl, - 10-Cl) abgebaut wurde. Jedoch konnten diese CTTs aufgrund zu geringer Gehalte in den Probenextrakten nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 54** Abbau von B8-1413, B9-1679, Oxychlordan und *p,p'*-DDE mit Hilfe von *D. multivorans* aus Skuaeierextrakten über einen Zeitraum von sieben Tagen, die angezeigten *p,p'*-DDE-Gehalte müssen mit zehn multipliziert werden, Werte vgl. ATab. 6

Neben den beiden CTTs wurden auch *p,p'*-DDE und Oxychlordan durch *D. multivorans* abgebaut (vgl. Struktur **Abb. 1**), jedoch verlief der Abbau langsamer als bei B9-1679 und B8-1413 und erfolgte auch nicht vollständig. Abbauprodukte dieser beiden Chlorkohlenwasserstoffe konnten nicht nachgewiesen werden. Angesichts der bisherigen Untersuchungen von *D. multivorans*, das sich hervorragend zum PCE-Abbau eignet, jedoch nicht von aromatischen Verbindungen [101][110], ist eine reduktive Dechlorierung von DDE an C-1 zu *p,p'*-Dichlordiphenylchloroethen (DDMU) wahrscheinlich. Ein konkreter Vorschlag für den Abbau von Oxychlordan kann aufgrund der vielfachen Cl-Substitution nicht gemacht werden, obwohl das *gem*-Cl an der Brücke ein möglicher Angriffspunkt sein könnte (vgl. **Abb. 1**).

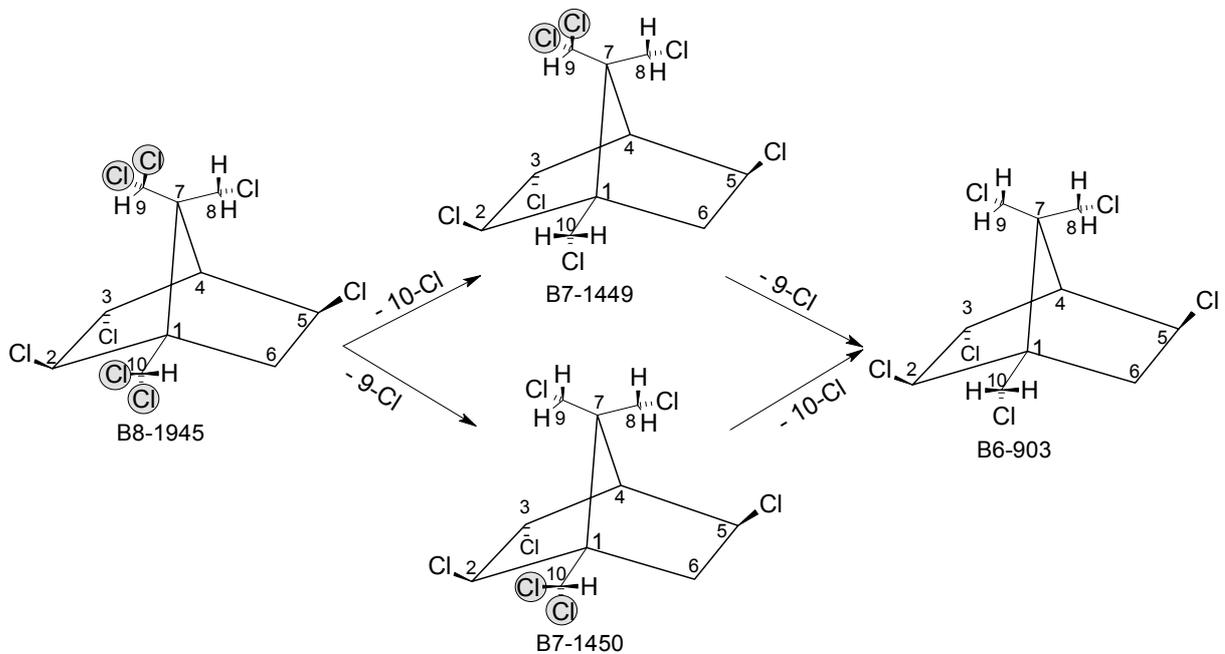
Mit diesem Versuch wurden erneut die guten Dechlorierungseigenschaften von *D. multivorans* bestätigt, da neben PCE und Toxaphen auch *p,p'*-DDE und Oxychlordan abgebaut werden konnten. Die gegenläufigen Prozesse der anaeroben Dechlorierungen und der Anreicherungen in Organismen beschränken sich also nicht nur auf CTTs sondern gelten auch für andere chlorierte Kohlenwasserstoffe.

4.7 Umweltrelevanz der mit *Dehalospirillum multivorans* erhaltenen Ergebnisse

Die Untersuchung des CTT-Abbaus mit Hilfe einer definierten Bakterienkultur von *D. multivorans* ermöglichte die Beschreibung der in der Umwelt ablaufenden Prozesse (vgl. **Kap. 4.2-4.3**). Vor allem bei einem fortgeschrittenen anaeroben Abbau gelang erstmals eine weitgehende Beschreibung des CTT-Rückstandsmusters in Umweltproben (vgl. Sedimentprobe Ontario-See, **Abb. 51**).

Mit dieser hier vorgestellten Methode war deshalb nicht nur eine Aufklärung der Abbauewege, sondern auch die Identifizierung einer Reihe von bisher unbekannten CTTs gelungen. So konnten im Laufe dieser Arbeit die Verbindungen B5-483, B5-465, B7-1473, B7-1461 und B7-1470 identifiziert werden.

Für eine Reihe von weiteren CTTs konnten Strukturvorschläge gemacht werden. So wurde für das Hauptprodukt des B7-1001-Abbaus die Struktur B6-903 vorgeschlagen. Die Richtigkeit dieser Hypothese könnte durch ein Abbauxperiment mit B8-1945 bzw. B7-1450 (B8-1945 → - 9-Cl) überprüft werden (**Abb. 55**). Die Dechlorierung von B7-1059 (- 10-Cl) sollte hauptsächlich zur Bildung von Hx-Ba12 (B6-627), dem Nebenprodukt des B7-1001-Abbaus, führen.



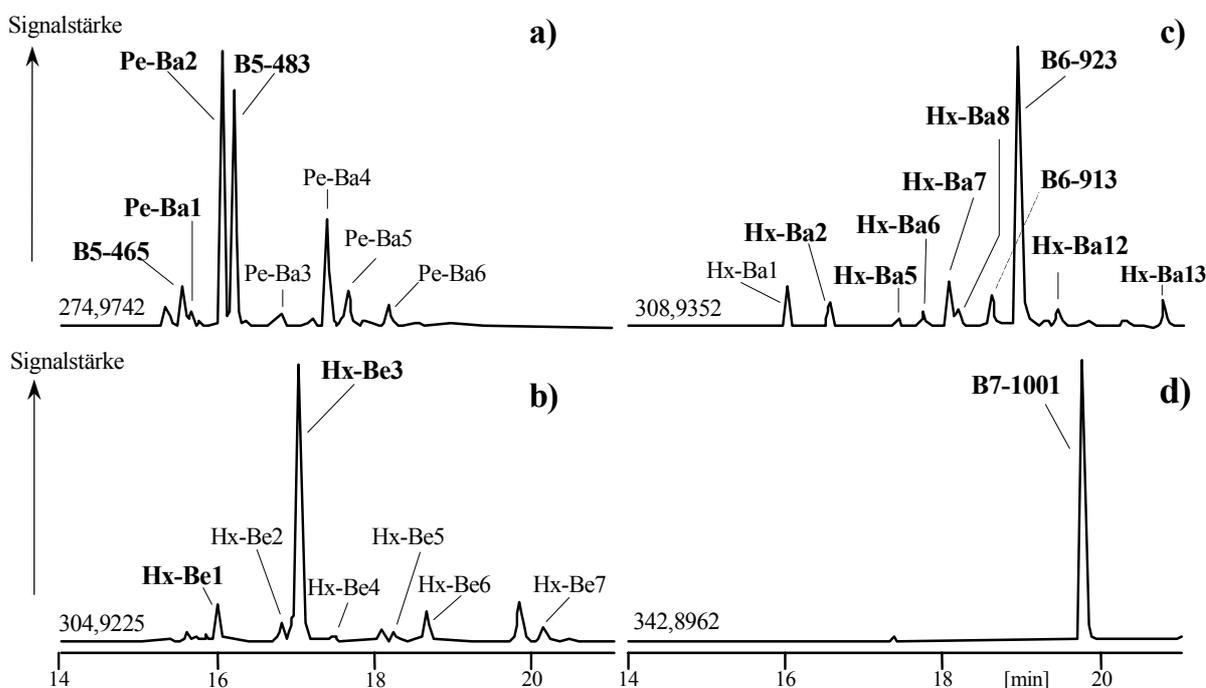
**Abb. 55** Mögliches Abbauschema von B8-1945 zu B6-903 über die Metabolite B7-1450 und B7-1449

Für Hp-Ba1, das dominierende Heptachlorbornan des B9-1025-Abbaus, konnte B7-1737 als wahrscheinliche Strukturvariante präsentiert werden. Durch den gezielten Einsatz von B8-2229 könnte dieser Strukturvorschlag abgesichert werden. Weiterhin konnte für Hx-Ba14 als Struktur B6-1128 vorgeschlagen werden.

Für weitere 12 unbekannte Verbindungen, die beim Abbau von B9-1025, B7-1453, B7-1001 und B6-923 gefunden wurden, konnte bisher keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Jedoch sollte anhand weiterer Experimente eine Aufklärung möglich sein. So könnte B7-1712 zum Nachweis der Bildung von B6-1116 aus B9-1025 eingesetzt werden.

Interessant wäre auch die Untersuchung des Abbaus von B6-913, da aus diesem Experiment neben dem ebenfalls bei der Dechlorierung des B6-923 gefundenen B5-483 weitere Pentachlorbornane hervorgehen müssten. Hilfreich wäre der Einsatz eines (bisher nicht verfügbaren) Einzelstandards von B8-809 zur Identifizierung des Abbauproduktes B7-1458 (- 2-*exo*-Cl, vgl. **Kap. 4.3.1.2**).

Allerdings konnte der Abbau von Melipax allein anhand der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten CTTs wesentlich besser interpretiert werden als dies zuvor möglich war (**Abb. 56**).



**Abb. 56** GC/ECNI-HRMS-SIM-Chromatogramme vom Melipax-Abbau nach 16 Tagen (DB-5-Säule); a) Pentachlorbornane, b) Hexachlorbornane (bzw. -camphene), c) Hexa-, d) Heptachlorbornane, vgl. **Kap. 4.2**, fett unterlegt sind die beim Abbau von Einzelstandards nachgewiesenen CTTs

So wurden mit Ausnahme von Hx-Ba1 alle beim Melipax-Abbau beschriebenen Hexachlorbornane (**Abb. 56c**) durch Experimente mit Einzel-CTTs identifiziert (**Kap. 4.2**). Auch im Fall der Pentachlorbornane konnten mit Pe-Ba2 und B5-483 die beiden wichtigsten Abbauprodukte nachgewiesen werden (**Abb. 56a**). Bei den ungesättigten Verbindungen wurde mit Hx-Be3 zwar die wichtigste Komponente (**Abb. 56b**) identifiziert, doch konnten für weitere Verbindungen keine Aussagen zur Bildung gemacht werden. Allerdings kann es sich hierbei um Chlorcamphene handeln (vgl. **Kap. 2.1.1**), die nach bisherigen Erkenntnissen durch *D. multivorans* nicht aus Chlorbornanen gebildet werden können.

Die große Zahl der in Melipax nachgewiesenen unbekanntes CTTs verdeutlicht, dass auf diesem Gebiet weiterer Forschungsbedarf besteht. Die beim Abbau von Einzelkomponenten vorkommenden CTTs sind in **Tab. 16** und alle weiteren CTTs in **ATab. 5** aufgelistet.

**Tab. 16** Strukturen und Retentionszeiten der beim Abbau von Einzel-CTTs detektierten Verbindungen an sechs verschiedenen Säulen, identifizierte unbekannte CTTs sind fett unterlegt

Name <sup>c</sup> / AV-Code	Metabolit von	IUPAC-Bezeichnung	DB- 5	RRI <sup>d</sup>	HP- 5	β-BSCD (i)	β-BSCD (ii)	CP- Sil2	CP-Sil8/ C18
<b>Pe-Be1</b>	-	<b>unbekanntes Pentachlorbornen</b>	-*	-*	<b>8,4</b>	-*	-*	-*	-*
Pe-Be2 <sup>a</sup>	B6-923	3,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Pentachlorborn-2-en	-*	-*	9,4	-*	-*	27,3	28,4
Pe-Be3 <sup>a</sup>	B6-923	5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Pentachlorborn-2-en	-*	-*	10,8	-*	-*	-*	-*
<b>B5-465</b>	<b>B6-923/ B7-1453</b>	<b>2-<i>exo</i>,3-<i>endo</i>,5-<i>exo</i>,9,10-Pentachlorbornan</b>	<b>15,4</b>	<b>0,4774</b>	-*	-*	-*	-*	-*
<b>Pe-Ba 1</b>	<b>B6-923</b>	<b>unbekanntes Pentachlorbornan</b>	<b>15,5</b>	<b>0,4795</b>	-*	-*	-*	-*	-*
Hx-Be1 <sup>a</sup>	B7-1001	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10-Hexachlorborn-2-en	16,1	0,4981	10,0	-*	-*	-*	-*
<b>Pe-Ba2</b>	<b>B7-1001</b>	<b>unbekanntes Pentachlorbornan</b>	<b>16,1</b>	<b>0,4987</b>	<b>10,0</b>	-*	<b>28,1</b>	-*	-*
<b>B5-483</b>	<b>B7-1001/ B6-923</b>	<b>2-<i>exo</i>,3-<i>endo</i>,8,9,10-Pentachlorbornan</b>	<b>16,2</b>	<b>0,5022</b>	<b>9,8</b>	-*	<b>29,2/29,6</b>	-*	-*
<b>Hx-Ba2</b>	<b>B7-1001</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>16,4</b>	<b>0,5087</b>	<b>10,9</b>	-*	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba3</b>	<b>B7-1453</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>16,5</b>	<b>0,5112</b>	-*	-*	-*	-*	-*
Hx-Be3 <sup>a</sup>	B7-1001	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorborn-2-en	17,1	0,5302	11,9	-*	25/25,2	-*	-*
<b>Hx-Ba4</b>	<b>B7-1453</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>17,2</b>	<b>0,5344</b>	-*	-*	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba5</b>	<b>B7-1453</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>17,3</b>	<b>0,5378</b>	-*	-*	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba 7</b>	<b>B7-1001</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>18,1</b>	<b>0,5617</b>	<b>13,2</b>	-*	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba8/ B6-903<sup>a</sup></b>	<b>B7-1001</b>	<b>2-<i>exo</i>,3-<i>endo</i>,5-<i>exo</i>,8,9,10-Hexachlorbornan</b>	<b>18,2</b>	<b>0,5634</b>	<b>13,4</b>	-*	<b>30,9/31,4</b>	-*	-*
B6-913	B7-1001/ B7-1461	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10-Hexachlorbornan	18,5	0,5735	14	30,5/31	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba9</b>	<b>B7-1453</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>18,5</b>	<b>0,5753</b>	-*	-*	-*	-*	-*
B7-1453	-	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Heptachlorbornan	19	0,5766	14	32,8/33,3	33,5/34,1	35,6	36,7
B6-923	B7-1473/ B7-515 <sup>b</sup>	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorbornan	19,1	0,5922	14,3	31,7/31,9	38,6/38,9	36	36,9

Name <sup>c</sup> / AV-Code	Metabolit von	IUPAC-Bezeichnung	DB- 5	RRI <sup>d</sup>	HP- 5	β-BSCD (i)	β-BSCD (ii)	CP- Sil2	CP-Sil8/ C18
<b>Hx-Ba11</b>	<b>B7-1001</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>19,1</b>	<b>0,5923</b>	-*	-*	-*	-*	-*
Hx-Ba12/ B6-627 <sup>a</sup>	B7-1001	2-endo,3-exo,6-exo,8,9,10-Hexachlorbornan	19,3	0,6015	14,8	-*	-*	-*	-*
B7-1001	B8-1412/ B8-1414	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan	20	0,6073	15,3	30/30,7	36,1/37,1	37,5	38,6
<b>Hx-Ba10</b>	<b>B9-1025</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>19,2</b>	<b>0,5958</b>	-*	-*	-*	-*	-*
<b>B7-1470</b>	<b>B8-809</b>	<b>2-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan</b>	<b>20,0</b>	<b>0,6228</b>	<b>15,3</b>	<b>37,6/37,8</b>	-*	-*	-*
<b>Hx-Ba13</b>	<b>B9-1025</b>	<b>unbekanntes Hexachlorbornan</b>	<b>21</b>	<b>0,6379</b>	-*	-*	-*	-*	-*
<b>B7-1473</b>	<b>B8-806</b>	<b>2-exo,3-endo,6-exo,8,9,9,10-Heptachlorbornan</b>	<b>21,2</b>	<b>0,6585</b>	<b>16,6</b>	<b>37,9/38,5</b>	-*	<b>39,9</b>	<b>40,9</b>
<b>Hp-Ba1/ B7-1737<sup>a</sup></b>	<b>B9-1025</b>	<b>2-exo,5-exo,8,9,9,10,10-Heptachlorbornan</b>	<b>21,4</b>	<b>0,6631</b>	-*	-*	-*	-*	-*
B8-1412	B9-1679	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10-Octachlorbornan	21,5	0,6681	17,1	37,7	-*	40,3	41,6
Hx-Ba14/ B6-1128 <sup>a</sup>	B9-1025	2-exo,5-exo,8,9,10,10-Hexachlorbornan	22,1	0,6842	-*	-*	-*	-*	-*
<b>B7-1461</b>	<b>B8-806</b>	<b>2-exo,3-endo,6-endo,8,9,9,10-Heptachlorbornan</b>	<b>23,2</b>	<b>0,7183</b>	<b>19,0</b>	<b>42,2/42,4</b>	-*	-*	-*
B8-1414	B9-1679	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10,10-Octachlorbornan	25,1	0,7783	20,2	42,8/43,1	45,4/45,9	44,8	45,8
B8-806	-	2,2,5-endo,6-exo,8,8,9,10-Octachlorbornan	25,3	0,7854	20,4	46,8/47,2	-*	45,1	46,4
B8-809	-	2,2,5-endo,6-exo,8,9,9,10-Octachlorbornan	25,3	0,7854	20,4	45,4/45,5	-*	45,1	46,4
B8-2229	B9-1025	2-exo,5,5,8,9,9,10,10-Octachlorbornan	26	0,7933	20,7	-*	-*	45,9	46,5
B9-1679	-	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan	27,4	0,8489	22,0	46,1/46,4	-*8	47,5	-*
B9-1025	-	2,2,5,5,8,9,9,10,10-Nonachlorbornan	32,2	1,0000	25,9	-*	-*	51,8	52,1

<sup>a</sup> Die Strukturen sind noch nicht abgesichert. Sie basieren auf  $t_r$ -Vergleichen bzw. Rückschlüssen aus dem Abbauverhalten.

<sup>b</sup> [13]

<sup>c</sup> Hx-Ba – Hexachlor-, Pe-Ba – Pentachlorbornane; Hx-Be – Hexachlorbornene

<sup>d</sup> RRI vom GC/ECNI-HRMS;  $RRI = t_r \text{ Verbindung} / t_r \text{ B9-1679}$

-\* nicht bestimmt

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Toxaphen ist eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Chlorpestizide. Technische Gemische wie z.B. das US-amerikanische Toxaphene und das in der ehemaligen DDR produzierte Melipax setzen sich aus mehreren Hundert Chlorbornanen und Spuren weiterer penta- bis dodecachlorierter Monoterpene zusammen. Von diesen Verbindungen des technischen Toxaphens (CTTs) werden aber in Umweltproben nur wenige persistente Vertreter gefunden. So reichern sich in biologischen Proben mit dem Octachlorbornan B8-1413 und dem Nonachlorbornan B9-1679 vor allem höherchlorierte Bornane an. Dagegen findet in anaeroben Sedimenten, Böden und Klärschlämmen ein Abbau zu niederchlorierten CTTs mit den sogenannten *Dead-End*-Metaboliten B6-923 und B7-1001 statt. Jedoch variieren die CTT-Rückstandsmuster im anaeroben Milieu sehr stark und enthalten häufig eine große Anzahl unbekannter Verbindungen, wobei kaum Erkenntnisse über deren Bildung und Abbau vorlagen.

Das Hauptanliegen dieser Arbeit war es, den Abbau von Toxaphen unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe der Gaschromatographie in Kopplung mit einem Massenspektrometer regiospezifisch zu untersuchen, um auf diese Weise zur Aufklärung des Umweltverhaltens dieser äußerst komplexen Substanzklasse beizutragen. Hierfür galt es zunächst ein Verfahren zu entwickeln, mit dem CTTs effizient und unter reproduzierbaren Bedingungen abgebaut werden können. Dabei war es ein weiteres Ziel, die Kinetik des Abbaus über einen längeren Zeitraum hinweg zu verfolgen.

Mit Hilfe von definierten Kulturen des halospezifischen Bakteriums *Dehalospirillum multivorans* und bei Durchführung vieler paralleler Ansätze, die zu verschiedenen Zeitpunkten komplett aufgearbeitet wurden, konnten reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden. Durch Kontrolle der Zelldichte und der Inkubationstemperatur, die sich bei 28 °C als optimal für den CTT-Abbau erwies, ergaben sich bei wiederholten Experimenten maximale Abweichungen von 15 %. Die verwendeten Zellsuspensionen von *D. multivorans* waren zumindest über einen Zeitraum von zehn Tagen zur Dechlorierung befähigt. Des Weiteren wurde 112 µg Melipax/mL Bakterienkultur als die Konzentration bestimmt, bei der sich noch keine toxischen Wirkungen auf *D. multivorans* nachweisen ließen.

Die Inkubation von Melipax mit *D. multivorans* führte schon nach wenigen Tagen zu CTT-Rückstandsmustern, die den in Umweltproben beobachteten glichen. Innerhalb von 16 Tagen konnte Melipax nahezu vollständig in B6-923 und B7-1001 umgewandelt werden. Neben diesen beiden Hauptkomponenten wurden aber auch weitere Pentachlor- und Hexachlor-CTTs nachgewiesen. Damit erfolgte der CTT-Abbau durch *D. multivorans* zwar auf gleichem Wege wie in Sedimenten und Böden, doch geschah dies erheblich schneller als bei allen bisher in der Literatur beschriebenen biologischen Prozessen.

Durch den gezielten Einsatz von Einzelstandards mit bestimmten Strukturmerkmalen sollte der reduktive CTT-Abbau regiospezifisch untersucht werden. Allerdings sind nur wenige CTTs kommerziell erhältlich und diese dann auch sehr teuer. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zusätzlich zu den im Labor bereits vorhandenen Verbindungen vier weitere Chlorbornane (B6-923, B7-1001, B7-1473 und B8-1414) aus komplexen Gemischen mittels *Reversed-Phase*- und Normalphasen-HPLC isoliert.

Mit diesen Isolaten konnte der Abbau von insgesamt zehn CTTs einzeln verfolgt werden. Dabei fanden sowohl die wichtigen und toxischen Kongenere in technischen Produkten (B8-806, B8-809) als auch umweltrelevante CTTs, die zuvor wiederholt in biologischen Proben (B9-1679, B9-1025, B8-1414, B8-1413, B8-1412, B7-1453) und in Sedimentproben (B7-1001 und B6-923) nachgewiesen worden waren, Berücksichtigung.

Hinweisen aus der Literatur zufolge sollte der CTT-Abbau vorrangig durch reduktive Dechlorierung an Kohlenstoffen mit geminalen Cl-Atomen (*gem*-Cl) erfolgen. Durch den gezielten Einsatz von Chlorbornanen (B8-806, B8-809, B9-1025), die sowohl an primären als auch an sekundären Kohlenstoffen *gem*-Cl aufweisen, konnte gezeigt werden, dass der Abbau zunächst regiospezifisch an sekundären Kohlenstoffen mit *gem*-Cl erfolgte. Diese Dechlorierung war bis zu 20-mal schneller als die im Anschluss daran beobachtete Dechlorierung an *gem*-Cl des primären Kohlenstoffs.

Durch den Abbruch der Experimente nach relativ kurzen Inkubationszeiten konnten mehreren Zwischenprodukten des CTT-Abbaus eindeutige Strukturen zugeordnet werden, so z.B. im Fall von B7-1473, wo zusätzlich <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchung durchgeführt wurden.

Beim Abbau von B9-1025 zeigte sich weiterhin, dass *gem*-Cls an C-2 erheblich schneller als *gem*-Cls an C-5 dechloriert werden. Zudem war eine bevorzugte – teilweise sogar hochspezifische – Dechlorierung des 2-*endo*-Cl (und nicht des 2-*exo*-Cl) beobachtet worden. Somit sind Chlorbornane mit *gem*-Cls an C-2 unter anaeroben Bedingungen als besonders instabil einzustufen. Der Abbau von B9-1025 zeigte aber auch, dass innerhalb eines Experimentes eine Dechlorierung von drei und mehr Chloratomen möglich ist.

Bei der Untersuchung von Chlorbornanen, die nur *gem*-Cls an primären Kohlenstoffen (C-8, C-9 und C-10) besitzen (B9-1679, B7-1453, B8-1414, B8-1412), erwies sich die C-10 Position als die stabilere.

Bisher war davon ausgegangen worden, dass CTTs ohne *gem*-Cls wie B6-923 und B7-1001 unter reduktiven Bedingungen äußerst stabil sind. Beim Abbau von B7-1001 mit *D. multivorans* konnten jedoch insgesamt neun CTTs und beim deutlich langsameren Abbau von B6-923 drei Pentachlorbornane nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Verbindungen, die beim Abbau mehrerer CTT-Einzelverbindungen entstanden, konnten die Strukturen der Metabolite B5-485 und B5-465 eindeutig bestimmt werden. Somit ist die Stellung der Chloratome und nicht deren Anzahl der wesentliche Faktor für die Persistenz von Chlorbornanen unter reduktiven Bedingungen.

Die Struktur eines ungesättigten Hexachlorbornens, das beim Abbau des B7-1001 mit *D. multivorans* detektiert wurde, konnte nach Umsetzung von B7-1001 mit methanolischer KOH-Lösung weitgehend aufgeklärt werden. Dies belegt, dass CTTs außer durch reduktive Dechlorierung in vermindertem Maße auch durch Dehydrochlorierung abgebaut werden können. Dabei ist mit einer *cis*-Eliminierung und der Beteiligung von *exo*-ständigen Chloratomen, insbesondere wenn diese nicht vicinal zu C-1 stehen, zu rechnen.

Insgesamt wurden beim Abbau der zehn Ausgangsverbindungen 19 unbekannte CTTs identifiziert, wobei durch Vergleich der Produkte, die bei verschiedenen Abbauprozessen erhalten wurden sowie durch Unterbrechung der Abbauprozesse fünf Strukturen eindeutig und zwei weitere mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgeklärt werden konnten. Darüber hinaus konnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Struktur der übrigen 12 CTTs gewonnen werden. Die Relevanz dieser Verbindungen wurde durch die Analyse

von Umweltproben bestätigt. So wurden in belasteten Sedimentproben aus dem Ontario-See 10 der 19 unbekannt CTTs nachgewiesen.

Bei Einsatz des zu Vergleichszwecken eingesetzten *Escherichia coli* wurden ca. 20-mal geringere Umsatzraten als mit *D. multivorans* beobachtet. Außerdem war *E. coli* nur zum Abbau von *gem*-Cls befähigt. Diese markanten Unterschiede einzelner Mikroorganismen in der Fähigkeit Toxaphen abzubauen, könnten neben den chemischen und standortspezifischen Parametern (Temperatur, Bodenzusammensetzung) ein wesentlicher Grund für die unterschiedlichen CTT-Rückstandsmustern in Umweltproben sein. Dies wurde auch beim Vergleich von Sedimentproben aus dem Großen Sklaven-See und dem Ontario-See deutlich.

Der auch bei abgetöteten *D. multivorans* Bakterien beobachtete geringfügige CTT-Abbau war ein Hinweis darauf deutete an, dass die Dechlorierung teilweise auch abiotisch erfolgen kann. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich das katalytische Zentrum der Dehalogenase. Hierbei handelt es sich um ein Corrinoid mit ähnlicher Struktur wie Cyanocobalamin. Ein abiotischer CTT-Abbau konnte durch den Einsatz von superreduziertem Dicyanocobinamid und Cyanocobalamin belegt werden. Vor allem mit superreduziertem Dicyanocobinamid konnten innerhalb weniger Stunden 90 % und mehr des eingesetzten Toxaphens abgebaut werden. Allerdings waren von diesem Abbau alle CTTs gleichermaßen betroffen, so dass auf diesem Wege keine Beschreibung der in der Umwelt ablaufenden Prozesse möglich war.

Die komplementäre Anreicherung von CTTs in Böden (niederchlorierte Verbindungen) und Säugern (hochchlorierte Verbindungen) ist nicht auf CTTs begrenzt. So konnte gezeigt werden, dass *D. multivorans*-haltige Zellkulturen mit *p,p'*-DDE und Oxychlordan auch die Hauptmetabolite der Chlorpestizide DDT und Chlordan abbauen können. Dies eröffnet weitere Perspektiven für den Einsatz der in dieser Arbeit vorgestellten Methode zur Untersuchung des anaeroben Organohalogen-Abbaus unter definierten Bedingungen in relativ kurzer Zeit.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Saleh MA. 1991. Toxaphene: chemistry, biochemistry, toxicity and environmental fate. *Rev Environ Cont Toxicol* 118: 1-85.
- 2 Vetter W, Oehme M. 2000. Toxaphene. Analysis and Environmental Fate of Congeners. In: *The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3, Part K, New Types of Persistent Halogenated Compounds*; Paasivirta J (Ed), Springer Verlag: Heidelberg, 237-287.
- 3 Parlar H. 1991. Chlorierte Bornan-Derivate – eine neue Klasse umweltrelevanter Chemikalien. *Nachr Chem Tech Lab* 39: 26-37.
- 4 Domsch KH. 1992. Pestizide im Boden, Mikrobieller Abbau und Nebenwirkungen auf Mikroorganismen. VCH Weinheim.
- 5 Howdeshell MJ, Hites RA. 1996. Historical input and degradation of Toxaphene in lake Ontario sediment. *Environ Sci Technol* 30: 220-224.
- 6 Miskimmin BM, Muir DCG, Schindler DW, Stern GA, Grift NP. 1995. Chlorobornanes in sediments and fish 30 years after Toxaphene treatment of lakes. *Environ Sci Technol* 29: 2490-2495.
- 7 Braekevelt E, Tomy GT, Stern GA. 2001. Comparison of an individual congener standard and a technical mixture for the quantification of Toxaphene in environmental matrices by HRGC/ECNI-HRMS. *Environ Sci Technol* 35: 3513-3518.
- 8 Vetter W, Maruya KA. 2000. Congener and enantioselective analysis of Toxaphene in sediment and food web of a contaminated estuarine wetland. *Environ Sci Technol* 34: 1627-1635.
- 9 Buser HR, Haglund P, Müller MD, Poiger T, Rappe C. 2000. Rapid anaerobic degradation of Toxaphene in sewage sludge. *Chemosphere* 40: 1213-1220.
- 10 Parlar H, Leupold G, Reil D, Angerhöfer D, Coelhan M. 2001. Structure-environmental degradation relationship model for Toxaphene congeners. *Fresenius Environ Bull* 10: 4-17.
- 11 Maruya K, Wakeham SG, Vetter W, Francendese L. 2000. Prominent chlorobornane residues in estuarine sediments contaminated with Toxaphene. *Environ Toxicol Chem* 19: 2198-2203.
- 12 Stern GA, Muir DCG, Billeck B, Lockhart L, Wilkinson P, Miskimmin BM. 1996. Toxaphene congener patterns in lake sediment. *Organohalogen Compd* 28: 379-384.
- 13 Fingerling G, Hertkorn N, Parlar H. 1996. Formation and spectroscopic investigation of two hexachlorobornanes from six environmentally relevant Toxaphene components by reductive dechlorination in soil under anaerobic conditions. *Environ Sci Technol* 30: 2984-2992.
- 14 Mitra S, Jones WJ. 1997. Anaerobic transformation of Toxaphene by an enrichment culture from a historically contaminated site. *Proceedings of the American Society of Microbiology 97th General Meeting*, Miami Beach, Florida/USA, May 4-8: 520-521.
- 15 Holliger C, Wohlfarth G, Diekert D. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 22: 383-398.
- 16 Clark JM, Matsumura F. 1979. Metabolism of Toxaphene by aquatic sediment and a camphor degrading *pseudomonad*. *Arch Environ Toxicol* 8: 285-298.
- 17 Holliger C, Regard C, Diekert G. 2003. Dehalogenation by anaerobic bacteria. In: *Dehalogenation: Microbial processes and environmental applications*. Häggblom MM, Bossert ID (Ed), Kluwer Publisher, Norwell, in Druck.
- 18 [http://docs.pesticideinfo.org/documentation4/ref\\_toxicity7.html](http://docs.pesticideinfo.org/documentation4/ref_toxicity7.html)

- 19 Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR 2001 CERCLA  
Priority List of Hazardous Substances that will be Subject for Toxicological  
Profiles and Support Documents. US Department of Health and Human Services,  
Public Health Service, Atlanta, GA, USA.
- 20 Lach G, Ständecke U, Pletsch B, Xu L, Parlar H. 1991. Ein Beitrag zur  
Quantifizierung von Toxaphenrückständen in Fischhölen. *Z Lebensm Unters  
Forsch* 192: 440-444.
- 21 Kimmel L, Coelhan M, Leupold G, Vetter W, Parlar H. 2000. FTIR spectroscopic  
characterization of chlorinated camphenes and bornenes in technical Toxaphene.  
*Environ Sci Technol* 34: 3041-3045.
- 22 de Geus HJ, Besselink H, Brouwer A, Klungsøyr J, McHugh B, Nixon E, Rimkus  
GG, Wester PG, de Boer J. 1999. Environmental occurrence, analysis, and  
toxicology of Toxaphene compounds. *Environ Health Perspectives* 107: 115-144.
- 23 Holmstead RS, Kalifa S, Casida JE. 1974. Toxaphene composition analyzed by  
combined gas chromatography-chemical ionization mass spectroscopy. *J Agric  
Food Chem* 24: 620-624.
- 24 Saleh MA. 1983. Capillary gas chromatography-electron impact and chemical  
ionization mass spectroscopy of Toxaphene. *J Agric Food Chem* 31: 748-751.
- 25 de Boer J, de Geus HJ, Brinkmann UAT. 1998. Multidimensional gas  
chromatographic analysis of Toxaphene. *Environ Sci Technol* 31: 873-879.
- 26 Jansson B, Wideqvist U. 1983. Analysis of Toxaphene (PCC) and chlordane in  
biological samples by NCI mass spectrometry. *Intern J Environ Anal Chem* 13:  
309-321.
- 27 Vetter W. 1998. Beiträge zur kongenerspezifischen und enantioselektiven  
Bestimmung von Rückständen des Organochlorpestizides Toxaphen in marinen  
Organismen. *Habilitationsschrift*. Universität Jena.
- 28 U.S.EPA: United States Environmental Protection Agency. 1982. Notice of intent  
to cancel or restrict registrations of pesticide products containing Toxaphene. *Fed  
Regis* 47: No 229, 53784.
- 29 Voldner EC, Li YF. 1993. Global usage of Toxaphene. *Chemosphere* 27: 2073-  
2078.
- 30 Nikiforov VA. 2002. Production of Polychloroterpenes in the USSR.  
*Organohalogen Compd* 59: 315-318.
- 31 Bliefert C. 1995. Umweltchemie. Viley-VCH Weinheim. 50 ff.
- 32 Heinisch E, Klein S. 1994. Zur Anwendung von Chlorkohlenwasserstoff-  
Pestiziden in der ehemaligen DDR - Folgewirkungen für Mensch und Umwelt -  
Produktions- und Anwendungsarten. *Gesunde Pflanzen* 46: 20-24.
- 33 Turner WV, Engel JL, Casida JE. 1977. Toxaphene components and related  
compounds: Preparation and toxicity of some hepta-, octa- and  
nonachlorobornanes, hexa- and heptachlorobornenes, and a  
hexachlorobornadiene. *J Agric Food Chem* 25: 1394-1401.
- 34 LaPierre RB, Biron E, Guzzi L, Kranich WL, Weiss AH. 1979.  
Hydrodechlorination of Aldrin, Dieldrin and Toxaphene. *Acta Chim Acad Sci  
Hung* 102: 1-10.
- 35 Engelmann M, Cheng IF. 2000. Total polychlorinated Biphenyl quantification by  
rapid dechlorination under mild conditions. *LCGC* 18: 154-160.
- 36 Lach G. 1990. Zur Problematik der rückstandsanalytischen Bestimmung von  
Multikomponenten-Gemischen in der Umwelt - aufgezeigt am Beispiel des  
Insektizides „Toxaphen“. *Dissertation*. GH Kassel.
- 37 Lach G, Parlar H. 1990. Quantification of Toxaphene residues in fish and fish  
products using a new analytical standard. *Chemosphere* 21: 29-34.

- 38 Parlar H, Nitz S, Michna A, Korte F. 1978. Ein Beitrag zur Zusammensetzung des Insektizides „Toxaphen<sup>®cc</sup>“. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Charakterisierung eines öligen und eines kristallinen Anteils des technischen Toxaphens und dessen insektizide Wirksamkeit. *Z Naturforsch* 336: 915-923.
- 39 Fisk AT, Rosenberg B, Cymbalisky CD, Stern GA, Muir DCG. 1999. Octanol/Water Partition Coefficients of Toxaphene congeners determined by the “slow-stirring” method. *Chemosphere* 39: 2549-2562.
- 40 Paris DF, Lewis DL, Barnett JT. 1977. Bioconcentration of Toxaphene by microorganisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 17: 564-572.
- 41 Oehme M, Schlabach M, Kallenborn R, Haugen JE. 1996. Sources and pathways of persistent polychlorinated pollutants to remote areas of the North Atlantic and levels in the marine food chain: a research update. *Sci Total Environ* 186: 13-24.
- 42 Bahadir M, Parlar H, Spitteller M. (Hrsg) 1995. Springer Umweltlexikon. Springer Verlag Heidelberg; ISBN 3-540-54003-2.
- 43 Witte J. Die kongenerspezifische Erfassung von Toxaphenen mittels GC/ECNI-SIM-MS in Seevogeleiern aus Norddeutschland unter besonderer Berücksichtigung der Flusseeeschwalbe *Sterna hirundo*. *Dissertation*. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 44 Korte R, Scheuner I, Parlar H. 1979. Toxaphene (Camphechlor): A special report. *Pure Appl Chem* 51: 1583-1601.
- 45 Reuber MD. 1979. Carcinogenicity of Toxaphene: a review. *J Toxicol Environ Health* 5: 729-748.
- 46 Rumbeiha WK, Braselton WE, Donch D, Slanker M, Mauer MC, Jantz S, Rumler P. 1997. Toxaphene toxicosis in a beef herd. *J Vet Diagn Invest* 10: 277-279.
- 47 Mehrle PM, Mayer JR FL. 1975. Toxaphene effects on growth and bone composition of Fathead Minnows, *Pimephales promelas*. *J Fish Res Board Can* 32: 593-598.
- 48 Vack A. 1996. Östrogene Wirkungen von Xenobiotika – Forschungsstand und Konsequenzen für die Bewertung der Umweltrelevanz von Chemikalien. *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 8/4: 222-226.
- 49 Greim H. 1998. Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt. *Nachr Chem Tech Lab* 46: 63-66.
- 50 CD Römpp Chemie Lexikon – Version 1.0; G. Thieme Verlag Stuttgart 1995.
- 51 Parlar H, Reil G, Angerhöfer D, Coelhan M. 2001. Structure – Activity relationship model for Toxaphene congeners. *Fresenius Environ Bull* 10: 122-130.
- 52 Khalifa S, Mon TR, Engel JL, Casida JE. 1974. Isolation of 2,2,3-endo,6-exo,8,9,10-heptachlorobornane and an octachloro toxicant from technical Toxaphene. *J Agric Food Chem* 22: 653-657.
- 53 Chandurkar PS, Matsumara F, Ikeda T. 1978. Identification and toxicity of toxicant Ac, a toxic component of Toxaphene. *Chemosphere* 7: 123-130.
- 54 Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Rückstands-Höchstmengenverordnung-RHmV), vom 1.9 1994, 3 Änd.-VO vom 26.9. 1997 (BGBl. I S. 2366).
- 55 Ballschmitter K, Zell M. 1980. Baseline studies of the global pollution. *Intern J Environ Anal Chem* 8: 15-35.
- 56 Alawi M, Barlas H, Hainzl D, Burhenne J, Coelhan M, Parlar H. 1994. A contribution to the HRGC-MS and HRGC-ECD response factors of the environmental relevant Toxaphene congeners. *Fresenius Environ Bull* 3: 350-357.

- 57 Vetter W, Luckas B, Heidemann G, Skirnisson K. 1996. Organochlorine residues in marine mammals from the Northern hemisphere – A consideration of the composition of organochlorine residues in the blubber of marine mammals. *Sci Total Environ* 186: 29-39.
- 58 Rigaudy J, Klesney SP. 1979. Nomenclature of organic chemistry, sections A, B, C, D, E, F and G. International Union of Pure and Applied Chemistry; Pergamon Press, Oxford.
- 59 Vetter W, Luckas B. 1995. Theoretical aspects of polychlorinated bornanes and the composition of Toxaphene in technical mixtures and environmental samples. *Sci Total Environ* 160/161: 505-510.
- 60 Stern GA, Muir DCG, Ford CA, Grift NP, Dewailly E, Bidleman TF, Walla MD. 1992. Isolation and identification of two major recalcitrant Toxaphene congeners in aquatic biota. *Environ Sci Technol* 26: 1838-1840.
- 61 Vetter W, Scherer G, Schlabach M, Luckas B, Oehme M. 1994. An unequivocal <sup>1</sup>H-NMR structural assignment of TOX8 and TOX9, the most abundant Toxaphene congeners in marine mammals. *Fresenius J Anal Chem* 34: 552-558.
- 62 Nikiforov VA, Tribulovich VG, Karavan VS. 1995. On the nomenclature of Toxaphene congeners. *Organohalogen Compd* 26: 393-396.
- 63 Oehme M, Kallenborn R. 1995. A simple numerical code for polychlorinated compound classes allowing an unequivocal derivation of the steric structure, I: Polychlorinated biphenyls and bornanes. *Chemosphere* 30: 1739-1750.
- 64 Andrews P, Vetter W. 1995. A systematic nomenclature system for Toxaphene congeners, part 1: chlorinated bornanes. *Chemosphere* 31: 3879-3886.
- 65 Wester PG, de Geus HJ, de Boer J, Brinkman UT. 1997. Simple nomenclature for chlorinated bornanes, bornenes and bornadienes from which structural information can be directly deduced. *Organohalogen Compd* 33: 47-52.
- 66 Ruppe S, Neumann A, Vetter W. 2003. Anaerobic degradation of compounds of technical Toxaphene. I. Regiospecific reaction of chlorobornanes with geminal chlorine atoms. *Environ Toxicol Chem* in Druck.
- 67 Nikiforov VA, Karavan VS, Miltsov SA. 2000. Relative retention times of chlorinated monoterpenes. *Chemosphere* 41: 467-472.
- 68 Vetter W, Scherer G. 1998. Variety, structures, GC properties, and persistence of compounds of technical Toxaphene (CTTs). *Chemosphere* 37: 2525-2543.
- 69 Krock B. 1997. Zur Isolierung und Charakterisierung von TOX7, einem Toxaphen-Kongeneren in technischen Gemischen und Umweltproben. *Dissertation*. Universität Jena.
- 70 Casida JE, Holmstead RL, Khalifa S, Palmer KJ, Knox JR, Oshawa T, Wong RY. 1974. Toxaphene insecticide: A complex biodegradable mixture. *Science* 183: 520-521.
- 71 Seiber JN, Landrum PF, Madden SC, Nugent KD, Winterlin WL. 1975. Isolation and gas chromatographic characterization of some Toxaphene components. *J Chromatogr* 114: 361-368.
- 72 Krock B, Vetter W, Luckas B. 1996. Structure elucidation of a main heptachloro congener of Toxaphene in marine organisms after isolation from Melipax. *Chemosphere* 33: 1005-1019.
- 73 Burhenne J. 1993. Darstellung ökotoxikologisch relevanter Chlorbornane als Referenzsubstanzen für die rückstandsanalytische Bestimmung des Insektizides Toxaphen. *Dissertation*. GH Kassel.
- 74 Burhenne J, Hainzl D, Xu L, Vieth B, Alder L, Parlar H. 1993. Preparation and structure of high-chlorinated bornane derivatives for the quantification of

- Toxaphene residues in environmental samples. *Fresenius J Anal Chem* 346: 779-785.
- 75 Xu L, Hainzl D, Burhenne J, Parlar H. 1994. HR-GC and HRGC-NICI SIM quantification of Toxaphene residues in selected marine organism by environmentally relevant chlorobornanes as standard. *Chemosphere* 28: 237-243.
- 76 Vetter W, Luckas B, Oehme M. 1992. Isolation and purification of the two main Toxaphene congeners in marine organisms. *Chemosphere* 25: 1643-1652.
- 77 Parlar H, Angerhöfer D, Coelhan M, Kimmel L. 1995. HRGC and HRGC-ECNI determination of Toxaphene residues in fish with a new 22 components standard. *Organohalogen Compd* 26: 357-362.
- 78 Nikiforov VA, Karavan VA, Miltsov SA. 1999. Relative retention times of chlorinated terpenes. *Organohalogen Compd* 41: 605-609.
- 79 Bidleman TF, Falconer RL, Walla MD. 1995. Toxaphene and other organochlorine compounds in air and water at resolute Bay, N.W.T.. Canada. *Sci Total Environ* 160/161: 55-63.
- 80 Bidleman TF, Patton GW, Walla MD, Hargrave BT, Vass WP, Erickson P, Fowler B, Scott V, Gregor DJ. 1989. Toxaphene and other organochlorines in arctic ocean fauna: evidence for atmospheric delivery. *Arctic* 42: 307-313.
- 81 Hargrave BT, Muir DCG, Bidleman TF. 1993. Toxaphene in amphipods and zooplankton from the arctic ocean. *Chemosphere* 27: 1949-1963.
- 82 Swackhamer DL, Charles MJ, Hites RA. 1987. Quantitation of Toxaphene in environmental samples using negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 59: 913-917.
- 83 Van der Valk F, Wester PG. 1991. Determination of Toxaphene in fish from the northern Europe. *Chemosphere* 22: 57-66.
- 84 Muir DCG, Wageman R, Grift NP, Norstrom RJ, Simon M, Lien J. 1988. Organochlorine chemical and heavy metal contaminants in white-baked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*) and pilot whales (*Globicephala malaene*) from the coast of Newfoundland, Canada. *Arch Environ Cont Toxicol* 17: 613-629.
- 85 Maruya KA, Lee RF. 1998. Aroclor 1268 and Toxaphene in fish from southeastern U.S. estuary. *Environ Sci Technol* 32: 1069-1075.
- 86 Vetter W, Krock B, Luckas B. 1997. Congener specific determination of compounds of technical Toxaphene (CTTs) in different Antarctic seal species. *Chromatographia* 44: 65-73.
- 87 Ribick MA, Dubay GR, Petty JD, Stalling DL, Schmitt CJ. 1982. Toxaphene residues in fish: identification, quantification, and confirmation at part per billion levels. *Environ Sci Technol* 16: 310-318.
- 88 Cleemann M, Riget F, Paulsen GB, de Boer J, Klungsoyr J, Aastrup P. 2000. Organochlorines in Greenland lake sediments and landlocked char (*Salvelinus alpinus*). *Sci Total Environ* 245: 173-185.
- 89 Hackenberg R, Looser R, Froescheis O, Ballschmitter K. 2002. Trends of POPs in biota of the Atlantic ocean – samples of 1981/82 reanalyzed and characterized with GC/ECD, GC/EI-MSD and GC/NCI-MSD. *Organohalogen Compd* 56: 495-498.
- 90 Skopp S, Fürst P, Oehme M. 2002. Enantiomer ratios, patterns and levels of Toxaphene congeners in human milk from Germany. *J Environ Monit* 389-394.
- 91 Witt K, Niessen KH. 2000. Toxaphenes and chlorinated Naphthalenes in adipose tissue of children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 164-169.
- 92 Klobes U. 1998. Isolierung und Strukturaufklärung von 2-endo,3-exo,5-endo, 6-exo,8,8,9,10-Octachlorbornan und Dokumentation der Umweltrelevanz dieses persistenten Toxaphenkongeners. *Dissertation*. Universität Jena.

- 93 Pearson RF, Swackhamer DL, Eisenreich SJ, Long DTL. 1997. Concentrations, accumulations, and Inventories of Toxaphene in sediments of the Great Lakes. *Environ Sci Technol* 31: 3523-3529.
- 94 Rose NL, Backus S, Karlsson H, Muir DCG. 2001. An historical record of Toxaphene and its congenere in a remote lake in Western Europe. *Environ Sci Technol* 35: 1312-1319.
- 95 Parr JF, Smith S. 1976. Degradation of Toxaphene in selected anaerobic soil environments. *Soil Sci* 121: 52-57.
- 96 Fingerling G. 1995. Umwandlung von isolierten Toxaphenkomponenten unter abiotischen und biotischen Bedingungen. *Dissertation*. Universität Kassel.
- 97 Mirsatari S, McChesney M, Craigmill A, Winterlin W, Seiber J. 1987. Anaerobic microbial dechlorination: An approach to on-site treatment of Toxaphene contaminated soil. *J Environ Sci Health* 22: 663-690.
- 98 Murthy NBK, Lushy WL, Liver JE, Kearney PC. 1984. Degradation of Toxaphene fractions in anaerobic soil. *J Nuclear Agric Biol* 13: 16-17.
- 99 Bunge M, Lechner U. 2001. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from contaminated sediments: Diversity of the halogenating community. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 15, Anaerobic dehalogenation, Technische Universität Berlin, 69-82.
- 100 Adrian L. 2001. Characterization of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 15, Anaerobic dehalogenation, Technische Universität Berlin, 43-52.
- 101 Neumann A, Scholz-Muramatsu H, Diekert G. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 162: 295-301.
- 102 Master ER, Lai VWM, Kuipers B, Cullen WR, Mohn WW. 2002. Sequential anaerobic-aerobic treatment of soil contaminated with weathered Aroclor 1260. *Environ Sci Technol* 36: 100-103.
- 103 Corona-Cruz A, Gold-Bouchot G, Gutierrez-Rojas M, Monroy-Hermosillo O, Favela E. 1999. Anaerobic-aerobic biodegradation of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) in soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 63: 219-225.
- 104 Fingerling GM, Parlar H. 1997. Spectroscopic characterization of 7b,8c,9c-Trichlorocamphene-2-one formed from Toxaphene components in an anaerobic soil. *J Agric Food Chem* 45: 4116-4121.
- 105 Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2001. Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 151 ff, 779f.
- 106 Wohlfarth G, Diekert G. 1997. Anaerobic dehalogenases. *Curr Opin Biotechnol* 8: 290-295.
- 107 Siebert A. 2002. Norpseudovitamin B<sub>12</sub>: ein neuartiger Corrinoid-Cofaktor aus der reduktiven PCE-Dehalogenase von *Dehalospirillum multivorans*. *Dissertation*. Universität Jena.
- 108 DeWeerd KA, Mandelco L, Tanner RS, Woese CT, Suflita JM. 1990. *Desulfomonile tiedjei*, new genus new species, a novel anaerobic dehalogenating, sulfate reducing bacterium. *Arch Microbiol* 154: 23-30.
- 109 Christiansen N, Ahring BK. 1996. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic reductively dechlorinating bacterium. *Int J Syst Bact* 46: 442-448.
- 110 Scholz-Muramatsu H, Neumann A, Meßmer M, Moore E, Diekert G. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 163: 48-56.
- 111 von Neumann A. zur Verfügung gestellt. 2001.

- 112 Neumann A, Siebert A, Trescher T, Reinhard S, Wohlfarth G, Diekert G. 2002. Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and the corrinoid cofactor. *Arch Microbiol* 177: 420-426.
- 113 Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G. 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J Biol Chem* 271: 16515-16519.
- 114 Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G. 1998. Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *E. coli*. *J Bacteriol* 180: 4140-4145.
- 115 Schanke CA, Wackett LP. 1992. Environmental reductive elimination reactions of polychlorinated ethanes mimicked by transition-metal coenzymes. *Environ Sci Technol* 26: 830-833.
- 116 Friedrich W. 1975 Vitamin B<sub>12</sub> und verwandte Corrinoid. Bd. III/2. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 117 Schumacher W, Holliger C, Zehnder AJB, Hagen WR. 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Letters* 409: 421-425.
- 118 Miller E, Wohlfarth G, Diekert G. 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch Microbiol* 169: 497-502.
- 119 Roche Lexikon Medizin. 1999. Urban & Fischer Verlag München.
- 120 [www.bvet.admin.ch/info-service/d/publikationen/magazin/2002/3/3\\_19-21.pdf](http://www.bvet.admin.ch/info-service/d/publikationen/magazin/2002/3/3_19-21.pdf)
- 121 Saleh MA, Casida JE. 1978. Reductive dechlorination of the Toxaphene compound 2,2,5-endo,6-exo,8,9,10-heptachlorobornane in various chemical, photochemical, and metabolic systems. *J Agric Food Chem* 26: 583-590.
- 122 Khalifa S, Holmstead RL, Casida JE. 1976. Toxaphene degradation by iron(II) protoporphyrin systems. *J Agric Food Chem* 24: 277-282.
- 123 Krone UE, Thauer RK, Hogenkamp HP. 1989. Reductive dehalogenation of chlorinated C1-hydrocarbons mediated by corrinoids. *Biochemistry* 28: 4908-4914.
- 124 Gantzer CJ, Wackett LP. 1991. Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition metal coenzymes. *Environ Sci Technol* 25: 715-722.
- 125 Glod G, Angst W, Holliger C, Schwarzenbach RP. 1997. Corrinoid-mediated reduction of tetrachloroethene, trichloroethene, and trichlorofluoroethene in homogenous aqueous solution: reaction kinetics and reaction mechanisms. *Environ Sci Technol* 31: 253-260.
- 126 Neumann A, Siebert A, Diekert G. 2001. Tetrachlorethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: Substrate specificity and properties of the corrinoid cofactor. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 15, Anaerobic dehalogenation, Technische Universität Berlin, 137-153.
- 127 Näser U. 2001. Untersuchung zur abiotischen reduktiven Dehalogenierung verschiedener halogenierter Substrate durch Corrinoid und verwandte Metallkomplexe. *Diplomarbeit*. Universität Jena.
- 128 Zehnder AJB, Wuhrmann K. 1976. Titanium(III)citrate as a nontoxic, oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* 194: 1165-1166.
- 129 Becker JG, Freedman DL. 1994. Use of Cyanocobalamin to enhance anaerobic biodegradation of Chloroform. *Environ Sci Technol* 28: 1942-1949.

- 130 Woods SL, Trobaugh DJ. 1999. Polychlorinated Biphenyl reductive dechlorination by Vitamin B<sub>12</sub>: thermodynamics and regioselectivity. *Environ Sci Technol* 33: 857-863.
- 131 de Geus HJ, Baycan-Keller R, Oehme M, de Boer J, Brinkman UATh. 1998. Determination of enantiomer ratios of bornane congeners in biological samples using heart-cut multidimensional gas chromatography. *J High Resol Chromatogr* 21: 39-46.
- 132 Skopp S. 2002. Isomer- and enantiomer-selective determination of Toxaphene in biota by quadrupole NICI-MS and ion trap EI-MS/MS. *Dissertation*. Universität Basel.
- 133 Vetter W, Oehme M, Luckas B. 1993. Mass spectrometric and gas chromatographic identification of the two main Toxaphene congeners present in marine mammals as minor constituents in the technical product. *Chemosphere* 27: 597-605.
- 134 Buser HR, Müller MD. 1994. Isomer- and enantiomer-selective analyses of Toxaphene components using chiral high-resolution gas chromatography and detection by mass spectrometry/mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 28: 119-128.
- 135 Buser HR, Oehme M, Vetter W, Luckas B. 1993. Partial structure elucidation of the most abundant octa and nonachloroToxaphene congeners in marine mammals by using conventional electron ionization mass spectrometry and mass spectrometry/mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 347: 502-512.
- 136 Skopp S, Oehme M, Chu FL, Yeboah F, Chan HM. 2002. Analysis of "total Toxaphene" and selected single congeners in biota by ion trap HRGC-EI-MS/MS using congener optimised parent ion dissociations. *Environ Sci Technol* 36: 2729-2735.
- 137 Chan HM, Zhu J, Yeboah F. 1998. Determination of Toxaphene in biological samples using high resolution GC coupled with ion trap MS/MS. *Chemosphere* 36: 2135-2148.
- 138 Skoog DA, Leary JJ. 1996. *Instrumentelle Analytik*. Springer Verlag Berlin. 455 ff.
- 139 Vetter W. 1993. Zur Isolierung und Charakterisierung von Einzelstandards für die Bestimmung von Rückständen polychlorierter Multikomponentengemische. *Dissertation*. Universität Hohenheim.
- 140 Zell M, Ballschmitter K. 1980. Baseline studies in of global pollution. II. Global occurrence of hexachlorobenzene (HCB) and polychlorocamphenes (PCC) in biological samples. *Fresenius Z Anal Chem* 300: 387-402.
- 141 Hainzl D, Burhenne J, Barlas H, Parlar H. 1995. Spectroscopic characterization of environmentally relevant C<sub>10</sub>-chloroterpenes from a photochemically modified Toxaphene standard. *Fresenius J Anal Chem* 351: 271-285.
- 142 Wong CS, Lau F, Clark M, Mabury SA, Muir DCG. 2002. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) can eliminate chiral organochlorine compounds enantioselectively. *Environ Sci Technol* 36: 1257-1262.
- 143 Marquardt H, Schäfer G. (Hrsg) 1997. *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 58, 329 ff.
- 144 Kallenborn R, Oehme M, Vetter W, Parlar H. 1994. Enantiomer selective separation of Toxaphene congeners isolated from seal blubber and obtained by synthesis. *Chemosphere* 28: 89-98.
- 145 Blum W, Aichholz R. 1990. Gas chromatography enantiomer separation on *tert*-butyldimethylsilylated  $\beta$ -cyclodextrin diluted in PS-086. A simple method to

- prepare enantioselective glass capillary columns. *J High Resol Chromatogr* 13: 515-518.
- 146 Vetter W, Klobes U, Luckas B, Hottinger G. 1999. Use of 6-*O*-*tert*-butyldimethylsilylated  $\beta$ -cyclodextrins for the enantioseparation of chiral organochlorine compounds. *J Chromatogr A* 846: 375-381.
- 147 Ruppe S, Vetter W, Luckas B, Hottinger G. 2000. Application of well defined  $\beta$ -cyclodextrins for the enantioseparation of compounds of technical Toxaphene and further Organochlorines. *J Micro Sep* 12: 541-549.
- 148 Vetter W, Scholz E, Luckas B, Maruya KA. 2001. Structure of a persistent Heptachlorobornane in Toxaphene (B7-1000) agrees with molecular model predictions. *J Agric Food Chem* 49: 759-765.
- 149 Weichbrodt M. 2000. Anwendung der mikrowellenunterstützten Extraktion in Kombination mit der Gelpermeationschromatographie bei der Bestimmung von Organochlorverbindungen in fetthaltigen Matrices. *Dissertation*. Universität Jena.
- 150 Krock B, Vetter W, Luckas B. 1997. PCB/Toxaphene group separation on silica prior to congener specific determination of Toxaphene residues in fish and other samples by GC/ECD. *Chemosphere* 35: 1519-1530.
- 151 Marvin CH, Charlton MN, Stern GA, Braekevelt E, Reiner EJ, Painter S. 2003. Spatial and Temporal Trends in Sediment Contamination in Lake Ontario. *J Great Lakes Research*, in press.
- 152 Marvin CH, Stern GA, Reiner EJ, MacPherson K, Kolic T, Braekevelt E, Painter S. 2002. Spatial and temporal trends in persistent organic pollutants in lake Ontario sediments. *Organohalogen Compd* 56: 453-456.
- 153 Norstrom RJ, Simon M, Muir DCG, Schweinsburg RE. 1988. Organochlorine contaminants in arctic marine food chains: Identification, geographical distribution, and temporal trends in Polar Bears. *Environ Sci Technol* 22: 1063-1071.
- 154 Muir DCG, Omlechenko A, Grift NP, Savoie DA, Lockhart WL, Wilkinson P, Brunskill GJ. 1996. Spatial trends and historical deposition of polychlorinated Biphenyls in canadian midlatitude and arctic lake sediments. *Environ Sci Technol* 30: 3609-3617.
- 155 Evans MS, Bourbonniere R, Muir D, Lockhart L, Wilkinson P, Billeck B. 1996. Organic contaminants in sediments and sedimentation rates in the West Basin of Great Slave Lake: August 1993 and March 1994 investigations. *Northern River Basins Study and the Department of Indian and Northern Affairs, Water Ressource Program, Yellowknife*.
- 156 Marvin CH. persönliche Mitteilung Januar 2003.
- 157 Auel H, Harjes M, Da Rocha R, Stübing D, Hagen W. 2002: Lipid biomarkers indicate different ecological niches and trophic relationships of the Arctic hyperiid amphipods *Themisto abyssorum* and *T. libellula*. *Polar Biol* 25: 374-383.
- 158 Bartha R, Vetter W, Luckas B. 1997. Optimized pressure-pulse-splitless injection and electron-capture, negative ionization detection for the congener specific determination of compounds of technical Toxaphene. *Fresenius J Anal Chem* 358: 812-817.
- 159 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, Vol 3, A1*. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- 160 Neumann A. 2001. unveröffentlichte Ergebnisse.
- 161 Vetter W, Luckas B. 1995. Synthesis, isolation and chromatography of perdeuterated  $\alpha$ -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane. *J High Resol Chromatogr* 18: 643-646.

- 162 Vetter W, Luckas B. 1999. Application of perdeuterated  $\alpha$ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane as internal standard for monitoring the recovery of  $\alpha$ -HCH in sample concentration steps. *Fresenius Environ Bull* 8: 7-13.
- 163 LGC Promochem Katalog 2002/2003.
- 164 Neumann A. persönliche Mitteilung Januar 2003.
- 165 Stern GA, Loewen MD, Miskimmin BM, Muir DCG, Westmore JB. 1996. Characterization of two major Toxaphene components in treated lake sediment. *Environ Sci Technol* 20: 2251-2258.
- 166 Vetter W, Kirchberg D. 2001. Production of Toxaphene enantiomers by enantioselective HPLC after isolation of the compounds from an anaerobically degraded technical mixture. *Environ Sci Technol* 35: 960-965.
- 167 Nikiforov VA, Karavan VS, Miltsov SA. Relative retention times of 122 polychloroterpenes. *Organohalogen Compd* 50: 268-270.
- 168 Vetter W, Luckas B. 2000. Enantioselective determination of persistent and partly degradable Toxaphene congeners in high trophic level biota. *Chemosphere* 41: 499-506.
- 169 Vetter W, Klobes U, Krock B, Luckas B. 1997. Congener-specific separation of compounds of technical Toxaphene on a nonpolar CP-Sil 2 phase. *J Micro Sep* 9: 29-36.
- 170 Vetter W, Krock B, Luckas B. 1999. GC/MS analysis of 5-*exo*,6-*exo*,8,10-tetrachlorodihydrocamphene and an unsaturated heptachloro compound isolated from Melipax. *Fresenius Environ Bull* 8: 654-661.
- 171 Vetter W. 2001. Enantioselective fate of chiral chlorinated hydrocarbons and their metabolites in environmental samples. *Food Reviews Int* 71: 113-182.
- 172 Klobes U, Vetter W, Luckas B, Hottinger G. 1998. Enantioseparation of compounds of technical Toxaphene (CTTs) on 35 % heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin diluted in OV1701. *Chromatographia* 47: 565-569.
- 173 Karlsson H, Muir DCG, Strachan W, Backus S, De Vault D, Whittle DM. 1999. Enantiomer ratios of Toxaphene in abiotic and biological samples from Lake Superior. *Organohalogen Compd* 41: 597-600.
- 174 Oehme M, Jaus A, Skopp S, Karlson H. 1998. Towards more reproducible separations of polychlorinated compounds with modified cyclodextrins: Necessary requirements and present status. *Organohalogen Compd* 35: 325-330.
- 175 Vetter W, Smalling K, Maruya KA. 2001. Interpreting nonracemic ratios of chiral organochlorines using naturally contaminated fish. *Environ Sci Technol* 35: 4444-4448.
- 176 Skopp S, Oehme M, Drenth H. 2002. Study of the enantioselective elimination of four Toxaphene congeners in rat after intravenous administration by high resolution gas chromatography negative ion mass spectrometry. *Chemosphere* 46: 1083-1090.
- 177 Vetter W, Bartha R, Stern G, Tomy G. 1999. Enantioselective determination of two persistent chlorobornane congeners in sediment from a Toxaphene-treated Yukon lake. *Environ Toxicol Chem* 18: 2775-2781.
- 178 Arnold WA, Winget P, Cramer CJ. 2002. Reductive dechlorination of 1,1,2,2-tetrachloroethane. *Environ Sci Technol* 36: 3536-3541.
- 179 Schneider AR, Stapelton HM, Cornwell J, Baker JE. 2001. Recent declines in PAH, PCB, and Toxaphene levels in the northern Great Lakes as determined from high resolution sediment cores. *Environ Sci Technol* 35: 3809-3815.
- 180 Hoekstra PF, O'Hara TM, Teixeira C, Backus S, Fisk AT, Muir DCG. 2002. Spatial trends and bioaccumulation of organochlorine pollutants in marine

- zooplankton from the Alaskan and Canadian Artic. *Environ Toxicol Chem* 21: 575-583.
- 181 Vetter W. 2002. persönliche Mitteilung.
- 182 Muir D. September 1999 Venedig. persönliche Mitteilung an Vetter W.
- 183 Nikiforov VA, Karavan VA, Miltsov SA. 1999. Composition of Camphechlor. *Organohalogen Compd* 41: 601-604.
- 184 Parlar H. 1988. Photoinduced reactions of two Toxaphene compounds in aqueous medium and adsorbed on silica gel. *Chemosphere* 17: 2141-2150.
- 185 Saleh MA, Turner WV, Casida JE. 1977. Polychlorobornane components of Toxaphene, structure toxicity relations and metabolic reductive dechlorination. *Science* 198: 1256-1258.
- 186 Anagnostopoulus ML, Parlar H. 1974. Isolierung, Identifizierung und Toxikologie einiger Toxaphenkomponenten. *Chemosphere* 3: 65-70.
- 187 Parlar H, Gäb S, Nitz S, Korte F. 1976. Zur Photochemie des Toxaphens: Reaktionen von chlorierten Bornanderivaten in Lösung und adsorbierten Kieselgel. *Chemosphere* 5: 333-338.
- 188 Vetter W, Klobes U, Krock B, Luckas B, Glotz D, Scherer G. 1997. Isolation, structure elucidation and identification of a further major Toxaphene compound in environmental samples. *Environ Sci Technol* 31: 3023-3028.
- 189 Chandurkar P, Matsumura F. 1979. Metabolism of toxicant B and toxicant C of Toxaphene in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 21: 539-547.
- 190 Hainzl D. 1994. Isolierung und Identifizierung von C<sub>10</sub>-Chlorterpenen aus dem Insektizid Toxaphen. *Dissertation*. GH Kassel.
- 191 Parlar H, Michna A, Korte F, Kotzias D. 1983. Ökochemische Bewertung des Insektizids Toxaphen. *Chemosphere* 12: 913-934 und 1443-1458.
- 192 Alder L, Palavinskas R, Nikiforov VA, Tribulovich VG. 1996. Relative response factors for Toxaphene components using different detectors. *Organohalogen Compd* 28: 423-428.
- 193 Koivisto JJ, Kolehmainen ET, Nikiforov VA, Nissinen MJ, Tuppurainen KA, Reräkylä M, Miltsov SA, Karavan VS. 2001. Syntheses, structures and spectroscopy of polychlorinated dihydrocamphenes. An experimental and theoretical study. *ARKIVOC* (iii): 95-113.
- 194 Landrum PF, Pollock G, Seiber J, Hope H, Swanson L. 1976. Toxaphene insecticide: Identification and toxicity of a dihydrocamphene component. *Chemosphere* 2: 63-69.
- 195 Tribulovich VG, Nikiforov VA, Bolshakov S. 1996. Isolation and structure elucidation of Polychlorodihydrocamphenes-potential constituents of Toxaphene residues. *Organohalogen Compd* 28: 385-388.

**ATab. 1** Chemische Namen von bekannten Chlorbornanen, -bornenen, -camphenen und dihydrocamphenen mit Angabe des Herstellers (H.) und Akronyme nach Parlar (Parl #) [77] und Andrews und Vetter (AV-Code) [64]

Nr.	Chemische Name (IUPAC) [58]	Parl #	AV-Code	Lit. <sup>b</sup>	H. <sup>c</sup>
<b>Bornane</b>					
1	2- <i>exo</i> ,10-Dichlorbornan		B2-20	38/73	
2	2- <i>exo</i> ,10,10-Trichlorbornan		B3-90	38/73	
3	2- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,8,9,10-Pentachlorbornan		B5-592	167	
4	2- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,9,9,10-Pentachlorbornan		B5-595	67	P
5	2,2,5- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,10,10-Hexachlorbornan		B6-255	67	
6	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorbornan		B6-627	67	
7	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10-Hexachlorbornan		B6-913	67	Eh, P
8	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorbornan		B6-923	73	Eh, P
9	2- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,9,9,10,10-Hexachlorbornan		B6-1119	167	
10	2- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorbornan		B6-1128	167	
11	2,2,5,5,8,9,10-Heptachlorbornan		B7-495	67	P
12	2,2,5,5,9,10,10-Heptachlorbornan	21	B7-499	141	Eh
13	2,2,5,5,10,10,10-Heptachlorbornan		B7-500	62	
14	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Heptachlorbornan	32	B7-515	33/70	Eh, P
15	2,2,5- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-560	62	
16	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,10-Heptachlorbornan		B7-1000	148	
17	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Heptachlorbornan		B7-1001	183	P
18	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,10,10-Heptachlorbornan		B7-1026	62	
19	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1059	62	P
20	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Heptachlorbornan		B7-1440	67	
21	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1450	62	P
22	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1453	72	
23	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1462	62	
24	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1474	67	P
25	2- <i>exo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,10,10-Heptachlorbornan		B7-1572	184	
26	2- <i>exo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1584	62	
27	2- <i>exo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,10,10-Heptachlorbornan		B7-1592	184	
28	2- <i>exo</i> ,5,5,8,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1712	62	
29	2- <i>exo</i> ,5,5,9,9,10,10-Heptachlorbornan		B7-1715	62	
30	2,2,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Octachlorbornan	39	B8-531	141	Eh, P
31	2,2,3- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorbornan		B8-614	67	
32	2,2,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Octachlorbornan		B8-733	183	
33	2,2,5,5,6- <i>endo</i> ,8,9,10-Octachlorbornan		B8-763	33	
34	2,2,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Octachlorbornan		B8-773	67	
35	2,2,5,5,8,9,10,10-Octachlorbornan	51	B8-786	67	Eh
36	2,2,5,5,9,9,10,10-Octachlorbornan	38	B8-789	141	Eh, P
37	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10-Octachlorbornan	42a	B8-806	185	Eh, P
38	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10-Octachlorbornan	42b	B8-809	185	Eh
39	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorbornan	49a	B8-810	13	P
40	2- <i>endo</i> ,3,3,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Octachlorbornan		B8-1058	186	
41	2- <i>endo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorbornan		B8-1252	187	

Nr.	Chemische Name (IUPAC) [58]	Parl #	AV-Code	Lit. <sup>b</sup>	H. <sup>c</sup>
42	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10-Octachlorbornan		B8-1412	188	
43	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,10,10-Octachlorbornan	26	B8-1413	29/60	Eh, P
44	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10,10-Octachlorbornan	40	B8-1414	62/141	Eh, P
45	2-endo,3-exo,5-exo,6-exo,8,9,10,10-Octachlorbornan		B8-1440	187	
46	2-endo,3-exo,6-exo,8,8,9,10,10-Octachlorbornan		B8-1471	67	P
47	2-exo,3,3,5-exo,6-endo,8,9,10-Octachlorbornan		B8-1735	167	
48	2-exo,3-endo,5-exo,8,9,9,10,10-Octachlorbornan	41	B8-1945	62/141	Eh, P
49	2-exo,3-exo,5,5,8,8,10,10-Octachlorbornan		B8-2075	62	
50	2-exo,3-exo,5,5,8,9,10,10-Octachlorbornan		B8-2078	189	
51	2-exo,3-exo,5,5,9,9,10,10-Octachlorbornan		B8-2081	167	
52	2-exo,5,5,8,9,9,10,10-Octachlorbornan	44	B8-2229	62/141	Eh, P
53	2,2,3-exo,5,5,8,9,10,10-Nonachlorbornan	58	B9-715	33/141	Eh, P
54	2,2,3-exo,5,5,9,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-718	62	P
55	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10-Nonachlorbornan		B9-739	190	
56	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,9,10-Nonachlorbornan		B9-742	141	
57	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-743	33	P
58	2,2,5,5,6-exo,8,9,9,10-Nonachlorbornan		B9-1011	141	
59	2,2,5,5,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-1022	73	
60	2,2,5,5,8,9,9,10,10-Nonachlorbornan	62	B9-1025	62/141	Eh, P
61	2,2,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan	56	B9-1046	141	Eh, P
62	2,2,5-endo,6-exo,8,9,9,10,10-Nonachlorbornan	59	B9-1049	141	Eh
63	2-endo,3,3,5-exo,6-exo,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-1327	186	
64	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan	50	B9-1679	60/61	Eh, P
65	2-endo,3-exo,5-exo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-1703	167	
66	2-exo,3,3,5-exo,6-endo,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-2006	183	P
67	2-exo,3,3,5-exo,6-endo,9,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-2009	183	P
68	2-exo,3-endo,5-exo,6-endo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-2200	73	
69	2-exo,3-endo,5-exo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan	63	B9-2206	62	Eh
70	2-exo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Nonachlorbornan		B9-2357	73	
71	2,2,3-exo,5,5,8,8,9,10,10-Decachlorbornan		B10-828	73	
72	2,2,3-exo,5,5,8,9,9,10,10-Decachlorbornan	70	B10-831	62/141	P
73	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,9,10,10-Decachlorbornan		B10-857	73	
74	2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,9,10,10-Decachlorbornan		B10-860	62/141	P
75	2,2,5,5,6-exo,8,8,9,10,10-Decachlorbornan		B10-1107	73	
76	2,2,5,5,6-exo,8,9,9,10,10-Decachlorbornan	69	B10-1110	62/141	Eh, P
77	2-endo,3,3,5-endo,6-endo,8,9,9,10,10-Decachlorbornan		B10-1361	186	
78	2-exo,3,3,5-exo,6-endo,8,9,9,10,10-Decachlorbornan		B10-1981	192	P
79	2-exo,3,3,5-exo,6-exo,8,9,9,10,10-Decachlorbornan		B10-1993	62	
<b>Bornadien</b>					
80	2,3,5,8,9,10-Hexachlorborna-2,5-dien			33	
<b>Bornene</b>					
81	3,6-exo,8,9,10-Pentachlorborn-2-en			167	
82	5-endo,6-exo,8,9,10-Pentachlorborn-2-en			167	
83	2,5-endo,6-exo,8,9,10-Hexachlorborn-2-en			33	
84	3,6,6,8,9,10-Hexachlorborn-2-en			33	

Nr.	Chemische Name (IUPAC) [58]	Parl #	AV-Code	Lit. <sup>b</sup>	H. <sup>c</sup>
85	2,6- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Hexachlorborn-2-en <sup>a</sup>			167	
86	5,5,9,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			67	P
87	2,5- <i>endo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en <sup>a</sup>			67	
88	3,5- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
89	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10-Hexachlorborn-2-en			167	
90	5,5,9,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
91	3,5- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
92	5,5,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
93	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorborn-2-en			167	
94	3,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
95	3,6- <i>endo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
96	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorborn-2-en			167	
97	2,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Hexachlorborn-2-en			167	
98	2,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Heptachlorborn-2-en <sup>a</sup>			167	
99	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10-Heptachlorborn-2-en			167	
100	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,9,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			167	
101	2,5,5,8,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			67	P
102	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			67	
103	5,5,8,9,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			67	
104	2,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10-Heptachlorborn-2-en			67	
105	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			67	
106	3,5- <i>exo</i> ,6,6,8,9,10-Heptachlorborn-2-en			33	
107	2,3,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Heptachlorborn-2-en			184	
108	3,5- <i>exo</i> ,6,6,8,9,10,10-Octachlorborn-2-en			167	
109	2,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorborn-2-en			167	
110	3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,9,10,10-Octachlorborn-2-en			67	P
111	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Octachlorborn-2-en			67	P
112	2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Octachlorborn-2-en				
113	2,5,5,8,9,9,10,10-Octachlorborn-2-en			67	
114	2,3,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorborn-2-en			191	
115	2,3,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Nonachlorborn-2-en			167	
116	2,3,6,6,8,8,9,10,10-Nonachlorborn-2-en			167	
<b>Dihydrocamphene</b>					
117	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,10,10-Pentachlordihydrocamphen			167	
118	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,10,10-Hexachlordihydrocamphen			193	P
119	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Hexachlordihydrocamphen			193	P
120	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlordihydrocamphen			194	
121	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6,6,8,10,10-Heptachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			67	
122	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,10,10-Heptachlordihydrocamphen			67	P
123	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Heptachlordihydrocamphen			193	P
124	3- <i>exo</i> ,5,5,8,9,10,10-Heptachlordihydrocamphen			195	
125	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,10,10-Heptachlordihydrocamphen			163	P
126	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Heptachlordihydrocamphen			193	
127	3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Heptachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			167	
128	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,8,10,10-Octachlordihydrocamphen			67	

Nr.	Chemische Name (IUPAC) [58]	Parl #	AV-Code	Lit. <sup>b</sup>	H. <sup>c</sup>
129	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlordihydrocamphen			193	P
130	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Octachlordihydrocamphen			195	
131	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6,6,8,9,10,10-Octachlordihydrocamphen			195	
132	3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Octachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			67	
132	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Octachlordihydrocamphen			195	
133	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Octachlordihydrocamphen			163	P
134	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6,6,8,8,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen			167	
135	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			67	
136	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			67	
137	3- <i>exo</i> ,5- <i>exo</i> ,6,6,8,9,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen			193	P
138	3- <i>exo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			163	P
139	3- <i>endo</i> ,5,5,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlordihydrocamphen <sup>a</sup>			67	
<b>Camphene</b>					
140	5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,10,10-Pentachlorcamphen			67	
141	5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Pentachlorcamphen			67	
142	5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorcamphen	11		141	Eh
143	5,5,6- <i>exo</i> ,8,10,10-Hexachlorcamphen			167	
144	5,5,6- <i>exo</i> ,9,10,10-Hexachlorcamphen			167	
145	5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,9,10-Hexachlorcamphen	12		141	Eh
146	5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,7,8,9,10-Hexachlorcamphen	15		141	Eh
147	5,5,6- <i>exo</i> -8,9,9,10-Heptachlorcamphen	25		141	Eh, P
147	5,5,6- <i>exo</i> ,9,9,10,10-Heptachlorcamphen			167	
148	5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Heptachlorcamphen			167	
149	5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Heptachlorcamphen			167	
150	5- <i>exo</i> ,6,6,8,9,9,10,10-Octachlorcamphen			167	
151	5,5,6- <i>exo</i> ,8,8,9,9,10-Octachlorcamphen	31		141	Eh, P
152	5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Octachlorcamphen			167	

<sup>a</sup> Alle Strukturelemente sind noch nicht endgültig bewiesen

<sup>b</sup> ausgewählte Literaturstelle, in der die Verbindung erwähnt wurde

<sup>c</sup> Eh: Dr. Ehrenstorfer, P: LGC Promochem

**ATab. 2** Relative Vergleich von dem verwendeten Melipax und Camphechlor anhand fünf „wichtiger“ CTTs

CTTs	Melipax	Camphechlor
B7-1001	0,36	0,33
B7-515	0,39	0,33
B8-806/B8-809	1*	1*
B8-2229	0,74	0,44
B9-1679	0,17	0,22

\* ECD-Signalstärke auf B8-806/B8-809  $\rightarrow$  1 normiert, vgl. **Kap. 3.1**

**ATab. 3** Abbau von B9-1679 mit einer Zellsuspension von *D. multivorans* (vgl. **Kap. 4.1.6** und **4.3.2.1**)

Probe- nahme	B9-1679 [ng] <sup>a</sup>	Zweite Zugabe <sup>a,b</sup> [ng]	B8-1414 <sup>a</sup>	B7-1001 <sup>a</sup>	Kontrolle <sup>c</sup>	$\alpha$ - PDHCH <sup>d</sup>
Start	77 $\pm$ 11	-	0,7 $\pm$ 0,2	-*	96 $\pm$ 2,4	73-85 %
4 Stunden <sup>c</sup>	28 $\pm$ 6,3	-	5 $\pm$ 0,9	-*	85 $\pm$ 7,1	86-96 %
1 Tag	16 $\pm$ 2,5	-	12 $\pm$ 1,6	1,1 $\pm$ 0,3	83 $\pm$ 3,2	68-92 %
7 Tagen <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 0,7	45 $\pm$ 3,3	7 $\pm$ 0,3	11 $\pm$ 0,4	79 $\pm$ 3,4	70-95 %

<sup>a</sup> Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung

<sup>b</sup> B9-1679 wurde erneut nach sechs Tagen zu laufenden Experimenten dotiert

\* < 0,1 ng

<sup>c</sup> Mittelwert der Doppelbestimmung

<sup>d</sup> Wiederfindung des IS  $\alpha$ -PDHCH

**ATab. 4** Quantifizierten CTTs des Melipax-Abbaus [ng], vgl. Kap. 4.2

CTT	Melipax	7 Tage	13 Tage	16 Tage
B6-923	210	96	170	190
B7-1453	62	13	3,2	2,4
B7-1001	34	64	88	150
B7-1473	26	4	0,3	0,08
B7-1450	430	74	14	6,4
B7-495/B7-515	540	58	< 0,01	< 0,01
B7-1474/B7-1440	150	26	4	1,6
B7-1059	300	58	14	8,8
B8-1413	240	33	2,4	< 0,01
B8-1412	280	38	2,3	1,6
B8-789	340	33	< 0,01	< 0,01
B8-531	490	70	6,4	< 0,01
B8-1414/B8-1945	140	22	2,4	< 0,01
B8-806/B8-809*	500	24	< 0,01	< 0,01
B8-2229	280	40	4,8	< 0,01
B8-810	620	64	2,4	< 0,01
B8-1471	960	130	< 0,01	< 0,01
B9-1679	320	45	4	< 0,01
B9-718	110	< 0,01	< 0,01	< 0,01
B9-743	460	28	< 0,01	< 0,01
B9-2006	220	14	< 0,01	< 0,01
B9-1046	560	< 0,01	< 0,01	< 0,01
B9-715	610	460	< 0,01	< 0,01
B9-1025	1440	96	22	< 0,01

\* B8-809 wurde anhand des Responsefaktors von B8-806 quantifiziert

**ATab. 5** *Strukturen und Retentionszeiten an fünf verschiedenen Säulen von in dieser Arbeit vorkommenden CTTs, die nicht in Abbauprozesse involviert waren, Fortsetzung der Tab. 16*

<b>Name<sup>a/</sup> AV- Code</b>	<b>IUPAC-Bezeichnung</b>	<b>DB -5</b>	<b>RRI<sup>b</sup></b>	<b>HP-5</b>	<b>β- BSCD (i)</b>	<b>CP- Sil2</b>	<b>CP- Sil8/ C18</b>
Hx-Ba1	unbekanntes Hexachlorbornan	16,1	0,4991	-*	-*	-*	-*
Pe-Ba3	unbekanntes Pentachlorbornan	16,5	0,5130	-*	-*	-*	-*
Hx-Be2	unbekanntes Hexachlorbornen	16,5	0,5130	-*	-*	-*	-*
Hx-Be2	unbekanntes Hexachlorbornen	16,5	0,5130	-*	-*	-*	-*
Pe-Ba4	unbekanntes Pentachlorbornan	17,3	0,5365	-*	-*	-*	-*
Hx-Be4	unbekanntes Hexachlorbornen	17,4	0,5397	-*	-*	-*	-*
Pe-Ba4	unbekanntes Pentachlorbornan	17,5	0,5418	-*	-*	-*	-*
Hx-Ba 6	unbekanntes Hexachlorbornan	17,5	0,5435	-*	-*	-*	-*
Pe-Ba6	unbekanntes Pentachlorbornan	18,2	0,5635	-*	-*	-*	-*
Hx-Be5	unbekanntes Hexachlorbornen	18,2	0,5645	-*	-*	-*	-*
Hx-Be6	unbekanntes Hexachlorbornen	18,5	0,5745	-*	-*	-*	-*
B7-1000	<i>2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,10-Heptachlorbornan</i>	-	-	12,2	21,8/22	31,9	33,5
Hx-Be7	unbekanntes Hexachlorbornen	20,1	0,6247	-*	-*	-*	-*
B8-1413	<i>2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8,8,10,10-Octachlorbornan</i>	21,2	0,6570	16,5	32,9/ 33,2	39,4	40,8
B7-1450	<i>2-exo,3-endo,5-exo,8,9,10,10</i>	22,1	0,6687	-*	-*	-*	-*
B7-515	<i>2,2,5-endo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan</i>	22,4	0,6948	18,0	40,9/ 41,1	41,5	42,3
B7-495	<i>2,2,5,5,8,9,10-Heptachlorbornan</i>	22,4	0,6948	-*	-*	-*	-*
B7-1474	<i>2-exo,3-endo,6-exo,8,9,10,10-Heptachlorbornan</i>	22,5	0,6987	-*	-*	-*	-*
B7-1440	<i>2-exo,3-endo,5-exo,6-exo,8,9,10-Heptachlorbornan</i>	22,5	0,6987	-*	-*	-*	-*
Hp-Ba2	unbekanntes Heptachlorbornen	23,1	0,7148	-*	-*	-*	-*
B7-1059	<i>2-endo,3-exo,6-exo,8,9,10,10-Heptachlorbornan</i>	24,3	0,7541	-*	-*	-*	-*
B8-789	<i>2,2,5,5,9,9,10,10-Octachlorbornan</i>	24,5	0,7587	-*	-*	-*	-*
B8-531	<i>2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8,9,10-Octachlorbornan</i>	25,0	0,7755	-*	-*	-*	-*
B8-1945	<i>2-exo,3-endo,5-exo,8,9,9,10,10-Octachlorbornan</i>	25,1	0,7783	20,2	42,4 42,8	45	45,8
B8-810	<i>2,2,5-endo,6-exo,8,9,10,10-Octachlorbornan</i>	27,3	0,8480	-*	-*	-*	-*

Name <sup>a</sup> / AV- Code	IUPAC-Bezeichnung	DB -5	RRI <sup>b</sup>	HP-5	$\beta$ - BSCD (i)	CP- Sil2	CP- Sil8/ C18
B9-718	2,2,3- <i>exo</i> ,5,5,9,9,10,10- Nonachlorbornan	28,4	0,8797	-*	-*	-*	-*
B8-1471	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10- Octachlorbornan	28,4	0,8802	-*	-*	-*	-*
B9-743	2,2,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Nonachlorbornan	30,0	0,9305	-*	-*	-*	-*
B9-2006	2- <i>exo</i> ,3,3,5- <i>exo</i> ,6- <i>endo</i> ,8,9,10,10- Nonachlorbornan	30,1	0,9330	-*	-*	-*	-*
B9-1046	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10- Nonachlorbornan	30,2	0,9358	-*	-*	-*	-*
B9-715	2,2,3- <i>exo</i> ,5,5,8,9,10,10- Nonachlorbornan	31,0	0,9479	-*	-*	-*	-*

<sup>a</sup> Hp-Ba – Heptachlor-, Hx-Ba – Hexachlor-, Pe-Ba – Pentachlorbornane; Hx-Be - Hexachlorbornene

<sup>b</sup> RRI von GC/ECNI-HRMS ausgestattet DB-5 Säule;  $RRI = t_r \text{ Verbindung} / t_r \text{ B9-1679}$

\* nicht bestimmt

**ATab. 6** Abbau des Toxaphenrückstandes (EE/Hx-Extrakt) von Skuaeiern (in Doppelbestimmung), vgl. Kap. 4.6.4

Probenahme	B8-1413 [ng]	B9-1679 [ng]	Oxychlordan [ng]	DDE [ng]	$\alpha$ -PDHCH [%]
Start	4,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3	3,3 ± 0,4	30 ± 4,4	79, 94
1 Tag	-*	0,1 ± 0,02	0,6 ± 0,24	5,7 ± 2	80, 92
4 Tagen	-*	-*	0,3 ± 0,09	3,9 ± 0,8	74, 85
7 Tagen	-*	-*	0,4 ± 0,01	3,5 ± 0,1	87, 90

\* < 0,1 ng

## *Danksagung*

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Walter Vetter für die interessante Themenstellung, die zahlreichen Diskussionen, Ermutigungen und für das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Bernd Luckas für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und die fortwährende Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Bei den Kolleginnen, Kollegen und Gastwissenschaftlern des Lehrbereiches Lebensmittelchemie Elke S., Marion, Doreen, Arntraut, Katrin, Jens, Alex, Christian, Elke J., Bernd, Jun, David, Maria, Elena, Jan und Christine möchte ich mich für zahlreiche Diskussionen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Prof. Dr. Gabriele Diekert danke ich für die Möglichkeit, mikrobiologische Arbeiten am Institut für Mikrobiologie durchzuführen. Besonderer Dank gilt Dr. Anke Neumann, die mit zahlreichen Ratschlägen und Tipps zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Weiterhin möchte ich Yvonne, Peggy, Anke, Roland, Torsten, Ulrike und Heidi für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima danken.

Den Mitarbeitern am Freshwater Institute, Winnipeg, Kanada danke ich für die gewährte Unterstützung, die großzügige Bereitstellung von Probenmaterial und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren möchte ich Chris Marvin für die zur Verfügung gestellten Ontario-See-Proben danken. Dr. Friedrich Gollmick danke ich für die  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen.

Dr. René Mascher möchte ich für die zahlreichen Diskussionen und das Korrekturlesen danken. Herzlich danke ich Tina für die moralische Unterstützung, Hinweise und Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit.

*Selbstständigkeitserklärung*

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

.....  
Steffen Ruppe

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Steffen Ruppe  
geboren am: 06.04.1975 in Erfurt

### **Schulbildung**

1981-1991 Regelschule Schloßvippach  
1991-1993 Gymnasium Sömmerda  
Abschluss Abitur

### **Studium und Promotion**

1994-1999 Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studium der Umweltchemie  
1999-2003 Doktorand an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für  
Ernährungswissenschaften, Lehrbereich Lebensmittelchemie  
2002 zweimonatiger Forschungsaufenthalt am Freshwater Institut,  
Winnipeg, Kanada

Jena, den 20. März 2003

.....  
Steffen Ruppe