# **Abschlussbericht**

# Forschungsprojekt zur Verbesserung des Abbaus von Textilabwässern in einem anaerob/aerob Reaktor zur Vorbehandlung von Abwasserkonzentraten

Projektleiter: Prof. Dr. Astrid Rehorek

Mitarbeiter: Dr. Alexander Plum,

M.Eng. Marion Senholdt, M.Eng. Barbara Gornacka,

Dipl.-Ing. Csilla Györgyicze, Dipl.-Ing Betül Yildiz,

Dipl.-Ing. Johannes Malov

Fachhochschule Köln

Fakultät für Anlagen-, Energie- und Maschinensysteme
Institut für Anlagen- und Verfahrenstechnik

Arbeitsgruppe Chemie, Chemische Verfahrens- und Prozessanalysentechnik

Betzdorfer Strasse 2

D-50679 Köln

März 2003 - April 2006

ISBN 3-00-019432-0 bzw. ISBN 978-3-00-019432-0

### Bibliographische Daten:

Rehorek, Astrid; Plum, Alexander; Senholdt, Marion; Gornacka, Barbara; Csilla Györgyicze; Betül Yildiz; Johannes Malov

Forschungsprojekt zur Verbesserung des Abbaus von Textilabwässern in einem anaerob/aeroben Reaktor zur Vorbehandlung von Abwasserkonzentraten

231 S., 279 L., 159 Abb., 47 Tab., Anhang

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2003 bis April 2006 im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsvorhabens mit dem Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen am Institut für Anlagen- und Verfahrenstechnik der Fakultät für Anlagen, Energie- und Maschinensysteme der Fachhochschule Köln (MUNLV: IV –9 –042 537) angefertigt. Die wissenschaftliche Durchführung des Projektes stand unter Leitung und Betreuung von Prof. Dr. A. Rehorek vom Institut für Anlagen- und Verfahrenstechnik der Fachhochschule Köln. Die meisten Ergebnisse der Arbeit wurden von Alexander Plum im Rahmen seiner Promotion, von Marion Senholdt, Barbara Gronacka und Betül Yildiz im Rahmen ihrer Masterthesen sowie von Johannes Malov im Rahmen seiner Diplomarbeit erzielt.

# Mit Genehmigung des MUNLV wurden bisher folgende Publikationen (Auswahl) zum Thema des Projektes veröffentlicht:

#### A. Rehorek, A. Plum, B. Gornacka:

CUTEC-Serial Publication No 68, Papierflieger Verlag, Clausthal-Zellerfeld (2006), Edt. Vogelpohl/ Sievers/Geißen, ISBN 3-89720-860-1, 310-313 Oxidative re-colourization effects on anaerobic azo dye reduction products

### A. Rehorek, A. Plum:

Anal. Bioanal. Chem., 384 (2006), 1123-1128.

Online LC-MS-MS process monitoring for optimization of biological treatment of wastewater containing azo dye concentrates

### A. Plum, A. Rehorek:

Journal of Chromatography A, 1084 (2005), 119-1333.

Strategies for continuous on-line High Performance Liquid Chromatography coupled with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry for process monitoring of sulphonated azo dyes and their intermediates in anaerobic-aerobic bioreactors

### A. Rehorek:

Labor Praxis, April 2005, 24-27. Unerwünschter Farbe auf der Spur

#### Vorwort:

Der Textilindustrie und insbesondere der Textilveredlungsindustrie werden aufgrund des hohen Verbrauchs von bis zu 120 Liter Wasser pro kg Textilfaser und des Anfalls von intensiv gefärbtem Abwasser ein hohes Potenzial an Umweltbelastungen zugeschrieben. Im Jahre 2000 trat deshalb in Deutschland eine neue gesetzliche Regelung für Abwasser und Konzentrate der Textilveredlungsindustrie in Kraft. Sie verlangt eine Vorbehandlung mit mindestens 95%iger Reduktion der Farbigkeit sowohl für Färbebäder als auch für Konzentrate von Prozesswasser Recycling Strömen. Gewünschte biologische Behandlungskonzepte sind wegen geringer Prozesskenntnis instabiler und Entfärbeleistungen insbesondere für relativ konzentrierte und salzbeladene Produktions- und Färbeabwässer noch nicht ausreichend etabliert.

Eine Erweiterung der Prozesskenntnis erfordert eine unverfälschte, substanzspezifische Untersuchung der anaerob-aeroben Entfärbemechanismen insbesondere für die weltweit am häufigsten eingesetzten Reaktiven Azo-Farbstoffe C.I. Reactive Black 5, C.I. Reactive Orange 16 und C.I. Reactive Orange 107 sowie ihre Intermediate und Abbauprodukte. Das macht die Entwicklung online-fähiger Prozessanalysensysteme zur qualitativen und semi-quantitativen Multikomponentenanalyse erforderlich. Ein solches System wurde unter Online-Reaktorkopplung mittels Bypass und mikrofilatrationsbasierter Probensammlung realisiert, verbunden mit einer quasi-kontinuierlichen Ionenpaar-chromatographischen Trennmethode mit Diodenarray-Detektion und einer ionenchromatographischen Kationen-Suppression zur parallelen Elektrospray-Ionisation mit Triple Quadropol massenspektrometrischer Detektion.

Die Strukturaufklärung autoxidationsempfindlicher Abbauprodukte von Reactive Black 5 sowie von Reaktive Orange 16 und 107 aus dem anaeroben Bioreaktor ermöglichte die Ableitung verschiedener Entfärbemechanismen von Azo-Farbstoffen und die Erklärung von Rückverfärbungseffekten von ortho-Hydroxylaminen. Durch Korrelation der stoffspezifischen HPLC-DAD und LC-MS/MS-Daten mit Summenparametern konnte eine Abhängigkeit der Entfärberate von Prozessparametern wie dem Redoxpotenzial nachgewiesen werden. Das ist die Basis für ein besseres Verständnis der biologischen Entfärbeprozesse und ihre Optimierung.

Mit dem angewendeten biologischen Verfahren konnten unter Einsatz des je 40-Liter anaerob/aeroben Bio-Membran-Reaktors unter abschließender Einbeziehung einer Ultrafiltration bei Einsatz von bis zu 8,5 g Farbstoffen pro Liter und einer Volumenbeladung von etwa 3 g Farbstoffen pro Liter und Tag Entfärberaten von 95% über mehrere Wochen und Monate erzielt werden. Dabei erfolgte eine Reduktion des chemischen Sauerstoffbedarfs um 80%.

Diese Entfärbeleistung konnte durch Prozess Design Verbesserungen erzielt werden, sowohl für künstlich beladene als auch für reale konzentrierte Abwasserchargen. Das betraf die Immobilisation der mikrobiologischen Schlammkultur auf Aktivkohle aktivierten Polyurethan-Schaum-Würfeln, die Kontrolle des anaeroben Redoxpotenzials durch katalytische Mediatorgaben an Methanol und die Installation einer finalen Ultrafiltration zur Rückhaltung von Rückverfärbungsprodukten bei unvollständiger anaerober Farbstoffreduktion.

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
2	ZIELSETZUNG	12
3	BIOLOGISCHE BEHANDLUNGSVERFAHREN FÜR TEXTILABWÄSSER	16
3.1	Gesetzlicher Hintergrund und Behandlungsbedarf	16
	Abwässer aus der Färbung mit Reaktivfarbstoffen	19
3.3	Toxizität azofarbstoffhaltiger Textilabwässer	21
3.4.2 3.4 3.4 3.4 3.4	Behandlungskonzepte zur Färbereiabwasserentfärbung.  Übersicht Stand der Technik Entfärbe- und Abbaumechanismen biologischer Verfahren 4.2.1 Adsorption	25 27 27 28 31
4	PROZESSANALYSENTECHNIK IN DER BIOTECHNOLOGIE	33
4.1	Online-Probenahmetechniken für flüssige Medien	34
4.2	Summenparameterprozessanalysatoren	35
4.3	Einzelkomponentenprozessanalysatoren	36
4.4.2	Mehrkomponentenprozessanalysatoren Prozessflüssigchromatographie Prozessmassenspektrometrie Multiprozessanalysatoren	36 38
5	PROZESSANALYTISCHE UND VERFAHRENSTECHNISCHE METHODENENTWICKLUNG	40
5.1	Chemikalien und Standards	40
5.2	UV-VIS-Messungen und CSB-Bestimmung	41
5.3	Untersuchte Farbstoffe und Abwässer	41
5.4.2	Online-HPLC-MS/MS-Analysenmethode	46 50

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

5	.4.3.1 .4.3.2 .4.3.3	Instrumentierung und Methoden zur Charakterisierung d. Ionensuppressors Kapazitätsbestimmungen des Suppressors für TBAAC Der Einfluss der Ionenzugabe zum Puffer auf die Gesamtleitfähigkeit vor und nach dem Suppressor	62 d 64
5	.4.3.4	Wechselwirkungen der Azofarbstoffe mit dem Suppressor unter Einfluss vor Puffer und pH-Wert	า 68
5	.4.3.5	Wechselwirkungen der Vor- und Abbauprodukte mit dem Suppressor unter Einfluss von Puffer und pH-Wert	
5.4.5	5 Kalibr	matographie an Umkehrphasen mit polarer Selektivität rierung Dioden Array Detektor - Elektrospray Massenspektrometerstheit des kontinuierlichen Online-Prozessanalysenverfahrens	84 87
5.5		hrenskonzept zur biologischen Entfärbung von azofarbstoffhaltigen	52
0.0		isserkonzentraten	96
5.5.	l Verfal	hrensbeschreibung	97
		technik und Datenaufnahme	
		mmstabilisierung und -immobilisierung	
5.5.4	1 Aerob	bes Verfahren mit nicht immobilisierten Mikroorganismen	102
6	ONLI	NE-MONITORING DES BIOLOGISCHEN ENTFÄRBUNGSVERFAHRENS .	104
6.1		suchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Black 5 enspektrometrische Identifizierung von Inhaltsstoffen in Abwasser	1 <b>04</b> und
0.1.		aktoren	
6		Reactive Black 5 und Synthesenebenprodukte	
		Haupt- und Nebenverbindungen aus der Hydrolyse	
		Anaerobe Abbauprodukte und Intermediate von Reactive Black 5	
6	11.1.5	Reaktionsprodukte im aeroben Bioreaktor	123
		Nicht vollständig identifizierte Intermediate	
		mmung der Farbstoffabbaukinetik im Step-Feed-Batch-Verfahren	
613	3 Monit	oring und Korrelation von Einzelstoffkonzentrationen mit Summenparame	tern
0.1.0		ontinuierlichem Betrieb	
6		Reactive Black 5 und Nebenfarbstoffe	
		Abbauprodukte der anaeroben Reduktion	
		Nicht farbige Farbstoffnebenkomponenten	
		Unbekannte Verbindungen	
		rbungsmechanismus und Abbauwege von Reactive Black 5	
6	.1.4.1	Entfärbungsmechanismen der anaeroben Reduktion	143
		Rückverfärbungsmechanismus durch Oxidation anaerober Reduktions-	
615	Ctoffo	produktepezifische Zuordnung der Restfarbigkeit	145
			140
O	. 1.3. 1	Zuordnung von UV-VIS-Spektren farbiger Verbindungen aus HPLC-DAD- Messungen	1/17
6	152	Stoffspezifische Zuordnung der UV-Absorption bei 270 nm	147
		Stoffspezifische Zuordnung der VV-Absorption bei 270 mm	
		eilung der Entfärbung von Abwasserkonzentraten nach Abwasserverordn	
0.1.0		ng 38	
617		pezifischen Abbaubarkeit von Abwasserinhaltsstoffen und Intermediaten	
		eich der Entfärbung von Modell- und Realtextilabwässern	
		pezifisches Monitoring	
5. i.c	1.9.1	Einfluss der Salzbelastung	158
		Abbauverhalten des Chemischen Sauerstoffbedarfs	
J		- Land Condition and Condition	. 50
6.2	Unter	suchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Orange 16	160
_		S-Identifizierung von Inhaltsstoffen des Abwassers, seinen Abbauprodukten	
		Zusammensetzung der kommerziellen Handelsware Reactive Orange 16	

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

6. 6.2.2 6.2.3 6.2.4 6. 6. 6. 6.2.5 6.2.5	2.1.2 Produkte der Hydrolyse von Reactive Orange 16 2.1.3 Anaerobe Abbauprodukte von Reactive Orange 16 2.1.4 Aerobe Abbauprodukte von Reactive Orange 16 2.1.6 Monitoring der Entfärbung und stoffspezifische Zuordnung der UV-VIS-Absorption Entwicklung der UV-VIS-Absorption im aeroben Reaktor  Massenspektrometrisches Monitoring der Einzelstoffe 2.4.1 Anaerobe Behandlung 2.4.2 Aerobe Behandlung 2.4.3 Anaerobe/Aerobe Abbaubarkeit der Intermediaten  Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffes Abbauleistung der anaeroben Reaktor mit nicht immobilisierten Bakterien  Abbaumechanismus von Reactive Orange 16	168 175 177 180 182 182 186 189 190
6.3.2 6.3.3 6. 6. 6.3.4	Untersuchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Orange 107 LC-MS-Identifizierung von Inhaltsstoffen des Farbstoffhydrolysates RO 107 Produkte der Hydrolyse von Reactive Orange 107 Monitoring der biologischen Behandlung von Reactive Orange 107 3.3.1 Anaerobe Behandlung 3.3.2 Aerobe Behandlung Farbigkeitsmonitoring der Entfärbung von Reactive Orange 107 im Batchversuch Abbaumechanismus von Reactive Orange 107	195 196 198 198 199 199
7	PROZESSANALYTISCH GESTÜTZTE VERFAHRENSOPTIMIERUNG	202
7.1	Steuerung des Redoxpotential zur effizienten anaeroben Azoreduktion	203
7.2	Membranauswahl zur Erhöhung der Verweildauer schwerabbaubarer Rückverfärbungsprodukte	204
8	ZUSAMMENFASSUNG	205
9	AUSBLICK	212
10	LITERATUR	213
11	ANHANG	228

# Abkürzungsverzeichnis

Abkuizuiig	Sverzeichins	
μTAS	Miniaturisierte Totale Analysensysteme	-
3ANDS	3-Aminonaphthalin-1,5-disulfon-säurediantriumsalz	-
4ADP	4-Aminodiphenyl,	
5AA8ANS	5-Acetylamino-8-amino-2-naphthalinsulfonsäure	-
ABSEESA	2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethoxy]-ethansulfonsäure	_
ABSESA	2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethansulfonsäure	_
A07	Acid Orange 7	_
AOPs	Advanced Oxidation Processes	_
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation	_
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation	_
AQ	HPLC-Saul Typ ProntoSIL AQ	_
BSB <sub>5</sub>	Biochemischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen	- mg L <sup>-1</sup>
CA		ilig L
	Chloranilin	-
CE	Kollisionsenergie (Collision Energy)	V
CE	Kapillare Elektrophorese	-
CEP	Kollisionszelleneintrittsspannung (Collision Cell Entrance	V
01110	Potential)	
CIMS	Chemische Ionisierungs Massenspektrometrie	- 1
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	G L <sup>-1</sup>
CXP	Kollisionszellenaustrittsspannung (Collision Cell Exit	V
	Potential)	
DAD	Dioden-Array-Detektor	-
DAN	1,4-Diaminonaphthalin	
DAS	Diaminophenylsulfon	
DB71	Direct Blue 71	-
DFZ	Durchsichtigkeitsfarbzahl	m <sup>-1</sup>
Di-RB5-H	Dimer RB5-Hydrolysat	-
DMPDA	N,N-Dimethylphenyldiamin	
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic	mg L <sup>-1</sup>
	Content)	•
DP	Entclusterungsspannung (Declustering Potential)	V
DPBA	Di-p-Base-Amin	_
DPBE	Di-p-Base-Ether	_
E <sub>0</sub>	Redoxpotential	mV
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration: 50-prozentige	mg L <sup>-1</sup>
50	Vermehrungshemmung bzw. gerade noch kein Effekt	9 =
EI	Elektronenstoßionisation	_
EP	Eintrittsspannung (Entrance Potential)	V
ES	Ethylensulfon	v
ESI	Elektrospray Ionisation	_
ETAD	Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs	_
LIAD	Manufacturing Industry	
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinucleotid	_
FIA	Flow Injection Analysis	_
FMNH <sub>2</sub>	Flavinadeninmononukleotid	-
FS	Chromophores System eines Farbstoffes	-
HPLC	·	-
	Hochleistungsflüssigchromatographie	-
HS	H-Säure	-
IC	Ionenchromatraphie bzw. Ionensuppressor	-
IP	Ionenpaarchromatographie	- 
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50: Dosis eines Wirkstoffes, die bei 50% der	mg kg <sup>-1</sup>
110D	behandelten Organismen den Tod verursacht.	
LLOD	Untere Grenze der Kalibriergerade (Lower Limit of	μM bzw.
	Quantification)	μg L <sup>-1</sup>

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung eines Molekülions	-
MeS	Metanilsäure	-
MF	Mikrofiltrationsbasierte Probenahme	-
MRM	Multiple Reaction Monitoring ( $m/z$ Q1 $\rightarrow m/z$ Q3)	-
MS/MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	_
MW	Molare Masse	G Mol
MWCO	Molekulare Trenngrenze (Molecular Weight Cut Off)	Da
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid reduzierte Form	_
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat reduzierte Form	_
NAPB	N-Aceytl-p-Base	_
N <sub>ges</sub>	Nitratstickstoff	mg L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> -N	Ammoniumstickstoff	mg L <sup>-1</sup>
NHD	HPLC-Säule Typ Nucleosil HD	-
NMR	Nuklear-Magnetische-Resonaz-Spektroskopie	_
NNDMPDA	N,N-Dimethylphenylendiamin	_
NO <sub>x</sub>	Anteil anorganischen gebundenen Stickstoffs	mg L <sup>-1</sup>
NSA	Naphthalinsulfonsäure	g _ -
NSDA	Naphthalindisulfonsäure	_
NWG	Nachweisgrenze	μM bzw.
	1105	μg L <sup>-1</sup>
os	Orthanilsäure	- -
PA3µ	ProntoSIL ace-EPS	_
PA5µ	HPLC-Säule Typ ProntoSIL ace-EPS	_
PB	p-Base (2-(4-Aminobenzensulfonyl)-ethanol)	_
PBSA	p-Base Sulfonester	_
PP	HPLC-Säule Typ ProntoSIL Phenyl	_
Q1	m/z des Transienten am ersten Quadrupol	amu
Q3	m/z des Transienten am dritten Quadrupol	amu
r²	Regressionskoeffizient	-
RB5-H	RB5-Hydrolysiert	_
RB5-H +DPBE	Reactive Black 5 mit p-Base Ether	_
RB5-H+SO <sub>2</sub>	RB5-Hydrolysat mit Ethylsulfonsäuregruppe	_
RB5-HO	Reactive Black 5 Teilhydrolysat-Teilorginal	_
RB5-H-PB	RB5-Hydrolysiert und teilreduziert	_
RB5-H-PB-2H	RB5-Hydrolysiert und teilreduziert-oxidiert	_
RB5-HV	Reactive Black 5 Teilvinyl-Teilhydrolysat	_
RB5-O	Reactive Black 5 Sulfonsäureester (Orginalform)	_
RB5-OV	Reactive Black 5 Teilorginal-Teilvinyl	_
RB-NH <sub>2</sub>	H-Säure sauer mit diazotierter p-Base gekuppelt	_
RB-OH	H-Säure basisch mit diazotierter p-Base gekuppelt	_
RM	Redoxmediator	-
RO107-H	RO107-Hydrolysat	_
RO16-H	RO16-Hydrolysat	_
RSD	Relative Standardabweichung	%
RT	Retentionszeit	min
SB	HPLC-Säule Typ LiChrospher 60, RP-select B	_
SH	HPLC-Säule Typ Synergi Hydro	-
SPBE	Sulfo-p-Base-Ester	-
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)	-
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction)	-
SR	HPLC-Säule Typ Chromolith SpeedROD	-
SS	Sulfanilsäure	-
SS	HPLC-Säule Typ Symmetry Shield	-
TAHNDS	3,5,6-Triamino-4-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure	-
TAHNDS <sub>DP1</sub>	6-Amino-5-hydroxy-3,4-diimino-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-	-
5/ 1	disulfonsäure	

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

TAHNDS <sub>DP2</sub>	4,6-Dihydroxy-3,5-diimino-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure	-
TAHNDS <sub>DP3</sub>	5,6-Dihydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure	-
TAHNDS <sub>DP4</sub>	4,6-Dihydroxy-3,5-dioxo-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure bzw. 5,6-Dihydroxy-3,4-dioxo-3,4-dihydronaphthalin-2,7-disulfonsäure	-
TAS	Totale Analysensysteme	-
TN	Totaler Stickstoffgehalt	mg L <sup>-1</sup>
TOC	Totaler Kohlenstoffgehalt	g L <sup>-1</sup>
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer	-
TS	Trockensubstanz	g L <sup>-1</sup>
UF	Ultrafiltration	-
ULOD	Obere Grenze der Kalibriergerade (Upper Limit of Quantification)	μM bzw μg L <sup>-1</sup>
UV-VIS	Ultraviolett-Spektroskopie und Spektroskopie im Sichtbaren	-
VOC	Anteil flüchtiger organischen Verbindungen (Volatile Organic Content)	mg L <sup>-1</sup>
VPB	Vinyl-p-Base	_
WL	Wellenlänge	nm
Υ	Raumbelastung	$mM L^{-1} d^{-1}$
ZE	HPLC-Säule Typ ZORBAX Eclipse XDB-C8	-

# 1 Einleitung

Der Verbrauch von Textilfarbstoffen wird Ende der 90iger Jahre weltweit auf etwa 305000 Tonnen pro Jahr beziffert, wobei der größte Anteil der Textilfarbstoffproduktion mit 31 % auf Reaktivfarbstoffe entfällt [1]. Die Gruppe der Azofarbstoffe umfasst ca. 8000 unterschiedliche Farbstoffe. 80 % der Reaktivfarbstoffe werden den Azofarbstoffen zugerechnet. Viele Reaktivfarbstoffe, wie C. I. Reactive Black 5 mit einer Produktionsmenge von 50000 Tonnen pro Jahr, zählen zu den "High Volume Produced Chemicals" [2], [3]. Neben dem Färben von Textilien werden Azofarbstoffe weltweit auch in Medikamenten, Lebensmitteln, Kosmetika und zum Drucken eingesetzt [4].

Die Textilindustrie und die ihr zugeordneten Zweige wie die Textilveredelungsindustrie gehören weltweit zu den abwasserintensivsten Industrien. Ihr fallen etwa 60% des Gesamtabwasseraufkommens der Textilindustrie zu [5], das jährlich in Deutschland einem Volumen von 70 Millionen m³ Abwasser entspricht [6]. Abwässer aus der Textilveredelungsindustrie besitzen aufgrund des Anteils an nicht fixierten Farbstoffen von bis zu 50 % des Färbefarbstoffes eine sehr hohe Farbigkeit sowie Salzgehalte von bis zu 80 g L<sup>-1</sup> [6]-[8].

In Deutschland ist die Textilveredelungsindustrie seit Mai 2000, bedingt durch eine Verschärfung der Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer dazu veranlasst, vor der Einleitung eine Entfärbung der Abwässer zu gewährleisten. Sie fordert bei Rest-Farbklotzflotten und Rest-Druckpasten eine mindestens 95 %ige Entfärbung für die Indirekteinleitung in Kläranlagen und setzt bei behandelten Abwasserströmen zur Einleitung in den Vorfluter Grenzwerte für die spektrale Absorptionskoeffizienten, die einer nahezu 100 %igen Entfärbung entsprechen [9], [10]. Der prozentual sehr hohe Anteil des von deutschen Textilfärbereien in öffentliche Abwasserbehandlungsanlagen eingeleiteten Abwassers deutet darauf hin, dass ein Großteil dieser Einleiter über keine oder nur geringe Abwasserbehandlungskapazitäten verfügt [5]-[6].

Auch bei Membranverfahren zum Prozesswasserrecycling fallen Abwasserkonzentrate an, die wie Rest-Farbklotzflotten einer 95%igen Entfärbung unterzogen werden müssen. Der Anfall von Abwasserkonzentraten aus dem Färbeprozess und aus im Rahmen von produktintegriertem Umweltschutz geschaffenen Wasserkreisläufen erfordert eine gesonderte Betrachtung von Strategien zu einer geeigneten Behandlung.

Die komplexe und wechselnde Zusammensetzung der Textilabwässer, die neben hohen Gehalten an Salzen und Farbstoffen noch diverse Textilhilfsmittel und -auswaschungen enthalten, ist neben der biologischen Resistenz der Farbstoffe das größte Problem bei der Auslegung von biologischen Verfahren zur Entfärbung und Mineralisierung. Chemische und physiko-chemische Verfahren, die eine vollständige Entfärbung und Mineralisierung der Textilabwasserinhaltsstoffe leisten, sind aus ökonomischer Sicht oft nicht rentabel [11].

Die Entwicklung biologischer Behandlungskonzepte stützt sich auf die Kombination von anaeroben und aeroben Verfahren. In der anaerobe Stufe werden die Farbstoffe bzw. die chromophoren Gruppen wie die Azobindung reduktiv gespalten. Dabei wird eine partielle Entfärbung herbeigeführt. Die nachfolgende aerobe Behandlung hat eine weitere Entfärbung und Teilmineralisierung zur Aufgabe. Oxidative Rückverfärbungsreaktionen von anaeroben Abbauprodukten in der aeroben Stufe erschweren die Totalentfärbung mittels biologischer Verfahren [9], [10]. Im Labor- und Industriemaßstab können wenig belastete Textilabwässern mit biologischen Behandlungsverfahren zwischen 60% bis 95% entfärbt werden [11]-[15]. Bei der indirekten Einleitung von Konzentraten in kommunale Kläranlagen werden häufig Überschreitung der gesetzlichen Farbigkeitsgrenzwerte am Ablauf beobachtet [16]. Über die chemische Zusammensetzung der in den Vorfluter eingeleiteten behandelten Abwässer ist wenig bekannt.

Zur Beurteilung der Entfärbeleistung und der verfahrenstechnischen Kontrolle der industriell eingesetzten biologischen Verfahren werden bisher ausschließlich die gesetzlich

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

vorgeschriebenen Summenparameter des spektralen Absorptionskoeffizienten herangezogen. Eine stoffspezifische Beurteilung der Abbau- bzw. Entfärbeleistung des Behandlungsverfahrens sowie die detaillierte Untersuchung der Abbaumechanismen sind damit nicht möglich. So wird die verbleibende Restfarbigkeit häufig "nicht abgebauten" Farbstoffen zugeordnet oder nicht weiter geklärt.

Für die verfahrenstechnische Optimierung biologischer Entfärbe- und Abbauprozesse wäre es erforderlich, detaillierte Kenntnisse über die Mechanismen der anaeroben Reduktion der Azobindungen und die stoffspezifische Abbaubarkeit der entstandenen Intermediate zu ermitteln. Bislang werden die erforderlichen Online-Prozessanalysenverfahren in industriellen und kommunalen Kläranlagen im Bereich der Messung von Summenparametern wie pH-Wert oder Totalem Kohlenstoffgehalt (TOC) eingesetzt. Substanzspezifische Online-Messungen sind erst im Bereich umweltrelevanter Anionen und Kationen wie Ammonium etabliert [17]-[20].

# 2 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung und Anwendung einer kontinuierlichen Online-Mehrkomponentenanalytik zum Prozessmonitoring eines anaerob-aeroben Verfahrens in einem Bio-Membran-Reaktor, der zur Entfärbung von azofarbstoffhaltigen Konzentraten eingesetzt werden soll. Mit Hilfe des stoffspezifischen Prozessmonitorings sollte das entwickelte kontinuierliche biologische Verfahren optimiert werden, um die gesetzlichen Anforderung einer mindestens 95 %iger Entfärbung an farbstoffhaltige Abwasserkonzentrate zu erzielen und um genauere Kenntnisse über den Entfärbe- und Abbaumechanismus zu gewinnen. Die Entfärbung sollte an Modell- und Realabwasserkonzentraten untersucht werden.

Gemäß Kapitel 4.1 des Antrages lassen sich 5 Projektschwerpunkte definieren:

- 1. Schritt: Aufbau und Inbetriebnahme eines zweistufigen Technikumsreaktors zum Einsatz anaeroben und aeroben Schlammes zur Farbabwasserbehandlung
- 2. Schritt: Erstellung von Verfahren zur Gewinnung feststofffreier Reaktorflüssigkeit aus den Konzentraten mittels Cross-Flow-Membranmikrofiltration und Inline-Filtrationssonden, Kontrolle mittels Online-HPLC-DAD
- 3. Schritt: Versuche zur Beladung des Bioreaktors mit Farbstoffkonzentraten (1 10 mmol/L) ausgewählter Azofarbstoffe, Immobilisierung des Schlammes zur Erhöhung der Abbauleistung und Erleichterung der Filtratgewinnung
- 4. Schritt: Entwicklung einer für die Prozesssteuerung geeigneten reaktorgekoppelten Online-Analytik für Azofarbstoffe und deren Reaktionsprodukte, Kopplung von Bioreaktor und HPLC in der Weise, dass auch MS-Kopplung realisiert wird (MF-LC-IC-MS<sup>n</sup>)
- 5. Schritt: Optimierung des Behandlungsprozesses anhand von HPLC- und MS-Daten:
  - a) Variation der Beladung mit ausgewählten Farbstoffen in ansteigenden Konzentrationen und aus realer Textilabwassermatrix
  - Optimierung der Abbauleistung der anaeroben Reduktionsstufe durch Variation des Redoxpotentials und unter Stimulation von Sulfobacter-Bakterien
  - c) Thermophile/mesophile anaerobe Prozessführung und ihre Optimierung bezüglich Verweilzeit, Co-Substratgabe und Langzeitstabilität
  - d) Optimierung der Stabilität der aeroben Reaktorstufe bezüglich Beladbarkeit mit Art und Menge der Produkte der anaeroben Stufe
  - Charakterisierung Reaktorprozesse hinsichtlich Abbauraten. e) der stofflicher Zusammensetzung. mechanistischer Ansätze und möalichem weiteren Verhalten Ablaufwässer der aus dem Reaktorsystem

Bei der Bearbeitung der Projektschwerpunkte konnten die Unterglieerung der Teilaufgaben weiter präzisiert werden und ist im folgenden fromuliert. Auf die entsprechenden Kapitel wird verwiesen.

- Zu Schritt 1: Aufbau und Inbetriebnahme eines zweistufigen Technikumsreaktors zum Einsatz anaeroben und aeroben Schlammes zur Farbabwasserbehandlung
  - Siehe 5.5 Verfahrenskonzept zur biologischen Entfärbung von azofarbstoffhaltigen Abwasserkonzentraten, ab Seite 96

- Zu 2. Schritt: Erstellung von Verfahren zur Gewinnung feststofffreier Reaktorflüssigkeit aus den Konzentraten mittels Cross-Flow-Membranmikrofiltration und Inline-Filtrationssonden, Kontrolle mittels Online-HPLC-DAD
  - 5.4.1 Membranbasierte Online-Probenahme, ab Seite 46
- Zu 3. Schritt: Versuche zur Beladung des Bioreaktors mit Farbstoffkonzentraten (1 10 mmol/L) ausgewählter Azofarbstoffe, Immobilisierung des Schlammes zur Erhöhung der Abbauleistung und Erleichterung der Filtratgewinnung
  - Siehe 6.1.2 Bestimmung der Farbstoffabbaukinetik im Step-Feed-Batch-Verfahren ab Seite 126
  - Siehe 6.1.6 Beurteilung der Entfärbung von Abwasserkonzentraten nach Abwasserverordnung Anhang 38, ab Seite 152
  - Siehe 6.1.8 Vergleich der Entfärbung von Modell- und Realtextilabwässern, ab Seite 156
- Zu 4. Schritt: Entwicklung einer für die Prozesssteuerung geeigneten reaktorgekoppelten Online-Analytik für Azofarbstoffe und deren Reaktionsprodukte, Kopplung von Bioreaktor und HPLC in der Weise, dass auch MS-Kopplung realisiert wird (MF-LC-IC-MS<sup>n</sup>)

Für die Entwicklung des Prozessanalysenverfahrens stand ein HPLC-System mit Dioden-Array-Detektor und ein Hybrid Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle zur Verfügung. Die Entwicklung des Online-Analysenverfahrens beinhaltete folgende Teilauf-gaben:

- Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode für die Kopplung mit LC-MS/MS zur Analyse nicht sulfonierter und sulfonierter aromatischer Amine sowie sulfonierter Reaktivazofarbstoffe
  - Siehe 5.4 Online-HPLC-MS/MS-Analysenmethode, ab Seite 42
- Massenspektrometrische Methodenentwicklung für die Online-Mehrkomponenten-analytik zur kontinuierlichen qualitativen und halbquantitativen Messung von Einzel-substanzen
  - Siehe 5.4.5 Kalibrierung Dioden Array Detektor Elektrospray Massenspektrometer, ab Seite 87
- Bestimmung Robustheit unter Einfluss von Matrixeffekten durch Salze anhand eines Referenzsubstanzgemisches
  - Siehe 5.4.6 Robustheit des kontinuierlichen Online-Prozessanalysenverfahrens, ab Seite 92
- Zu 5. Schritt: Optimierung des Behandlungsprozesses anhand von HPLC- und MS-Daten:
  - a) Variation der Beladung mit ausgewählten Farbstoffen in ansteigenden Konzentrationen und aus realer Textilabwassermatrix
    - Siehe 6 Online-Monitoring des biologischen Entfärbungsverfahrens, ab Seite 104
  - b) Optimierung der Abbauleistung der anaeroben Reduktionsstufe durch Variation des Redoxpotentials und unter Stimulation von Sulfobacter-Bakterien
    - Siehe 7 Prozessanalytisch gestützte Verfahrensoptimierung, ab Seite 202

- c) Thermophile/mesophile anaerobe Prozessführung und ihre Optimierung bezüglich Verweilzeit, Co-Substratgabe und Langzeitstabilität
  - Siehe 6.1.4.1 Entfärbungsmechanismen der anaeroben Reduktion, ab Seite 143
- d) Optimierung der Stabilität der aeroben Reaktorstufe bezüglich Beladbarkeit mit Art und Menge der Produkte der anaeroben Stufe
  - Siehe 6.1.4.2 Rückverfärbungsmechanismus durch Oxidation anaerober Reduktions-produkte, ab Seite 145
- e) Charakterisierung der Reaktorprozesse hinsichtlich Abbauraten, stofflicher Zusammensetzung, mechanistischer Ansätze und möglichem weiteren Verhalten der Ablaufwässer aus dem Reaktorsystem
  - Siehe 6.1.5, ab Seite 146 sowie
  - 6.1.6 Beurteilung der Entfärbung von Abwasserkonzentraten nach Abwasserverordnung Anhang 38, ab Seite 152
  - 6.1.7 Stoffspezifischen Abbaubarkeit von Abwasserinhaltsstoffen und Intermediaten, ab Seite 155

Exemplarisch für die Gruppe der Vinylsulfon-basierten Reaktivazofarbstoffe sollte in dieser Arbeit die Entfärbung des bei Reaktivfärbungen am häufigsten eingesetzten Farbstoffes C. I. Reactive Black 5 (nachfolgend Reactive Black 5) untersucht werden. Aufgrund der Vielzahl an Begleitstoffen und Abbauprodukten, die diesem Farbstoff zugeordnet werden, sollten mit Hilfe des Online-HPLC-DAD-MS/MS-Verfahrens strukturanalytische Untersuchungen zu deren Charakterisierung und Identifizierung durchgeführt werden (siehe Kapitel 6.1 ab Seite 104):

- Untersuchung der reaktivfarbstofftypischen Fragmentierungsmuster bei kollisions-induzierter Fragmentierung des hydrolysierten Reaktivfarbstoffes Reactive Black 5
- Methodenentwicklung zur Charakterisierung und Identifizierung von unbekannten Farbstoffnebenverbindungen und Abbauprodukten im anaeroben und aeroben Bioreaktor
- Bestimmung der strukturellen Zusammensetzung von Hydrolysaten des Reaktivfarbstoffes Reactive Black 5
- Charakterisierung und Identifizierung von Abbauprodukten des Reaktivfarbstoffes Reactive Black 5 im anaeroben und aeroben Bioreaktor

Da der Farbstoff Reactive Black 5 bei der Färbung oft in Kombination (als Trichromie, d.h. einer Mischung von drei Farbstoffen) mit anderen Reaktivfarbstoffen eingesetzt wird, sollte die Trichromie "Marineblau" bestehend aus den Farbstoffen Reactive Black 5, Reactive Orange 16 und Reactive Orange 107 untersucht werden. Die in der Trichromie eingesetzten Farbstoffe Reactive Orange 16 und Reactive Orange 107 wurden in den Kapiteln 6.2 (Reactive Orange 16 ab Seite 160) und Kapitel 6.3 (Reactive Orange 107 ab Seite 195) untersucht.

Zwei weitere Farbstoffe aus der Klasse der Säure- und Direktfarbstoffe (Acid Orange 5 und Direct Blue 171) sind als weitere Farbstoffe bei der Antragstellung zu dieser Arbeit aufgeführt worden. Bei der Untersuchung an realen Abwässern und der Rücksprache mit der Färberei WGF Colocton zeigte sich, dass beide Farbstoffe in der Anwendung keine abwasserrelevante Rolle spielen. Bei Farbstoffen dieser Klasse treten im Färbeprozess keine relevanten Verluste wie bei den Reaktivfarbstoffen auf, bei denen der Verlust durch

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Hydrolyse bei bis zu 50% der eingesetzten Menge liegen kann. Daher wurden die farbstoffbezogenen Untersuchungen in dieser Arbeit mit Schwerpunkt auf die mengenmäßig am meisten eingesetzten Reaktivfarbstoffe durchgeführt.

## Stoffspezifisches Prozess-Monitoring

Mit der Anwendung des entwickelten Online-Prozessanalysenverfahren sollte ein stoffspezifisches Monitoring der Abbauprozesse in anaeroben und aeroben Bioreaktoren ermöglicht werden. Die Schwerpunkte waren:

- Bestimmung der Entfärbekinetik des hydrolysierten Reaktiv Black 5 Farbstoffes
- Stoffspezifische Illustration der Entfärbungsschritte in Konzentrationsverläufen bei kontinuierlichem Betrieb unter Zugabe von Farbstoffkonzentraten
- Variation von Raumbelastung, hydraulischer Verweilzeit, Membraneinsatz und Co-Substratzugabe
- Korrelation von Einzelstoffkonzentrationsverläufen mit Summenparametern der anaeroben und aeroben Stufe
- Ableitung der Mechanismen und Abbauwege, die zu einer Entfärbung oder Rückverfärbung während der biologischen Behandlung führen
- Bestimmung der Entfärbungsleistung von Modellabwasserkonzentraten
- Vergleich der Entfärbung von Modellabwasserkonzentraten und Realtextilabwässern

# 3 Biologische Behandlungsverfahren für Textilabwässer

# 3.1 Gesetzlicher Hintergrund und Behandlungsbedarf

Aus abwassertechnischer Sicht lassen sich die Betriebe der Textilveredlungsindustrie in Deutschland in die zwei Gruppen einteilen: die Direkteinleiter und Indirekteinleiter. Direkteinleitende Betriebe verfügen zur Einhaltungen der gesetzlichen Einleitungsbedingungen über eine eigene Abwasseraufbereitung, indirekt einleitende Betriebe hingegen leiten ihr Abwasser in der Regel weitestgehend unbehandelt in kommunale Kläranlagen ein. In den alten Bundesländern sind über 95% der 300 Textilbetriebe Indirekteinleiter. 12 Betriebe sind als Direkteinleiter geführt.

Die Textilveredlungsindustrie ist nach der chemischen Industrie die abwasserintensivste und schadstoffemissionsintensivste Industrie in Deutschland [12]. Der produktionsspezifische Wasserbedarf liegt laut Textilveredlungsindustrie bei 120 L<sub>Wasser</sub> kg<sub>Ware</sub>-1. Anlass für die Entwicklung von Behandlungsverfahren zur Entfärbung farbstoffhaltiger Abwässer aus der Textilveredelungsindustrie ist durch das in Kraft treten der Novellierung der Abwasserverordnung im Anhang 38 für Textilherstellung und Textilverede-lung von 1984 im Jahr 2001 gegeben [9]. Die Veränderungen der Mindestanforderungen für die Direkteinleitung sind in Tabelle 1 dargestellt und beinhalten erstmals auch Anforderungen an die Farbigkeit der Abwässer. Der Anwendungsbereich dieser Verordnung umfasst zwei Bereiche der Textilveredlungsindustrie:

- Verarbeitung von Spinnstoffen und Garnen (Spinnerei, Weberei, Stickerei, Wirkerei, Herstellung von Vliesen und Filzen)
- Veredelung textiler Rohwaren durch Färben, Bedrucken, Ausrüsten und die jeweils erforderlichen Vorbehandlungen

Die Textilveredelung wird als Hauptverursacher von Abwasserproblemen der Textilindustrie angesehen. In den Hinweisen und Erläuterungen zur Novellierung des Anhangs 38 sind die Verursacher von Abwässern in der Textilveredlungsindustrie zur Wiederverwendung von behandeltem Abwasser und die Rückgewinnung von Wärmeenergie in das jeweilige innerbetriebliche Abwasserbehandlungskonzept angehalten. Die Maßnahmen dazu werden individuell am Ort des Anfalls entschieden. Optimale Einzelfalllösungen müssen unter Berücksichtigung der vorhandenen technischen und baulichen Gegebenheiten gefunden werden [10].

Tabelle 1: Anforderungen an das Abwasser für die Einleitungsstelle [9]

Qualifizierte Stichprobe oder 2-Stunden-Mischprobe		
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	160 (280*)	mg L <sup>-1</sup>
Biochemischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen (BSB <sub>5</sub> )	25 (40*)	mg L <sup>-1</sup>
Phosphor, gesamt	2	mg L <sup>-1</sup>
Ammoniumstickstoff (NH <sub>4</sub> -N)	10	mg L <sup>-1</sup>
Stickstoff <sub>gesamt</sub> als Summe von Ammonium-, Nitrit- und	20 (5*)	mg L <sup>-1</sup>
Nitratstickstoff (N <sub>ges</sub> )		
Sulfit	1	mg L <sup>-1</sup>
Fischgiftigkeit	5	$G_f$
Färbung: Spektraler Absorptionskoeffizient bei		
436 nm (Gelbbereich)	7	m <sup>-1</sup>
525 nm (Rotbereich)	5	m <sup>-1</sup>
620 nm (Blaubereich)	3	m <sup>-1</sup>

Die in geringen Mengen anfallenden Farbstoffansätze und Restflotten aus der Färbung enthalten in der Regel wesentlich höhere Schadstoffbelastungen als andere Teilströme und sind jetzt getrennt von dem übrigen, niedriger belasteten Abwasser zu erfassen. Bei Rest-Farbklotzflotten und Rest-Druckpasten sind geeignete Entfärbungsverfahren anzuwenden, die eine 95 %ige Reduktion der Färbung ermöglichen. CSB bzw. TOC sind nach Prüfung der Verhältnisse im Einzelfall um 80 % zu verringern. Für schwermetallhaltige Flotten ist eine gezielte Schwermetalleliminierung erforderlich. Zur Behandlung dieser hochbelasteten Restflotten werden insbesondere Membranverfahren (Ultrafiltration, Nanofiltration, Umkehrosmose) empfohlen. Die Möglichkeit zur Behandlung im Faulbehälter einer Kläranlage wird erwähnt [10].

Die historische Entwicklung des Baus von kommunalen Kläranlagen und die abwasserbezogenen Maßnahmen der Textilveredlungsindustrie sind miteinander verknüpft. Durch die Möglichkeit, ihre Abwässer in kommunale Kläranlagen einleiten zu dürfen (so genannten Indirekteinleitung), verfügen die meisten Betriebe der Textilveredlungsindustrie lediglich über Neutralisationsverfahren zur Behandlung der anfallenden Abwässer. Speziell im Bereich der Vorbehandlung von hochkonzentrierten Restflotten und Konzentraten aus dem Einsatz von Membrantechnologie im Rahmen innerbetrieblicher Abwasserbehandlungskonzepte fehlen kostengünstige Verfahren.

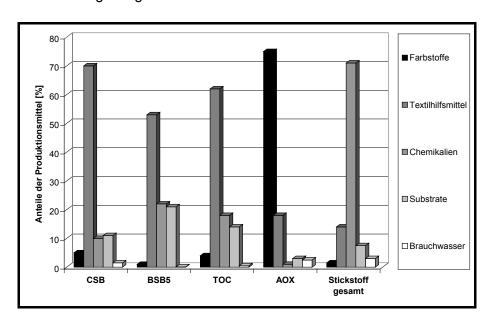


Abbildung 1: Quellen der Abwasserbelastung in der Textilveredelungsindustrie [24]

Die Inhaltsstoffe von Abwässern aus der Textilveredelungsindustrie werden in verschiedenen Übersichtsartikeln beschrieben [21]-[23]. Die Zusammensetzung der Produktionsabwässer aus der Textilveredelungsindustrie hängt von der saisonal bedingten Produktionspalette ab. Das Textilinstitut Denkendorf hat die durchschnittliche Abwasserbelastung in verschiedenen Betrieben untersucht. Aus Abwasseranalysen und Betriebsdaten (Farbstoffe, Textilhilfsmittel, Chemikalien, Substrate, Brauchwasser) wurden die Anteile der einzelnen Verursacher bestimmt (siehe Abbildung 1) [24]. Die organische Belastung (CSB, TOC) der Abwässer geht demnach hauptsächlich auf den Einsatz von Textilhilfsmitteln, von Chemikalien und von Substraten zurück. Farbstoffe haben einen Anteil von weniger als 5%. Die Gesamtstickstoffbelastung (Ammonium- und organischer Stickstoff) lässt sich auf den Einsatz von Chemikalien zurückführen. Zu 75% verursachen Farbstoffe den Gehalt an AOX im Abwasser. Ihr Anteil an der Farbigkeit ist 100%. 1997 verpflichtete sich die Textilveredelungsindustrie, nur noch solche Textilhilfsmittel zu verwenden, die ökologisch verträglich sind [26].

Die Entsorgung von Schlämmen aus der Fällung und Flockung ist seit 2005 durch die TA Siedlungsabfall neu geregelt und machen eine Vorbehandlung der Schlämme vor der Deponierung erforderlich. Der organische Anteil der zu deponierenden Schlämme muss demnach auf 3-5% reduziert werden [25]. Hiervon betroffen sind auch diejenigen Betriebe der Textilveredelungsindustrie, die Fällung und Flockung zur Farbstoffeliminierung einsetzten (siehe Kapitel 3.4).

# 3.2 Abwässer aus der Färbung mit Reaktivfarbstoffen

Zur Herstellung waschechter gefärbter Textilien fand bei Farbstoffherstellern die Bildung einer kovalenten chemischen Bindungen zwischen Substrat und Farbstoff großes Interesse. Die ersten Versuche gehen bis auf das Ende des 18. Jahrhunderts zurück. Der erste Reaktivfarbstoff wurde 1925 von J. Günther synthetisiert, als er Isatosäureanhydridverbindungen mit Celullose umsetzte und dabei die Reaktivfärbung erhielt. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit dieser Farbstoffe fanden sie keine praktische Anwendung.

Zu den technisch und kommerziell einsetzbaren Entdeckungen auf dem Gebiet der Reaktivfarbstoffe kam es in den fünfziger Jahren. 1956 brachte die Firma ICI unter dem Handelsnamen Procion-Farbstoffe die ersten Reaktivfarbstoffe auf den Markt. Es folgten 1957 Cibacron-Farbstoffe (CIBA) und Remazol-Farbstoffe (Hoechst). Die wesentlichen Entwicklungen der heute noch eingesetzten Reaktivfarbstoffe gehen auf den Zeitraum zwischen 1956-1963 zurück [27]. Einsatz finden sie hauptsächlich beim Färben und Bedrucken von Cellulosefasern.

Die Verbindung zwischen Faser und Reaktivfarbstoff wird in den meisten Fällen durch etheroder esterartige kovalente Bindungen hergestellt. Der Aufbau ist bestimmt durch einen Farbstoffgrundkörper, an den entsprechend der Funktion des Farbstoffs verschiedene Gruppen gebunden sind. Ein bis vier Sulfonsäuregruppen werden für die Wasserlöslichkeit des Farbstoffs benötigt. Die eigentliche Reaktivgruppe mit Abgangsgruppe ist direkt oder über eine Trägergruppe an den Farbstoffgrundkörper gebunden. Eine Übersicht zu den eingesetzten Reaktivgruppen ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: Reaktivfrägergruppen und Abgangsgruppen von Reaktivfarbstoffen [27]

Beim chemischen Färbeprozess unter alkalischen Bedingungen verhält sich die Cellulose als Polyalkohol wie eine schwache Säure, die dissozierte Natriumcellulosemoleküle bilden kann. Je nach Grad der Affinität zum Farbstoff absorbieren die in die Cellulosefaser diffundierten Farbstoffmoleküle auf der Faser, ohne mit der Faser zu reagieren. Erst unter Zusatz von Alkali erhöht sich die Ionenkonzentration, die eine Reaktion zwischen Farbstoff und Faser ermöglicht.

Die von Hoechst entwickelten Remazol-Reaktivfarbstoffe mit Vinylsulfon-Gruppe können mit der Faser oder einem anderen Nukleophil auf zwei Arten reagieren. Entweder durch direkte nukleophile Substitution (Reaktion 1) oder über einen zweistufigen Mechanismus via basenkatalysierter 1,2-Eliminierung (Reaktion 2) und nachfolgender Addition an die aktivierte Doppelbindung nach dem Prinzip der *Michael*-Addition (Reaktion 3).

$$FS-SO_2CH_2CH_2O-SO_3^{-1}Na^{+} \rightarrow (Cellulose-O^{-1}) \rightarrow FS-SO_2-CH_2-CH_2-O-Cellulose (1)$$

$$FS-SO_2CH_2CH_2O-SO_3^-Na^+ \rightarrow (:B^-) \rightarrow FS-SO_2-CH=CH_2$$
 (2)

$$FS-SO_2-CH=CH_2 \rightarrow (Cellulose-O^-) \rightarrow FS-SO_2-CH_2-CH_2-O-Cellulose (3)$$

FS – chromophores System

Tatsächlich läuft beim Färbeprozess unter alkalischen Bedingungen die zweistufige Reaktion (2+3) ab [28].

## 3.2.1 Restflotten der Reaktivfärbung

Neben der gewünschten Reaktion des Farbstoffes mit der Faser tritt mit einem Anteil von 5 - 50% die Hydrolyse des eingesetzten Reaktivfarbstoffs ein. Besonders hohe Farbstoff-konzentrationen werden der Ausziehfärbung zugeordnet, bei der je nach Färbeflotte (angegeben als g Farbstoff je kg Ware in %) und Fixierrate (Anteil des auf der Ware fixierten Farbstoffanteils in %) sehr hohe Restfrachten an Farbstoff nachweisbar sind. Eine 3 %ige Färbeflotte mit 70 %iger Fixierrate enthält beispielsweise 9 g L<sup>-1</sup> Farbstoff in der zu behandelten Restflotte [10].

Um eine hohe Nassechtheit zu gewährleisten, muss der hydrolysierte Farbstoff aus der frisch gefärbten Ware ausgewaschen werden. Die Dauer und die Anzahl der Spülbäder hängt von der Affinität des Farbstoffes zur Faser und der Färbeausbeute ab. Schwarzfärbungen können bis zu sieben Spülbäder erfordern [21]. Aufgrund des modischen Wandels, dem Farben und Textilien unterworfen sind, ist die stoffspezifische Zusammensetzung der Inhaltsstoffe eines Färbereiabwassers ständigen Wechseln unterworfen. Die Reaktivfarbstoffe haben bei der Gruppe der Farbstoffe als Abwasserinhaltstoffen mengenmäßig die herausragendste Stellung, weil sie im Vergleich zu andern Farbstoffen die geringsten Färbereiausbeuten aufweisen.

Allein der Remazolfarbstoff Remazol Schwarz B (C.I. Reactive Black 5) wird weltweit mit einer Jahresproduktion von 50000 Tonnen pro Jahr hergestellt [2]. Bei einer Färbereiausbeute zwischen 50-95% gelangen durchschnittlich 14.000 Tonnen pro Jahr hydrolysiert ins Abwasser. Sehr hohe molare Extinktionskoeffizienten von bis zu  $\varepsilon$  = 50.000 cm mol<sup>-1</sup> bei den Reaktivfarbstoffen, die auf Azofarbstoffen aufgebaut sind, führen schon bei geringen Konzentrationen zu einer sichtbaren Wahrnehmung der Farbigkeit im Wasser.

In den 90iger Jahren wurde das Problem der Restfarbigkeit von Abwässern aus Reaktivfärbungen in England als dringlichstes Abwasserproblem der Textilveredelungsindustrie beschrieben [30]. Weitere stark mit hydrolysierten Reaktivfarbstoffen belastete Abwässer fallen an bei der Färberei nach dem Kaltklotzverweilverfahren (KKV) mit Farbstoffgehalten von bis zu 60 g L<sup>-1</sup>, bei Appreturrestflotten und als Restdruckpasten bei der Textildruckerei. Appreturrestflotten und Restdruckpasten setzten sich zusammen aus ca. 66% Reaktivfarbstoffe, ca. 17% Küpenfarbstoffe, ca. 11% Pigmentfarbstoffe und ca. 6% Dispersionsfarbstoffe [31].

#### 3.2.2 Konzentrate aus der Membranbehandlung farbstoffhaltiger Abwässer

Die Wiederaufbereitung von Prozessabwässern (z.B. Spülbäder aus der Reaktivfärbung) zu Prozesswasser bzw. Brauchwasser in der Textilveredelungsindustrie, wie sie seit 2001 im gesetzlichen Regelwerk für die Textilindustrie vorgeschrieben ist, beginnt bereits in den

# Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

70iger Jahren mit dem Einsatz von Umkehrosmose Membranverfahren [31]. Heute haben sich diese Bestrebungen durch die Forderung nach Produktintegriertem Umweltschutz (PIUS) und im Rahmen der nachhaltigen Entwicklung von Anlagen und Ressourcen schonenden Verfahren in Form von Membranaufkonzentrierungsanlagen in vielen Bereichen der Industrie etabliert. Neben den ökonomischen Vorteilen kann die Kreislaufführung von Prozesswasser aus betriebswirtschaftlicher Sicht zu erheblichen Kosteneinsparungen führen.

Durch die fortschreitende Globalisierung der Märkte hat sich auch im Bereich der Textilfärbung der Wettbewerb verstärkt. Nicht zuletzt die lokalen Kostenunterschiede in der Wasserversorgung und Entsorgung machen den Einsatz neuer Technologien erforderlich. Der Membrantechnik wird eine wichtige Rolle bei der Behandlung der verschiedensten Textilabwässer aus der Färbung von Wolle, Cellulose, Baumwolle und Kunstfasern eingeräumt, die mit anderen physikalisch-chemischen Verfahren zur Abwasserbehandlung konkurriert. In der Möglichkeit, Prozessabwasser aufzubereiten und dem Prozess wieder zuzuführen, sind die Membrantechniken den Verdampfungsverfahren ökonomisch überlegen [33]-[37].

Als Membrantechniken zur Aufkonzentrierung und Reinigung von Prozessabwässern in der Textilindustrie finden Umkehrosmose [31], [38] Nanofiltration [38]-[44] und Ultrafiltration [34]-[35], [42] Mikrofiltration [42] Einsatz. Das Konzept der split-flow Abwasserbehandlung wird als das zur Zeit effektivste Verfahren eingeschätzt [45]-[46]. Hierbei wird das Abwasser zuerst durch Siebe von größeren Partikeln befreit, um dann durch Ultrafiltration von höhermolekularen Substanzen befreit zu werden, was zu einer Reduktion des CSBs von ca. 30% führt. In einem zweiten Schritt wird Nanofiltration zur Abtrennung der niedermolekularen organischen Verbindungen eingesetzt, bei der eine ca. 90%ige Eliminierung des CSBs erzielt wird. Abwässer aus dem Bereich der kontinuierlichen Färbung und des Finishings werden über eine Umkehrosmose geleitet, um entsalzt zu werden.

Die wichtigsten Aspekte für die Entwicklung der Abwassersituation in der Textilindustrie sind:

- Entwicklung neuer Färbereiverfahren, die abwasserfrei betrieben werden können [47]
- Technische Weiterentwicklung und Reduktion von Betriebskosten von Membran-verfahren zur Abwasseraufbereitung und Farbstoff- bzw. Salzwiedergewinnung [47]
- Einsatz von so genannten split-flow Behandlungsverfahren an Stelle von mixed-flow Verfahren [46]
- Entwicklung biologisch leicht abbaubarer Textilhilfsstoffe und Farbstoffe und Reduzierung des Gehalts an inhibierenden Stoffen. Die Kombination von Membran-verfahren und optimierten anaeroben biologischen Verfahren zur Entfärbung und CSB-Reduktion stellen eine ideale Kombination dar [45]-[46]

Die neuesten Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Membranbehandlung von Textilabwässern berücksichtigen zum Teil diese Aspekte, gehen aber auch in den Bereich kombinierter Membranverfahren mit physiko-chemischen Verfahren wie Flockung, Koagulation [41] und die Kombination von Flockung mit Ozonisierung [42].

Die bei Membranprozessen anfallenden Konzentrate stellen die Betreiber vor ein Entsorgungsproblem. Konzentrate aus Umkehrosmose und Nanofiltration beinhalten neben den organischen Komponenten wie Farbstoffen und Textilhilfsmitteln einen hohen Anteil anorganischer Salze, die beim Färbeprozess zur Farbstofffixierung eingesetzt werden müssen [48].

# 3.3 Toxizität azofarbstoffhaltiger Textilabwässer

Die ersten Untersuchungen bezüglich toxikologischer Eigenschaften von Azofarbstoffen reichen bis zum Ende des 19. Jahrhunderts zurück. 1895 untersuchte Rehn Fälle von Blasenkrebs, die bei Arbeitern in der Herstellung und bei der Verarbeitung des Azofarbstoffs Fuchsin auftraten [49]. Langzeitstudien von Case et al. zeigten 1954, dass verschiedene Azofarbstoffe bei Arbeitern in der Farbstoffherstellung und Verarbeitung Blasenkrebs auslösen können [50]. 50 Jahre nach dem ersten Auftreten konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Blasenkrebsfälle in ursächlichem Zusammenhang mit der Verarbeitung von Azofarbstoffen standen.

In den 70iger und 80iger Jahren des vorherigen Jahrhunderts kam es in den USA zu staatlichen Initiativen, die zu den ersten Verboten verschiedener Azofarbstoffe führten [51]-[55]. Weitere Studien beschreiben Vorhersagetechniken zur Beurteilung von Azofarbstofftoxizität, die sich an der strukturellen Zusammensetzung der Farbstoffe orientiert [56]. Hervorzuheben sind die Gruppe der auf "verbotenen aromatischen Aminen" basierenden Azofarbstoffe, bei denen es sich hauptsächlich um Azofarbstoffe sowie Pigmente handelt, die auf Anilin-, Toluen-, Benzidin- und Naphthalen-Derivaten basieren [57]. Die Mitglieder der Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industry (ETAD) wie z.B. die Firmen DyStar und Clariant, haben sich verpflichtet, diese Farbstoffe nicht mehr herzustellen und zu vertreiben. Hersteller, die dieser Organisation nicht angehören, können diese Farbstoffe weiterhin herstellen und vertreiben. Azofarbstoffe mit kanzerogenen aromatischen Aminen als Kupplungskomponenten wurden in Deutschland erstmals in der MAK-Wert-Liste 1988 im Abschnitt III "Krebserzeugende Arbeitsstoffe" erwähnt.

Nach dem Verbot dieser Farbstoffe in Deutschland 1994 [58], ist 2002 das Verbot EU-weit in Kraft [59] getreten. Dennoch werden im ostasiatischen Raum in kleinen bis mittelgroßen Betrieben weiterhin verbotene Azofarbstoffe hergestellt und in den weltweiten Handel gebracht [60]. Die akute Toxizität von Azofarbstoffen wird unter Betrachtung der EU Kriterien für die Klassifikation gefährlicher Substanzen 1980 von Vertretern der ETAD als eher gering eingeschätzt [61]. Hildenbrand zitiert in einer Veröffentlichung eine Entscheidung der Deutschen Forschungsgemeinschaft von 1999. Sie besagt, dass die mit Azofarbstoffen in Zusammenhang stehenden aromatischen Amine aufgrund ihrer großen Zahl nicht konventionellen toxikologischen Untersuchungen an Tieren unterzogen werden können [62].

Tabelle 2: Toxizitätswerte für verschiedene Modellfarbstoffe

Farbstoff	EC <sub>50</sub> [mgL <sup>-1</sup> ]	EC <sub>50</sub> -1	EC <sub>20</sub>
CI Reaktiv Orange 96 <sup>1</sup>	90,7	0,01	10
CI Reaktiv Violet 51	109,6	0,01	11,2
CI Reaktiv Brilliantgrün <sup>1</sup>	143,7	0,01	41,9
CI Reactive Black 5	27,5 +/- 15%²		
	12³		
CI RB5-Hydrolysiert <sup>2</sup>	11,4 +/- 32%		
Acid Orange 7 <sup>2</sup>	0,01 +/-15%		
Food Yellow 3 <sup>2</sup>	22,1+/- 11%		

<sup>1</sup>Quelle: Soewondo, 1997, Leuchtbakterienhemmung [68], <sup>2</sup>Quelle Gottlieb et al., 2003 mit Biolumineszenz mit *Vibrio fischeri* [67], <sup>3</sup> BUA, 1994, Wachstumsratentest mit *Scenedesmus subspicatus* [69]

Durch die Bestrebungen der EU mit dem so genannten "White Paper" eine Regelung für die Zulassung und Registrierung von Chemikalien zu schaffen, geht die ETAD heute davon aus, dass 2000 – 2500 kommerzielle Farbstoffe von dieser Regelung betroffen sind. Die geschätzten Kosten für die Registrierung dieser Farbstoffe und die Erfassung ihrer Intermediate belaufen sich auf 1 Milliarde Euro [63]. Mit Ausnahme weniger Farbstoffe, die

 $LD_{50}$ -Werte von > 250 mg kg<sup>-1</sup> Körpermasse zeigen, liegen die meisten veröffentlichten  $LD_{50}$ -Werte im Bereich zwischen 250 - 2000 mg kg<sup>-1</sup> Körpermasse.

Das potentielle Gefährdungspotential aller Azofarbstoffe besteht weniger im Farbstoff selbst als in den aromatischen Aminen, die durch reduktive Spaltung der Azobindung freigesetzt werden [56]. Zum Teil können Substanzen, die vor der Kupplung mit der Diazonium-komponente als toxikologisch unbedenklich gelten, durch eine reduktive Spaltung der Azobindung in toxische Substanzen umgewandelt werden. Beispiele hierfür sind in der Literatur beschrieben [70], [71].

Toxikologischen Daten der Ausgangssubstanzen von Reaktivfarbstoffen und ihrer Hydrolyseprodukte basieren hauptsächlich auf mit Leuchtbakterientests durchgeführten toxikologischen Untersuchungen [68]. Neben den Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* wurden
Wachstumshemmtests mit *Pseudomonas putida* durchgeführt. Bei den Wachstumshemmtests zeigten sulfonierte Aromaten wie die H-Säure eine äußerst geringe hemmende
Wirkung (siehe Tabelle 3). Reduktive Abbauprodukte der Reaktivfarbstoffe auf Vinylsulfonbasis (Vinylsulfon) zeigen eine im Vergleich zu den Farbstoffen um 25 bis 1640000 fache
Erhöhung der Toxizität. Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung dieser Stoffklasse gibt es
bislang nicht.

Die Environmental Protection Agency, USA (EPA) hat in einer Liste, die im Rahmen der Toxic Substances Control Act (TSCA) im Jahr 1976 angelegt wurde, einen Teil der zur Herstellung von Remazolfarbstoffen benötigten Chemikalien aufgeführt [74]. Die zur Synthese von Remazolfarbstoffen eingesetzten Vinylsulfone werden im "TSCA New Chemicals Program, gesondert aufgeführt [75]. Darin sind Verbindungen enthalten, die in Verdacht stehen, toxikologisch wirksam zu sein und in größeren Mengen produziert werden. Nach Einschätzungen der EPA werden Vinylsulfone als nicht besonders gesundheitsgefährdend für den Menschen eingeschätzt. Die Hydroxyethylsulfone, die bei der Hydrolyse der Vinylsulfone entstehen, werden als völlig ungefährlich eingestuft. Toxizitätsuntersuchungen mit Leuchtbakterientest *V. fischeri* an Vinylsulfon (Vinyl-p-Base) und Hydroxyethylsulfon (p-Base) zeigten, dass die Vinyl-Form eine mehr als 300mal höhere Toxizität als die Hydroxy-Form hatte [15].

Tabelle 3: (EC<sub>50</sub>-1)-Werte für einige Farbstoffmetabolite und Farbstoffzusätze<sup>1</sup>

Substanz	Leuchtbakterientest (EC <sub>50</sub> <sup>-1</sup> )	Leuchtbakterien/ Wachstumstest (EC <sub>50</sub> <sup>-1</sup> )	p. putida Wachstumstest (EC <sub>50</sub> -1)
p-Base <sup>2</sup>	0,1	0,29	0,64
Vinyl-p-Base <sup>2</sup>	16,7	24	16,6
Hexylenglykol <sup>2</sup>	0,45	0,07	0,06
Sulfanilsäure <sup>2</sup>	33,8x10 <sup>-3</sup>	0,45	3,7
1 Amina 2 nanhthal3	0,05 +/- 31% <sup>3</sup> 10 +/- 30%		
1-Amino-2-naphthol <sup>3</sup> 1-Amino-2-naphthol-6- sulfonat <sup>3</sup>			
1-Naphthalinsulfon- säure³	0,03 +/- 8%		
2-Naphthalinsulfon- säure³	0,12 +/- 3%		
4-Amino-1-naphtha- linsulfonsäure³	0,04 +/- 13%		
H-Säure <sup>3</sup>	0,02 +/- 19%		

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Reinke [72], 1995, <sup>2</sup>Schmid, 1994 [73], <sup>3</sup>Gottlieb et al., 2003 [67]

Die veröffentlichten toxikologischen Daten vieler kommerziell eingesetzter Farbstoffe, die nicht dem Verbot unterliegen, beschränken sich auf Ergebnisse aus Standardtests wie Fischtoxizität (Brachydanio rerio), orale Toxizität LD $_{50}$  (Ratten), Bakterientoxizität (Gärröhrechen), Mutagenitätstests (Micronucleus-Test, Salmonella/Microsomen-Test – Ames Test) und die biologische Eliminierbarkeit [64]. Dabei wird zum Teil der Test einzelner Verbindungen umgangen, indem repräsentativ nur ein Stoff aus einer Stoffgruppe auf seine toxischen Eigenschaften geprüft wird [65]. Für den weltweit mengenmäßig am häufigsten eingesetzten Reaktivfarbstoff Reactive Black 5 liegen beispielsweise nur fragmentarische Daten zur Toxizität im Datenblatt vor [66]. Tabelle 2 zeigt verschiedene untersuchte kommerzielle Farbstoffe, die mit Ausnahme von Acid Orange 7 aufgrund der hohen EC $_{50}$ -Werte als wenig toxisch eingestuft werden können [67].

Zur Beurteilung des Gefährdungspotentials von Azofarbstoffen und aromatischen Aminen aus Abwässern spielt neben der Toxizität auch der Einfluss der Bioakkumulation in Gewässern und Sedimenten eine wichtige Rolle. Es besteht die Gefahr, dass die Azofarbstoffe in der Umwelt unter den anaeroben Bedingungen in Sedimenten reduktiv gespalten werden und aromatische Amine freisetzten [76]. Schätzungen gehen davon aus, dass 7 bis 15% der organischen Belastung im Rhein aus sulfonierten aromatischen Verbindungen bestehen [77]. In anderen europäischen Flüssen und Grundwasser konnten ebenfalls hohe Belastungen mit sulfonierten aromatischen Verbindungen nachgewiesen werden [78]-[81].

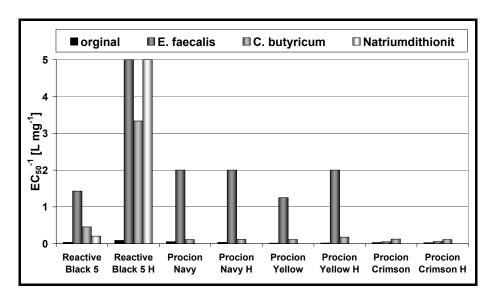


Abbildung 3: Toxizitätsbestimmung mit Leuchtbakterientest von unhydrolysiert und hydrolysierten (H) Reaktivfarbstoffen vor und nach der reduktiven biologischen bzw. chemischen Behandlung [67]

In Abwasserkonzentraten aus der Farbstoffherstellung konnte sowohl vor als auch nach der biologischen Behandlung eine mutagene Wirkung an *S. typhimurium TA98* und *E. coli WP2uvrA* nachgewiesen werden [82]. Neuere Untersuchungen belegen mit Hilfe von Leuchtbakterientests den Verlauf der Toxizität von Reaktivfarbstoff in biologischen Behandlungsanlagen [67]. Dabei ist im allgemeinen eine Anstieg der Toxizität nach der anaeroben oder chemischen Reduktion des Azofarbstoffs um den Faktor 2 bis 133 zu verzeichnen (siehe Abbildung 3) [15], [82]. Die unterschiedlichen Toxizitäten nach der Behandlung mit verschiedenen biologischen und chemischen Reduktionsmethoden zeigen, dass sich reduktionsspezifische Intermediate bilden. Begleitende chemisch-analytische Untersuchungen liegen in diesem Zusammenhang nicht vor. Nach der aeroben Behandlung wird etwa ein Drittel der Eingangstoxizität beobachtet [15].

Untersuchungen an Schlammspringern (*Periophthalmus dipes*) zeigten die inhibierende Wirkung von farbstoffhaltigen Abwässern der Textil- und Druckindustrie auf verschiedene Enzyme wie beispielsweise die membrangebundene ATPase [83]. Der Einfluss von hohen Kochsalzgehalten (89 - 112 g L<sup>-1</sup>) in Textilabwässern wurde an der Nematode *Caenorhabditis elegans* untersucht [84]. Die LC<sub>50</sub>-Werte für ein synthetisches Reaktivfarbstoffabwasser lagen bei Salzgehalt von 112 g L<sup>-1</sup> bei 14,5, ohne Salz bei 55,6 und ohne Farbstoff mit Salz bei 22,8. Der hohe Salzgehalt wirk sich stärker auf die Sterblichkeit der Nematoden aus als ein Farbstoffgehalt von 1,8 g L<sup>-1</sup>.

Bei Ozonisierungsversuchen an Farbstoffkonzentraten mit Reactive Black 5 (2 g L<sup>-1</sup>) wurde nach einer 30 Minuten dauernden Ozonisierung (20,5 mg L<sup>-1</sup>) ein Anstieg um das Vierfache beobachtet. Erst nach drei bis vier stündiger Behandlung wurde eine Abnahme unter das Ausgangsniveau beobachtet [85].

# 3.4 Behandlungskonzepte zur Färbereiabwasserentfärbung

Eine Übersicht von Hillebrand et al. beschreibt die aktuelle Abwassersituation in der deutschen Textilindustrie und gibt eine repräsentative Bestandsaufnahme für die Bewertung der verwendeten chemischen Stoffe in 127 Betrieben [6]. Nach den Ergebnissen der Erhebung werden in nur einem textilveredelnden Unternehmen Schlichtemittel-Rückgewinnungsverfahren einsetzt.

Tabelle 4: Abwasserbehandlung bei der textilveredelnden Industrie [	6	1
Tabolio II 7 lottaccolocitatiani gi bol aci toxtii 7 ci cacili acili iliaacilio j	_	

	Direkteinleiter (n=14)		Indirekteinle (n=113)		leiter	
Abwasserbehandlungsverfahren	Ja	Nein	n	Ja	Nein	n
Ausgleichsbecken	12	2		55	58	
Sieb	6	8		9	84	
Neutralisation	5	9		51	62	
Fällung/Flockung	2	12		12	101	
Abwasserrückführung in die Produktion	3	11		10	104	
Sonstiges			6			10
davon biologische Verfahren			3			5
Betriebe, die in den letzten 2 Jahren Maßnahmen						
durchgeführt haben davon:			8			36
Abwasserbehandlung			2			18
(Ab)-Wasserrückführung			2			12

Die bei der Abwasserbehandlung in direkt einleitenden und indirekt einleitenden Betrieben eingesetzten Verfahren sind in Tabelle 4 dargestellt. Entgegen der hohen produktbezogenen Wasserverbrauchsraten wird in dieser Industrie Wasserrückführung in die Produktion nur bei etwa 9% der Indirekteinleiter und 21% der Direkteinleiter eingesetzt. Die Wasserkreislaufrate von 53% ergibt sich durch die Wiederverwendung von Kühlwasser (siehe Tabelle 5). Der Anteil der biologischen Verfahren zur Abwasserbehandlung liegt bei den Indirekteinleitern bei unter 5% und bei den Direkteinleitern bei 21%. Der überwiegende Teil (57%) der Direkteinleiter hatte in den letzten Jahren (Stand 1999) Maßnahmen zur Abwasserbehandlung bzw. Emissionsminderung durchgeführt bzw. plante in den nächsten Jahren zusätzliche Maßnahmen. Bei den indirekt einleitenden Betrieben lag der Anteil bei 32%.

Nach in Kraft treten der Novellierung des Anhang 38 haben sich drei Verfahren zur Vorbehandlung, Entfärbung und Wasserrückgewinnung durchgesetzt: Membrantechnik, biologische Verfahren und Fällung/Flockung. Über die Behandlungsverfahren für Farbstoffproduktionsabwässern gibt es wenige Hinweise in der Literatur. Am Standort Leverkusen der Firma Dystar werden vornehmlich Ozonisierungsverfahren zur Vorbehandlung von Produktionsabwässern eingesetzt. Die Abwässer werden dann in die betriebliche, mehrstufige

biologische Kläranlage eingeleitet. Ansätze zum Recycling von Ausziehflotten und Restflotten der Reaktivfärbung zeigten sich wenig erfolgreich, weil der Restanteil des nichthydrolysierten Farbstoffs zusammen mit frischem Farbstoff ein anderes Färbeverhalten zeigt als die Verwendung frischer Farbstoffe [86].

Tabelle 5: Übersicht über die erhobenen Emissionsminderungstechniken in der textilveredelnden Industrie [6]

		Ja		Nein	
Emissionsminderungstechnik		n	%	n	%
Schlichtemittel-Rückgewinnung		1	0,8	126	99,2
Wasserkreislaufführung davon:		68	53,5	59	46,5
	zu Kühlzwecken	45	35,4		
	in Druck- und Färberei	16	12,6		
Teilstrombehandlung		18	14,2	109	85,8
	aus Druck- und Färberei	5	3,9		
	zur Wärmerückgewinnung	3	2,4		
	durch Neutralisation	4	3,2		

## 3.4.1 Übersicht Stand der Technik

Die zur Entfärbung und Behandlung von farbigen Textilabwässern eingesetzten Verfahren gliedern sich mehrere Gruppen, die sich physikalischen, chemischen und biologischen Bereichen zuordnen lassen. In Tabelle 6 sind die wichtigsten technischen Verfahren dargestellt, die in der internationalen Literatur diskutiert werden. Bei einer 1998 erschienen britischen Marktanalyse der DEMOS (Department of Trade and Industry Environmental Options Scheme) wurden 30 Verfahren zur Behandlung farbiger Textilabwässer gefunden, die größtenteils technologischer Überholung bedürfen, um finanzierbar zu bleiben [87].

So unterschiedlich wie die Färbeverfahren sind auch die Kombination von Verfahren, die den jeweiligen betrieblichen Erfordernissen angepasst sind. Für die Auswahl eines geeigneten Verfahrens werden Kriterien wie Wasserlöslichkeit, Polarität und Konzentration der Farbstoffe herangezogen. Unter Berücksichtigung der Zielsetzung (Vorbehandlung, Entfärbung, Mineralisierung, Recycling) müssen die ökonomischen Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Chemische und physikalische Verfahren gelten als energie- und kostenintensiv, wodurch die Entwicklung der in der Regel preiswerteren mikrobiologischen Verfahren von Interesse ist [11], [88].

Zu so genannten "Advanced Oxidation Processes (AOPs)" werden der Einsatz von Fenton Reagenz  $[H_2O_2 \text{ und Fe}(II)]$ , UV-Licht mit und ohne Katalysator (z.B.  $TiO_2$ ),  $H_2O_2$  und  $O_3$  gezählt. Generell basieren diese Verfahren auf der Bildung von hoch reaktiven Radikalspezies wie dem Hydroxylradikal ('OH). Der Vorteil liegt im dem im Vergleich zu anderen Oxidationsmitteln hohen Oxidationspotential (siehe Tabelle 7). Die Eignung von Ozonisierungsverfahren bei der Behandlung von hoch belasteter Textilabwasserkonzentrate ist aufgrund nicht ausreichender Entfärbeleistung in Frage gestellt [89].

Technische Bedeutung haben enzymatische Entfärbungsverfahren seit Ende 2000 durch die Entwicklung des Produkts Baylase RP-System erlangt, das bei der Auswaschung von nicht gebundenen Farbstoffresten nach einer dunklen Reaktivfärbung eingesetzt wird [91]. Es ermöglicht die Reduzierung von neun auf sechs Prozessschritte bei der Färbung und führt zu einer zeitlichen Einsparung von 30% sowie einem verminderten Wasserverbrauch von 20 L kg Baumwolle -1. Aufgrund des Preisdrucks auf Hersteller und Anwender finden exotische und wenig erprobte Verfahren wie die Anwendung von Cucurbituril, Lignin Peroxidase oder Weißfäulepilz/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Bereich der Entfärbung bislang keinen Einsatz.

Tabelle 6: Methoden und Verfahren zur Entfärbung farbstoffhaltiger Abwässer [88], [89], [92]-[98]

Aktivkohle Absorption	Methode	Verfahren	Entfärbeleistung	3ehandlungs- /olumen	Entfärbe- geschwindigkeit	Investitionskosten	Eigenschaften
Cucurbituril ElektrolyseKomplexierung Reduktion/ Oxidation+-+-Selektiv, Regeneration, ElektrodenabnutzungFentons Reagenz IonenaustauschOxidation++-+-SchlammentsorgungIonenpaar- extraktion++++-Ionische Farbstoffe, Regeneration, KonzentratentsorgungKoagulation/ 		•					
Elektrolyse Reduktion/ Oxidation  Fentons Reagenz Ionenaustausch  Ionenpaar- extraktion  Koagulation/ Fest-Flüssig- Flockung Trennung Lignin Peroxidase Enzymatische Redoxreaktion  Membranen* Diffusion H H H H H H H H H H H H H H H H H H H					+	+	
Fentons Reagenz lonenaustausch  Ionenaustausch  Ionenpaar- extraktion  Ionenpaar- extraktion  Fest-Flüssig- Flockung Lignin Peroxidase  Enzymatische Redoxreaktion  Membranen*  NaOCl  Ozidation  Diffusion  Ozidation  Photokatalyse/ Ozonisierung  Photokatalyse/ Photokatalyse/ Photokatall  Radikal  Radikal  Radikal  Fentons Reagenz  Ioninische Farbstoffe, Regenerierung, Konzentratentsorgung, nur ionische Farbstoffe  Regenerierung, Konzentratentsorgung, Nitrifikation, CSB Eliminierung  Schlecht regenerierbar  Reinigung, Konzentratentsorgung  Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte  Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall  Weißfäulepilz/  Radikal  H+ - O - Wenig erforscht  Wenig erforscht				0			
Fentons Reagenz lonenaustausch  Ionenaustausch  Ionenaustausch  Ionenpaar- extraktion  Ionenpaar- extraktion  Fest-Flüssig- Trennung  Lignin Peroxidase  Redoxreaktion  Membranen*  Diffusion  NaOCl  Oxidation  Photokatalyse/ Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall  Redoxidation  H+ + + + + + + + + + + + + + + + + + +	Elektrolyse		++	-	+	-	•
Ionenaustausch	F ( D						•
Regeneration, Konzentratentsorgung  Ionenpaar- extraktion  Fest-Flüssig- Flockung Lignin Peroxidase Enzymatische Redoxreaktion  Membranen* Diffusion NaOCl Ozonisierung Ozonisierung Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall Radikal Radikal Radikal Fest-Flüssig + + + + + + + + + + + + + + + + +		Oxidation	++	-		-	
Konzentratentsorgung   Regenerierung, Konzentratentsorgung, nur ionische Farbstoffe   Koagulation	ionenaustausch		+	+	+	-	·
Ionenpaar-extraktion							•
extraktion  Koagulation/ Flockung Lignin Peroxidase NaOCl Ozonisierung Ozonisierung Photokatalyse/ Photokatalyse/ Ultraschall Radikal  Redixing  Rest-Flüssig- Trennung  Schlammentsorgung, Nitrifikation, CSB Eliminierung  Schlecht regenerierbar  Reinigung, Konzentratentsorgung  Reinigung, Konzentratentsorgung  Reinigung, Konzentratentsorgung  Reinigung, Konzentratentsorgung  Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte  Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ Weißfäulepilz/  Radikal  ++ - 0  - wenig erforscht  Wenig erforscht	lanamaan						<b>5 5</b>
Koagulation/ Fest-Flüssig-			+	-	+		
Koagulation/ Flockung Lignin Peroxidase Enzymatische Redoxreaktion NaOCl Ozonisierung Oxidation Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO Ultraschall Weißfäulepilz/ Enzymatische Rest-Flüssig- Trennung CSB Eliminierung CSB Eliminierung Schlecht regenerierbar Reinigung, Konzentratentsorgung Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte Ozonisierung Oxidation CSB Eliminierung NaOCl Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte Newnig erforscht Wenig erforscht Wenig erforscht Wenig erforscht Wenig erforscht	extraktion						<b>5 5</b>
Flockung Lignin Peroxidase Enzymatische Redoxreaktion  Membranen* Diffusion NaOCl Oxidation  Trennung Enzymatische Redoxreaktion  H + + + + - Ozonisierung  Oxidation  CSB Eliminierung Schlecht regenerierbar  Reinigung, Konzentratentsorgung Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte Ozonisierung  Oxidation  H + + O - Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall Radikal  H - O - Wenig erforscht  Weißfäulepilz/ Enzymatische  CSB Eliminierung  CSB Eliminierung  Nanzentratentsorgung  Nanzentratentsor	Vecquietien/	Foot Flüggig			ı lo		
Lignin Peroxidase Enzymatische Redoxreaktion  Membranen* Diffusion ++ ++ + - Reinigung, Konzentratentsorgung NaOCl Oxidation + + + O Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte  Ozonisierung Oxidation + + O Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ Oxidation + + + O wenig erforscht  H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall Radikal ++ O O Wenig erforscht  Weißfäulepilz/ Enzymatische + O Wenig erforscht	•	•	O	TT	<b>T/</b> 0	O	<b>5 5</b> .
Redoxreaktion  Membranen* Diffusion ++ ++ + - Reinigung, Konzentratentsorgung  NaOCl Oxidation + + O Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte  Ozonisierung Oxidation + + O Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO Ultraschall Radikal ++ O O O Nenig erforscht  Weißfäulepilz/ Radikal ++ O O O Nenig erforscht  Wenig erforscht	•	•					•
Membranen* NaOCIDiffusion Oxidation++ ++++++++++++++++++++++++++++++++++++	Ligiliii Peroxidase		-	-	-	-	Schlecht regenenerbal
NaOCI Oxidation + + +  Salzgehalterhöhung, Entstehung chlorierter Nebenprodukte  Ozonisierung Oxidation + +  Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ Oxidation + + +  wenig erforscht  H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> /ZnO  Ultraschall Radikal ++ -  Weißfäulepilz/ Enzymatische + -  wenig erforscht  wenig erforscht	Membranen*				_		Peinigung Konzentratentsorgung
Ozonisierung Oxidation + + + $\circ$ - Nebenprodukte, CSB Eliminierung  Photokatalyse/ Oxidation + + + $\circ$ wenig erforscht  H $_2O_2/TiO_2/ZnO$ Ultraschall Radikal ++ - $\circ$ - wenig erforscht  Weißfäulepilz/ Enzymatische + - $\circ$ - wenig erforscht							
Ozonisierung Oxidation + + + $\circ$ - Nebenprodukte, CSB Eliminierung Photokatalyse/ Oxidation + + + $\circ$ wenig erforscht $H_2O_2/TiO_2/ZnO$ Ultraschall Radikal ++ - $\circ$ - wenig erforscht Weißfäulepilz/ Enzymatische + - $\circ$ - wenig erforscht	NaOCi	Oxidation	'	•	O	O	
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Ozonisiarung	Ovidation	_	_	0	_	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Photokatalyse/ Oxidation + + + $\circ$ wenig erforscht $H_2O_2/TiO_2/ZnO$ Ultraschall Radikal ++ - $\circ$ - wenig erforscht Weißfäulepilz/ Enzymatische + - $\circ$ wenig erforscht	Ozonisierung	Oxidation	•	•	O	_	
$H_2O_2/TiO_2/ZnO$ Ultraschall Radikal ++ - $\circ$ - wenig erforscht  Weißfäulepilz/ Enzymatische + - wenig erforscht	Photokatalyse/	Ovidation	+	+	+	0	•
Ultraschall Radikal ++ - o - wenig erforscht Weißfäulepilz/ Enzymatische + - wenig erforscht		Oxidation	•	·	•	J	worling chorsont
Weißfäulepilz/ Enzymatische + - wenig erforscht		Radikal	++	_	0	_	wenia erforscht
·					<u> </u>	_	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Redoxreaktion	•			_	Worling Chorson

++ - sehr positiv, + positiv, o neutral/medium, - negativ, \*Nanofiltration und Umkehrosmose

Neuere Entwicklungen im Bereich der elektrolytischen Behandlung von Textilabwässern sind mit Entfärbeleistungen von über 90% viel versprechend. Um ihre Tauglichkeit für den Praxiseinsatz abzusichern, sind weitere Untersuchung unter Berücksichtigung der hohen Salzgehalte durchzuführen. Auch die Beurteilung des Mineralisierungsgrades und der Akkumulierung von Nebenprodukten bedarf weiterer Untersuchungen [89].

Tabelle 7: Oxidationspotentiale verschiedener Oxidationsmittel [90]

Prozess	E <sub>0</sub> [V]
•OH + H +e <sup>-</sup> → H <sub>2</sub> O	2,28
$O_3 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	2,07
$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$	1,78
$O_2 + 4H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$	1,23

## 3.4.2 Entfärbe- und Abbaumechanismen biologischer Verfahren

Azofarbstoffe und sulfonierte aromatische Verbindungen sind in der Natur weitestgehend unbekannt und gelten als xenobiotische (lebensfremde) Substanzen. Ihre chemischen Eigenschaften sind auf die Erfordernisse farbiger Bedarfsgegenstände wie Textilien angepasst, d.h. hohe Stabilität gegenüber biologischen (Schweiß, Haut), chemischen (Waschen, Reinigen) und lichtinduzierten Einwirkungen (UV-Licht). Bei der Entwicklung und dem Design der Farbstoffe können Aspekte wie die biologische Abbaubarkeit daher nicht berücksichtigt werden. Die biologischen Behandlungsmethoden, die zu einer Entfärbung bzw. einem Abbau bis hin zu einer Mineralisierung führen, gliedern sich im Wesentlichen in die im Folgenden diskutierten Bereiche.

## 3.4.2.1 Adsorption

Die Adsorption oder Akkumulierung von Azofarbstoffen an Biomasse wird als Biosorption bezeichnet. In der Abwasserbehandlung spielt sie als Begleiterscheinung eine untergeordnete Rolle, da sie durch Veränderung von Prozessparametern nicht steuerbar ist. Neben Belebtschlamm wurden die Biosorptionseigenschaften von Hefe und Pilzen getestet [97].

Tabelle 8: Adsorptionseigenschaften von Azofarbstofftypen [87]

Farbstofftyp:	Adsorptions-Charakteristika
Acid	stark wasserlöslich, schwache Adsorption
Reactive	stark wasserlöslich; schwache Adsorption
Direct	starke Adsorption
Disperse	starke bis mittlere Adsorption
Basic	starke Adsorption

Die auf Ionentausch basierende Biosorption wird bei den verschiedenen Farbstoffklassen unterschiedlich stark beobachtet. 20 von 87 Azofarbstoffen unterschiedlicher Farbstoffklassen zeigten an Belebtschlamm (0,5 g L<sup>-1</sup>) Biosorption, mit der eine 23%ige Entfärbung der Farbstofflösung (100 mg L<sup>-1</sup>) erzielt wurde [99]. Eine Übersicht der Adsorptionscharakteristika ist in Tabelle 8 dargestellt.

# 3.4.2.2 Aerobe Verfahren

Aus Sicht der Vereinigung der Farbstoffproduzenten "Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industry" (ETAD) können reaktive Azofarbstoffe "in Kläranlagen mit relativ kurzer Verweildauer und unter den vorherrschenden aeroben Bedingungen biologisch praktisch nicht abgebaut werden." Die ETAD geht davon aus, dass bei der hohen Wasserlöslichkeit von Textilfarbstoffen eine geringe Bioakkumulationstendenz besteht. Unter anaeroben Bedingungen kann die Azobindung der Azofarbstoffe reduktiv gespalten werden, so dass es zur Bildung lipophiler/hydrophiler aromatischer Amine (Arylamine) kommt, die als gut biologisch abbaubar gelten [100].

Generell erfolgt der Abbau von Aromaten durch einen elektrophilen Angriff durch Oxygenasen, der aufgrund des Absinkens der Elektronendichte durch die Substitution mit Sulfonat-, Azo-, Nitro- und Chlorgruppen erschwert wird [101]. Ein mikrobiologischer Abbau bzw. die Entfärbung unter aeroben Bedingungen setzt die enzymatische Spaltung der Azobindung voraus. Sie erfolgt z.B. durch Ausscheiden von Peroxidasen oder Laccasen durch Pilze, die über radikalische Mechanismen eine unspezifische Oxidation herbeiführen [102]. Azoreduktasen, die auch in Gegenwart von Sauerstoff eine Reduktion der Azobindung zulassen, sind spezifisch und erfordern die Gegenwart einer Hydroxygruppe in para- oder ortho-Stellung zur Azobindung [103], [105]. Eine umfassende Übersicht der mikrobiologischen Abbaumechanismen gibt [104]. Die Problematik der indirekten Einleitung von farbigen Textilabwässern in kommunale Kläranlagen mit Belebtschlammbehandlung zeigt sich in der deutlichen Verfärbung des Vorfluters [106].

xsdyyyydUmfassende Untersuchungen der Entfärbung von azofarbstoffhaltigen Abwässern zeigten, das 33 von 87 untersuchten Azofarbstoffen die Kläranlage (Belebtschlammverfahren) unbe-handelt passieren. Bei 11 Farbstoffen wurde ein mögliche Abbaubarkeit und bei 23 eine partielle Abbaubarkeit festgestellt. Die restlichen Farbstoffe adsorbierten am Belebtschlamm [99]. Ähnliche Beobachtungen zeigten, dass 11 von 18 untersuchten Azofarbstoffen das Belebtschlammverfahren unbehandelt passieren. Vier Azofarbstoffe wurden weitestgehend adsorbiert und drei abgebaut [107], [108].

#### 3.4.2.3 Anaerobe Verfahren

Hinweise auf die biologische initiierte Reduktion einer Azobindung wurden erstmals 1937 veröffentlicht [109]. Als Reaktionsprodukte der Spaltung der Azobindung werden zwei aromatische Amine frei gesetzt (siehe Abbildung 4). Formal fungiert die Azobindung als terminaler Protonenakzeptor unter reduktiven Bedingungen. Die Reduktionsmechanismen wurden vorrangig an fakultativ anaerober intestinaler Bakterien untersucht, um Aufschluss über die toxikologische Wirkung von beispielsweise Lebensmittelfarbstoffen auf Azobasis und von ihnen freigesetzten potentiell toxischen aromatischen Aminen zu erhalten [56]. Die in diesem Zusammenhang erhaltenen Ergebnisse führten zum Verbot verschiedener Azofarbstoffe (siehe Kapitel 3.3, Seite 21).

$$R_1 - N = N - R_2 + 4 [H] - R_1 - NH_2 + R_2 - NH_2$$

Abbildung 4: Reduktion eines Azofarbstoffs zu aromatischen Aminen (R = aromatische Substituenden)

Der Mechanismus der anaerob hervorgerufenen Reduktion der Azobindung wird auf verschiedene Reaktionswege zurückgeführt, die in Abbildung 5 dargestellt sind. Die für die direkte enzymatische Reduktion verantwortlichen Enzyme werden als Azoreduktasen bezeichnet (siehe Aerob Verfahren). Die Reduktion kann auch auf die Reaktion nicht spezialisierter Enzyme wie Flavoproteine zurückgeführt werden, die neben Azobindungen auch andere Verbindungen reduzieren können und von aerob lebenden Stämmen produziert werden [105]. Der Anteil an durch Azoreduktasen reduzierten Azoverbindungen ist gegenüber unspezifisch reduzierenden Enzymen bei der anaerober Behandlung zu vernachlässigen [110].

Die indirekte enzymatische Reduktion (siehe Abbildung 5, II.), bei der in einer Zwischenstufe Redoxmediatoren als Elektronenshuttle fungieren, hat eine wesentlich größere Bedeutung als die direkte enzymatische Reduktion (siehe Abbildung 5, I.). Dubin und Wright, 1975 beobachteten, dass die Reduktion von Azofarbstoffen extrazellulär über einen nicht-enzymatischen Redoxmediator verursacht wurde, der als Elektronenshuttle zwischen dem Farbstoff und dem intrazellulären reduzierenden Enzymsystem fungiert [113].

Als Redoxmediatoren werden in der Literatur verschiedene im Cytoplasma vorhandene Verbindungen diskutiert: reduzierte Flavine bzw Ko-Faktoren wie FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>, Riboflavin [114], [115] oder NADH und NADPH [116]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Zugabe künstlicher Redoxmediatoren wie Chinone (2-Hydroxy-1,4-naphthochinon) die Reduktion von Azoverbindungen beschleunigt [117]. Sie ermöglichen eine extrazelluläre Reduktion von ionischen Substanzen wie sulfonierten Azofarbstoffen, die nur schwer oder gar nicht von Mikroorganismen aufgenommen werden können. Die indirekte extrazelluläre Reduktion von Azobindungen durch Hydrochinone ist unabhängig vom Grad der Sulfonierung und dem Molekulargewicht der Azoverbindung [102].

"Chinone sind als Redoxmediatoren besonders geeignet, wenn das Normalredoxpotential des Chinon-Hydrochinon-Paares in einem ca. 200 mV breiten Bereich ("Redoxpotentialfenster" zwischen  $E_0$  = -250 mV und -50 mV) liegt. Die untere Grenze dieses Bereichs ist

durch die enzymatische Reduktion des Chinons, die obere durch die Geschwindigkeit der abiotischen Azofarbstoffreduktion durch das Hydrochinon begrenzt [102]."

Der Einsatz künstlicher Redoxmediatoren erfordert keine speziell adaptierten anaeroben Kulturen. Es eignen sich Schlämme aus einer konventionellen kommunalen Kläranlage.

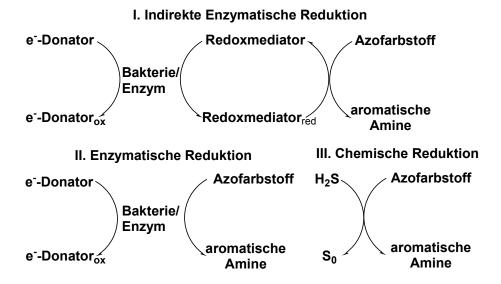


Abbildung 5: Mechanismen anaerober Reduktion [110]

Untersuchungen der anaeroben Reduktion von 20 unterschiedlichen Azofarbstoffen zeigten, dass die Reduktionsraten stark variierten [110]. Speziell an Reaktivfarbstoffe mit einer Triazylreaktivgruppe wurden vergleichsweise sehr geringe Reduktionsraten beobachtet. Die Zugabe katalytischer Mengen an Redoxmediatoren (Anthrachinon-2,6-disulfonat, Riboflavin) führte zu einer Verbesserung der Reduktionsrate. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Aussage, dass die Reduktion unabhängig vom Grad der Sulfonierung und dem Molekulargewicht ist [102]. Um die kontinuierliche Zugabe recalcitranter künstlicher Redoxmediatoren zu umgehen, kann Aktivkohle als nicht lösliche Alternative eingesetzt werden. Die vorhandenen chinoiden Verbindungen an der Aktivkohle wirken bei der Reduktion der Azofarbstoffe als Redoxmediatoren [110], [118].

Die Übertragung von Elektronen vom Redoxmediator auf den Azofarbstoff kann extra- oder intrazellulär erfolgen. Der Stofftransport ins Cytoplasma, wo sich die Redoxmediatoren befinden, ist wahrscheinlich der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der indirekten enzymatischen Reduktion. Dies belegen Untersuchungen mit Zellextrakten und lysierenden Zellen, bei denen eine schnellere Entfärbung beobachtet wurde als bei intakten bzw. lebenden Zellen [114], [119]-[120]. Der Grossteil der anaeroben biologischen Reduktion wird extrazellulär stattfinden und direkt durch periplasmatische Enzyme katalysiert oder indirekt über die Redoxmediatoren, die von periplasmatischen Enzymen regeneriert werden [110]. Liebelt und Hempel beschreiben die Reduktion und Entfärbung in einem anaeroben Batchreaktor zu 90% intrazellulär enzymatisch und ordnen lediglich 10% extrazellulären nicht-enzymatischen Vorgängen zu [121].

Bei der Färbung mit Vinylsulfon-basierten Reaktivfarbstoffen wird Sulfat abgespalten, das mit dem Hydrolysat im Abwasser vorliegt. Sulfatreduzierende Bakterien (Desulfurikanten) nutzen Sulfat oder elementaren Schwefel als Elektronenakzeptor bei der anaeroben Atmung (Sulfat-Reduktion, Desulfurikation) und reduzieren diese zu Schwefelwasserstoff. In Gegenwart von Azofarbstoffen als terminale Elektronenakzeptoren werden Sulfid zu elementarem Schwefel oxidiert und die Azobindung reduziert (siehe Abbildung 5, III.).

Tabelle 9: Redoxhalbpotentiale für verschiedene biochemische Redoxreaktionen bei pH 7 und 25°C

Redoxhalbpotentiale	E <sub>0</sub>	Transfer
(oxidiert/reduzierte Form)	[mV]	
2SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> /S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2H <sub>2</sub> O [122]	-574	2e⁻ + 4H⁺
NAD <sup>+</sup> /NADH+H[123]	-320	2e <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup>
S <sub>0</sub> /HS <sup>-</sup> [123]	-270	2e⁻+ H⁺
$S_0/H_2S$ [124]	-250	2e⁻ + 2H⁺
FAD /FADH <sub>2</sub> [123]	-220	2e⁻ + 2H⁺
FMN /FMNH <sub>2</sub> [123]	-220	2e⁻ + 2H⁺
C.I. Reactive Orange 96 /aromatische Amine [125]	-133	4e⁻ + 4H⁺

 $E_0 = U_{mes} + U_{Pt/AgCl}$  [mV];  $U_{Pt/AgCl}$  [mV] bei 20 °C: 210; bei 30 °C: 203; bei 40 °C: 196

Die Redoxpotentiale verschiedener bei der Reduktion von Azobindungen teilhabenden Redoxsysteme sind in Tabelle 9 gegenübergestellt. Die Reduktion des Reaktivfarbstoffs Reactive Orange 96 kann theoretisch mit allen aufgelisteten Redoxsystemen erfolgen [126]. Untersuchungen an Reinkulturen *Desulfovibrio desulfuricans* zur Entfärbung von C. I. Reactive Orange 96 und C.I. Reactive Red 120 zeigten, dass die Reduktion der Farbstoffe in Gegenwart und Mangel von Sulfat erfolgt. Unter Verwendung von Pyruvat unter Sulfatmangel sind wahrscheinlich die bei der Pyruvat-Fermentation freigesetzten Elektronen über Co-Enzym bzw. Redoxmediatoren für die Azoreduktion verantwortlich. Die Pyruvat-Fermentation korrelierte mit der Entfärbung der Azofarbstoffe [126], [127].

Tabelle 10: Redoxpotential-Schwellenwerte bei der Entfärbung von Azofarbstoffen

Schwellen- wert	Ø-E₀ [mV]	Bezugs- system	c <sub>Farbstoff</sub> behandelter Farbstoff (R. = Reactive)		Referenz
E₀ [mV]					
- 400	-	unbekannt	-	Orange II	[113]
- 500	-	Unbekannt		Amaranth	[113]
- 550	-	Unbekannt		Sunset Yellow	[113]
- 580	-	Unbekannt		Ponceau SX	[113]
- 620	-	Unbekannt		Ponceau 3R	[113]
- 670	-	Unbekannt		Tartrazine	[113]
- 400	-	Unbekannt	0,2 g L <sup>-1</sup>	Mordant Yellow 3	[128]
	-50 bis -250	Unbekannt	-	Amaranth	[102]
- 350*	- 350 bis- 450	Unbekannt	20 g L <sup>-1</sup>	R. Black 5, R. Red 198, R. Orange 107, R. Yellow	[121]
				25, R. Red 159, R. Dark Blue HRs	
250	200 bio 400	Dt/A aCI	0.00 mM		[404]
- 350	- 300 bis - 400	•	0,08 mM	Reactive Orange 96	[131]
- 200	- 200 bis - 400	Pt/AgCl	1,6 mM	Reactive Orange 96	[131]
- 420	-	unbekannt	5 g L <sup>-1</sup>	KKV-Restflotte (1:3)	[132]
- 450	- 450 bis - 500	Unbekannt	100 mg L <sup>-1</sup>	Reactive Red 141	[129]

\*Liebelt schreibt, dass etwa 90 % der Entfärbung der untersuchten Farbstoffe enzymatisch unter Sauerstoffausschluss erfolgt. Die verbleibenden 10 % des Umsatzes begründet er mit nicht-enzymatischen Vorgängen, die ab einem Redoxpotential zwischen – 350 und – 450 mV ablaufen. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, die mit anaeroben Biozönosen arbeiteten, wurde bei dieser Arbeit eine aerobe Biozönose aus der aeroben Klärstufe eines direkt einleitenden Textilveredelungsbetriebes herangezogen, die dann unter Luftabschluss in Erlenmeyerkolben durchgeführt wurden. Der Versuchsansatz wird damit begründet, dass die vorhandenen fakultativ anaeroben Bakterien sich unter Nährstoffmangel sehr schnell an die Farbstoffe adaptieren [121].

Das tatsächlich gemessene Redoxpotential im anaeroben Schlamm, bei dem eine Reduktion eines Azofarbstoffs beobachtet wurde, liegt im Bereich zwischen –100 und –400 mV. Die Tendenz zur Elektronenabgabe wird relativ zu der des molekularen Wasserstoffes angegeben. Als Bezugselektrode dient eine Standardwasserstoffelektrode. Technisch realisiert sind Platinmesselektroden mit AgCl-Bezugselektroden, wobei die Messwerte auf die Wasserstoffstandardelektrode umgerechnet werden müssen.

In vielen Publikationen ist die Bezugselektrode der angeführten Messwerten nicht beschrieben. Veröffentlichungen, die Bezug auf das Redoxpotential nehmen, verbinden das Absinken unter einen bestimmten Schwellenwert mit dem Entfärben der Azofarbstoffe. In Tabelle 10 sind Angaben zu Redoxpotentialen aufgeführt, die als Schwellenwert für eine anaeroben Reduktion bestimmt wurden.

Zur Einstellung des Redoxpotentials anaerober Mischkulturen werden dem System kontinuierlich C-haltige Co-Substrate zugeführt. Als geeignete Co-Substrate werden Acetat [133], Butanol [128], Ethanol [128], [133], Glucose [121], [128]-[130] Isopropanol [128], Hefeextrakt [14], [130] oder Pyruvat [126] zugeführt. Ungeeignet sind Aceton, Toluol, Chlorbenzol [128]. Methanol hat keinen Einfluss auf die Farbstoffreduktion [128]. Die teils im Abwasser enthaltenen Schlichtmittel lassen sich anaerob als leicht abbaubare C-Quellen verwenden, sind aber nicht in allen Färbereiabwässern enthalten.

#### 3.4.2.4 Anaerob-Aerobe Verfahren

Durch die Verbindung von anaeroben und aeroben Verfahren soll im ersten Schritt eine reduktive Spaltung der Azobindungen herbeigeführt werden. Im zweiten, oxidativen Schritt können die gebildeten aromatischen Amine weiter abgebaut bzw. mineralisiert werden. Die Kombination von anaerob und aerober biologischer Behandlung gliedert sich in zwei Bereiche, die sich durch die diskontinuierliche und kontinuierliche Prozessführung unterscheiden. In den diskontinuierliche "Sequencing Batch" Prozessen wird ein Bioreaktor abwechselnd anaerob und aerob betrieben, ohne einen Austausch der Biomasse. Der Aufbau kontinuierlicher anaerob-aerob Verfahren besteht aus ein oder zwei anaeroben Bioreaktoren und einem aeroben Bioreaktor. Die Aufsplittung der anaeroben Stufe in zwei Schritte begründet sich mit der Trennung von Versäuerungs- und Methanstufe. In der Praxis werden aus Kostengründen beide Stufen in einem Reaktor zusammengefasst.

In der akademischen Forschung und Praxisanwendung haben sich die kombiniertem zweistufigen anaerob-aerob Verfahren als am effizientesten hinsichtlich der Entfärbeleistung gezeigt. Einen Überblick zeigt Kapitel 3.4.3.

## 3.4.3 Entfärbeleistung anaerob-aerober Behandlungsverfahren

Die Untersuchung der Abbaubarkeit und Entfärbbarkeit von farbstoffhaltigen Abwässern wird hauptsächlich im Bereich der akademischen Forschung und Entwicklung vorangetrieben. Verfahren, die sich im Labor- und Technikumsmaßstab zur Entfärbung als geeignet erwiesen haben, konnten als praxistauglich im industriellen Bereich zur Abwasserbehandlung eingesetzt werden. In Tabelle 11 sind die Entfärbergebnisse der Behandlung von Modellund Realabwässern aus ausgesuchten akademischen und industriellen Anwendungen aufgelistet. Zur Vereinfachung sind die Durchsichtigkeitsfarbzahlen (DFZ) als gewichtete DFZ bezogen auf die gesetzlichen Wellenlängen nach Gleichung 1 berechnet. Der gemittelte Grenzwert für die Indirekteinleitung liegt nach dieser Berechung bei 5 m<sup>-1</sup>.

$$DFZ = \frac{DFZ_{436}^2 + DFZ_{525}^2 + DFZ_{620}^2}{DFZ_{436} + DFZ_{525} + DFZ_{620}} [m^{-1}] \quad Gleichung \quad 1$$

Bei den meisten Untersuchungen zur biologischen Entfärbung mit anaerob-aeroben Verfahren liegen die eingesetzten Farbstoffkonzentrationen im Milligrammbereich deutlich unter 1 g  $L^{-1}$  und im Bereich von DFZ < 1500  $m^{-1}$ . Aufgrund der großen Anzahl an Arbeiten

zur biologischen Entfärbung sind hier nur diejenigen Arbeiten genannt, bei denen die Behandlung von Konzentraten bzw. den industriellen Einsatz eines anaerob-aeroben Verfahrens beschrieben wird. Die erste grundlegende Untersuchung zur Entfärbung von Konzentraten liegt seit Ende 2004 vor [31]. Im Vergleich zu anderen biologischen Verfahren zur Entfärbung weitaus geringerer Konzentrationen werden bei dieser Arbeit sehr gute biologische Abbauraten verschiedener Textilabwasserkonzentrate erzielt, mit denen die Einhaltung der geforderten 95%igen Entfärbung als auch die Einhaltung der Durchsichtigkeitsfarbzahlgrenzwerte erzielt werden kann. Die bislang im industriellen Einsatz beschriebenen anaerob-aeroben Verfahren werden gekoppelt mit Membrantechnik zur Entfärbung verdünnter Textilmischabwässer eingesetzt [134].

Tabelle 11: Entfärbeleistungen ausgewählter kontinuierlicher anaerob-aerob Verfahren in Forschung und Industrie

						Anae	rob	Aero	b
			Verweil	zeit [d]					
Referenz	Verfahren	Abwasser	Anaerob	Aerob	Zulaufbelastung Σ DFZ [m <sup>-1</sup> ]	Σ DFZ [m <sup>-1</sup> ]	Entfärbung [%]	Σ <b>DFZ</b> [m <sup>-1</sup> ]	Gesamt- entfärbung [% ]
Sasours, 2004 [31]	Kontinuierliche anaerob-aerob,		4	4	5813	591	89,8	7,4	99,9
	Pilotanlage	(1:4) Restflotte KKV/Appretur (1:4)	10	4	3627	170	95,3	3,6	99,9
		Reaktiv-Druck- pastenreste	4	4	3171	848	73,3	21,5	99,3
		Reaktiv-Druck- pastenreste	10	4	19139	104	99,5	1,7	100
		Reaktivfarb- stoffkonzentrat	4	4	8932	278	96,9	11	99,9
Krull et al., 1999 [132]	Sequenced Batch, Laboranlage	Restflotte KKV/Appretur (1:3)	3	7	4810	1601	66,7	102	97,9
Döpkens, 2004 [134], Krull et Döpkens, 2004,[135]	Kontinuierlich anaerob- aerob- Ultrafiltration- Ozonisierung, Industrie- anlage	Mischabwasser Textilveredelung Recyclinstrom	1,5	0,1	52,3	15	72	6,8	87
	Kontinuierlich anaerob- aerob- Ultrafiltration, Industrie- anlage	Mischabwasser Textilveredelung Abwasserstrom	1,5	0,1	81,7	-	-	44,9	45

# 4 Prozessanalysentechnik in der Biotechnologie

Nach 1950 hat die chemische Analysentechnik eine rasche Entwicklung und eine dynamische Erneuerung erfahren. Durch die Kommerzialisierung von chromatographischen Instrumenten konnte eine Verkürzung der Analysenzeit, die Senkung der Nachweisgrenzen, die Miniaturisierung der analytischen Geräte und die Entwicklung von Gerätekombinationen erzielt werden, die unter der Bezeichnung Totale Analysensysteme (TAS) bekannt sind. Eine Reduzierung der Analysendauer um das 10000 fache und ein Absinken der Nachweisgrenze um eine Größenordnung pro Jahrzehnt sind nachweisliche Ergebnisse dieser Entwicklung. Mit der Entwicklung miniaturisierter Totale Analysensysteme (µTAS) besteht die Möglichkeit mobiler Analysatoren. Die Probe wird nicht mehr zum Analysator gebracht, sondern der Analysator unmittelbar zur Probe [136].

Prozesskontrolle hat neben der chemischen Industrie eine wachsende Bedeutung im Bereich der biotechnischen Herstellung von Chemikalien und pharmazeutischen Produkten [137]-[140]. Die von Widmer propagierte Meinung, dass sich die industrielle chemische Analysentechnik im Sinne einer in den Prozess integrierten Qualitätssicherung etablieren muss und auch unter ökonomischen Gesichtspunkten gegenüber der klassischen analytischen Qualitätssicherung rechtfertigen lässt, findet vermehrt Zuspruch [141]-[146].

Aktuelle Kostenvergleiche zwischen Labor- und Prozessanalyse zeigen, dass schon ab einer Analyse pro Tag eine Prozessanalyse kostengünstiger sein kann als eine Laboranalyse [142]-[144]. Anwendung findet die Prozessanalysentechnik in der verfahrenstechnischen Produktion in den Bereichen Prozessführung und Prozessoptimierung, Arbeitssicherheit, Anlagensicherheit und Umweltschutz. Die Investitionskosten für analytische und prozessanalytische Einrichtungen belaufen sich beim Neubau einer verfahrenstechnischen Anlage auf etwa 5% der Gesamtinvestitionskosten, wobei drei Beweggründe eine Rolle bei der Anschaffung von Prozessanalysenmesstechnik spielen: Profiterhöhung, Arbeits- und Betriebssicherheit und Minimierung negativer Einflüsse auf die Umwelt [145].

Tabelle 12: Instrumentelle Analysentechniken in der Bioprozessanalysenmesstechnik [140], [148]-[151]

Analysator	Einsatz
UV-VIS Spektrometer (UV-VIS)	Insitu und online Monitoring in der flüssigen Phase
Fluoreszens-Spektroskopie	Zellkonzentrationsmessung, Zellmetabolismus
Nuklear-Magnetische-Resonaz-Spektroskopie (NMR)	Zellmetabolismus
Fourier-Transformations-Nahinfrarot- Spektrometer (FT IR)	Insitu Monitoring in komplexen Matrizes, z.B. Fettsäuren in Bioreaktoren
Nah-Infrarot-Spektrometer (NIR)	Gasanalyse
Fourier-Transformations-Mikrowellen- Spektrometer (FT MW)	Gasanalyse (Ozon)
Biosensoren (Kombination eines	In-Situ-Einsatz zellfreier Lösungen, nahezu
Mikroorganismus, Antikörpers, Enzyms, etc. mit einem Messumformer)	Realzeitsignale bei hoher Selektivität

Die Prozessanalysentechnik dient der automatisierten Bestimmung von Stoffkonzentration, wobei die Probe automatisiert entnommen, aufbereitet und dem Analysengerät zugeführt wird. Im Unterschied hierzu werden bei einer Inline-Messung ein elektrischer oder optischer Sensor direkt in das Messmedium eingebracht und ein Konzentrationssignal geliefert [147]. Einen umfassenden Überblick über die Analysatoren, Anwendungen und Stand der Technik geben verschiedene Reviews [148]-[153].

In der Biotechnologie unterscheidet man bei der Online-Analytik von Fermentern Techniken zur Einzelstoffanalyse und zur Multikomponentenanalyse wie der Chromatographie, deren Einsatz bestimmt ist durch Anzahl der Analyten, Probenkomplexizität, Probenmatrix und Probenfrequenz [154]. Eine Unterstützung für die Weiterentwicklung und Optimierung prozessanalytischer Methoden wird durch die Initiative der Food and Drug Administration, USA (FDA) "Process Analytical Technologies" gegeben [141]. Sie hat zum Ziel, unter Einsatz von Prozessanalysentechnik Prozesse zu entwickeln und zu gestalten, die eine vordefinierte Produktqualität am Ende des Prozesses gewährleisten. Der Stand der Technik von Prozessanalysentechnik im Bereich von Fermentern, Bioreaktoren und Kläranlagen wird mit Schwerpunkt auf Probenahme, flüssigchromatographische Methoden und Einsatz von Massenspektrometrie bei flüssigen Proben im Folgenden dargestellt. Tabelle 12 gibt einen Überblick weitere prozessanalytische Techniken, die im Bioprozessmonitoring eingesetzt werden.

# 4.1 Online-Probenahmetechniken für flüssige Medien

In der Biotechnologie ist die Probenahme flüssiger Proben aufgrund der Zusammensetzung der Probenmatrix nur unter bestimmten Vorraussetzungen automatisierbar. Ziel ist es, mit geringer Verzögerungszeit eine repräsentative Probe ohne Analytverlust für die Analyse bereitzustellen [154]. Eine mögliche Online-Probenahmetechnik und Probevorbereitung ist die Filtration. Hierbei können je nach Porengröße des Filters Feststoffe von der Analyse ferngehalten werden.

Eine wesentlich selektivere Probenahmetechnik ist die Membrantechnik. Neben Feststoffen werden ab einer molekularspezifischen Trenngrenze (Molecular Weight Cut Off – MWCO) störende chemische Verbindungen zurückgehalten. Die Membraneinlasstechnik hat sich seit den 60iger Jahren im Bereich der Online-Probenahme in Kopplung mit der Massenspektrometrie zur Überwachung von Gasen und flüchtigen Verbindungen (z. B. Ethanol, Sauerstoff, Kohlendioxid) aus Bioreaktoren und Fermentern etabliert [155]. Sie ist auch die bei Bioreaktoren und Fermentern am häufigsten eingesetzte Probenahmetechnik zur Probenahme flüssiger Proben, die sich in verschiedene Techniken wie die Nicht-Membran basierte Probenahme, Dialyse, Elektrodialyse, Filtration (Mikro- und Ultrafiltration) und Membranextraktion untergliedern lässt [154], [156]-[159]. Die Membranextraktion ermöglicht neben der Probenahme eine spezifische und selektive Probenanreichung [159]-[160]. Einen umfassenden Überblick der Probenahmetechniken für Kopplung mit Massenspektrometrie gibt Lennemann [161].

Membranbasierte Probenahmesysteme unterscheiden sich im Mechanismus des Stofftransports durch die Membran. Bei Dialysemembranen ist der Konzentrationsgradient verantwortlich für den Stofftransport der Analyten durch die Membran, d.h. der Stofftransport wird nach dem Lösungs-Diffusions-Modell beschrieben. Untersuchungen zeigen, das die von den Herstellern angegebenen molekularen Membrantrenngrenzen bei Ultrafiltrations- und Nanofiltrationsmembranen neben dem Molekulargewicht stark von der chemischen Struktur (Solvathülle) und ihrem Lösungs-Diffusions-Verhalten in der Membran abhängig sind.

Die Mikrofiltration benötigt einen Druckgradienten, der zu einem konvektiven Stofftransport durch die Membran führt. Oftmals entwickeln diese Membranen durch Deckschichtbildung einen Lösungs-Difffusions-kontrollierten Anteil am Stofftransport. Das kann zu einem Ausschluss von höhermolekularen Verbindungen bei gleichzeitiger Durchlässigkeit für Ethanol oder Glukose führen [162]. Bei Einsatz von Membranen im biotechnologischen Bereich ist die regelmäßige Reinigung zur Aufrechterhaltung der Permeatflussleistung unbedingt erforderlich. Durch die Porenstruktur der Mikrofiltrationsmembranen im Bereich von 0,1 - 1 µm sind diese besonders für Verblockungen durch Partikel anfällig [154].

Bei der etablierten Online-Analysentechnik von Kläranlagen werden Ultrafiltrationsmembranen zur Probenahme für photometrische und potentiometrische Analyseverfahren eingesetzt [20]. Daneben werden auch Mikrofiltrationssysteme eingesetzt [163]. Andere

Verfahren nutzen die Sedimentation oder auch klassische Porenfiltereinheiten zur Abscheidung von Feststoffen aus der Probe [18]-[19].

In der Wasseranalytik (Oberflächengewässer, Trinkwasser, etc.) eingesetzte automatisierte Probenvorbereitungstechnik wie die Fest-Phasen-Extraktion (Solid Phase Extraction – SPE) und Fest-Phasen-Mikroextraktion (Solid Phase Microextraction – SPME) findet hauptsächlich Einsatz in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der klinischen Analytik [164]. Diese eignet sich auch zur automatisierten Probenahme in feststoffhaltigen Matrizes wie Klärschlamm. Wenn SPE oder SPME automatisiert sind und die Analyse in direkter Folge automatisiert durchgeführt wird, bezeichnet man diese Art der Probenvorbereitung als Online-SPE bzw. Online-SPME. Die Probenahme erfolgt offline. Riu et al., 1998 setzten eine automatisierte SPE als Probenvorbereitung für eine CE-UV und CE-MS zum Nachweis sulfonierter Azofarbstoffe in Grundwasser und Industrieabwässern ein. Bei einem Anreicherungsvolumen von 300-500 mL konnten Nachweisgrenzen von bis zu 10 μg L-1 für einen Farbstoff bei der CE-UV erreicht werden [80]-[81]. Eine der SPE verwandte Probenvorbereitung ist die Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD), wie sie von Dachtler et al., 2001 zur Extraktion von Lutein und Zeaxanthin Stereoisomeren aus Spinat und Retina in Kombination mit HPLC-MS und HPLC-NMR online eingesetzt wurde. Die Arbeit zeigt weiter, dass sich die MSPD gut zur Extraktion sauerstoff- und lichtempfindlicher Substanzen eignet [165].

2000 konnte Pretty erstmals ein elektrochemisches Verfahren (Electrochemically Modulated Preconcentration and Sample Matrix Elimination - EMPM) zur Online-Probenvorbereitung mit Matrixabtrennung und Aufkonzentrierung gekoppelt mit ESI-MS demonstrieren [166]. Dieses Verfahren stellt eine Alternative zu den klassischen Probenvorbereitungsverfahren dar, da durch die Variation des Potentials an der stationären Phase eine selektive Abgabe der Analyten erfolgen kann, die weitestgehend unabhängig von der Zusammensetzung des Eluenten ist. Ein Einsatz zur Beprobung von Bioreaktoren oder Fermentern wäre denkbar.

Neue Probenahmesysteme werden durch einen Zusammenschluss von akademischen und industriellen Analytikern aus den U.S.A. in der "New Sampling and Sensor Initiative" entwickelt [150]. Ziel dieser Initiative ist es, die Akzeptanz und den Einsatz modularisierter, miniaturisierter und kompakter Probenahmesysteme zu etablieren und auf Grundlage der Halbeiter Standards der Instrument Society of America für die Adaption an die chemische Industrie zu standardisieren. Der Einsatzbereich der entwickelten Module sind chemische Prozesse, die mit Hilfe von Realzeit-Prozessinformation optimiert und überwacht werden können.

#### 4.2 Summenparameterprozessanalysatoren

Wichtige online-messbare und abwasserrelevante Summenparameter im kommunalen und industriellen Kläranlagen, Bioreaktoren und Fermentern sind in Tabelle 13 aufgelistet. Als Messgröße für den Gesamtkohlenstoffgehalt und die damit verbundene organische Wasserbelastung einer flüssigen Probe wird der "Totale Kohlenstoffgehalt (Total Organic Content - TOC)" bestimmt. Der Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs wird über den "Dissolved Organic Content" (DOC), der Anteil des flüchtigen Anteils über den "Volatile Organic Content" (VOC) bestimmt . Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) schließt alle chemisch oxidierbaren Verbindungen ein, der BSB erfasst die biologisch oxidierbaren Verbindungen. Der Totale Stickstoff-Gehalt (TN) einer Probe erfasst den Anteil des gesamten gelösten organischen (so genannter Ammoniumstickstoff N-NH4) und anorganischen Stickstoffs (NOx).

Elektrochemische Sensoren sind im Bioprozess-Monitoring die häufigste eingesetzten Sensoren zur Bestimmung von pH-Wert und Sauerstoffkonzentration. Mit neuen Sensoren können über optische Messungen der Sauerstoffgehalt und gelöste Kohlenstoff bestimmt werden [167]. Die neuere Generation der on- bzw. inline UV-VIS-Spektrometer ermöglicht über die Messung spektraler Absoptionskoeffizienten einhergehend mit Methoden und

Kenndaten die Bestimmung von CSB. Über eine anwenderspezifische Kalibrierung erfolgt über die Umrechnung in TOC, DOC oder BSB [168].

Tabelle 13: Online messbare abwasserrelevanten Summenparameter

Messaufgabe	Online-Methode
pH-Wert	Potentiometrisch
TOC/VOC	Katalytische Verbrennung mit IR-Detektion (mit VOC-Kanal), Verdünnung und Filterung; UV-VIS
TN	Verbrennungs-/Chemilumineszenz-Methode
CSB	Oxidierung mit Ozon - Sensorische Sauerstoffmessung in der Gasphase, Elektrochemisch, Spektroskopisch
BSB	Erfassung als Kurzzeit-BSB (Respirationsrate)
DOC	Reinstwasser DOC (UV-Zersetzung und Leitfähigkeitsmessung)
UV-VIS	(inline) Xenon Blitzlampe mit DAD, Fiberoptische Spektrometer

### 4.3 Einzelkomponentenprozessanalysatoren

Die wesentlichen und für die Beurteilung eines Abwasserbehandlung kontinuierlich zu messenden Einzelparameter sind Stickstoff, Phosphat, Nitrit und Nitrat. Ihre Bestimmung wird in Kläranlagen mit biologischer Abwasseraufbereitung vornehmlich mit Systemlösungen umgesetzt. Sie ermöglichen es, die Reinigungsleistung betreffende Parameter parallel oder sequentiell kontinuierlich und kostengünstig zu erfassen [18]-[20]. Die Online-Erfassung der Parameter Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat erfolgt über Fliessinjektionsanalyse mit photometrischen oder potentiometrischen Verfahren. Regelungen und Steuerung für die Fällmittelzugabe (Phosphatreduzierung) und den Sauerstoffgehalt (Ammoniumkonzentration) können so realisiert werden. Mit dem Einsatz einer Datenfernübertragung können die Werte direkt an Umweltbehörden übermittelt werden [18]. Flüchtige Verbindungen wie Gase und VOCs werden über die Gaschromatographische, Massenspektrometrie oder Infrarot-Spektroskopie erfasst (siehe Tabelle 12 und Kapitel 4.4.2)

## 4.4 Mehrkomponentenprozessanalysatoren

# 4.4.1 Prozessflüssigchromatographie

Chromatographische Techniken wie die HPLC und GC werden im Aufgabenfeld des Bioprozessmonitorings aufgrund ihrer hohen Informationsdichte, Selektivität und der Möglichkeit zur Multikomponentenanalyse trotz ihrer relativen hohen Kosten und geringen Analysenfrequenzen (5 h<sup>-1</sup> bei HPLC) als favorisierte Techniken angesehen [139]. Als Nachteil der HPLC mit ihren unterschiedlichen Detektoren wird die lange Analysendauer genannt. Einen Rückblick auf die Fortschritte des Monitorings und der Kontrolle von Bioprozessen der letzten 20 Jahre gibt Schügerl, 2001 [140]. Als einen weiteren Grund für die lange Analysendauer bei biologischen Proben nennt er die Probenvorbereitung zur Abtrennung störender Proteine, die zu einer verkürzenden Lebensdauer der analytischen Säule führen. Chromatographische Online-Bioprozessmonitoring-Systeme werden hinsichtlich akademischer und industrieller Anwendung und Entwicklung unterschieden.

Die akademische Forschung hat im Bereich der Fermentertechnik Anfang der 90iger Jahre an der Universität Witten-Herdecke einen Bioreaktor entwickelt, der unter Einsatz von online betriebener HPLC und Free-Flow-Elektrophorese selbstoptimierend betrieben werden konnte [169]. Aus der gleichen Arbeitsgruppe wurde 1994 eine Online-HPLC-Aminosäureanalytik vorgestellt, die zur Steuerung und sogar Regelung benutzt werden kann [170]. Die Kombination von online Ultrafiltration gekoppelt mit HPLC und UV-VIS-Detektor sowie

Refraktometer zur Prozessüberwachung einer *Aspergillus niger* Fermentation wurde von van de Merbel et al. dargestellt [171].

Eine online Analytik durch HPLC für die Bestimmung der Zusammensetzung von Fermentationsmedien stellten Höttecke et al., 1996 vor. Die online HPLC wurde in dieser Arbeit für eine Regelung der Substratkonzentration in Bioreaktoren genutzt. Wichtige Voraussetzung dafür war die Abstimmung von Totzeiten und Analysezyklen auf die Kontrollzeit [172]. Liu et al., 2001 erprobten ein PC basiertes online Monitoring und ein Steuerungssystem für Fermentationsprozesse. Ein automatischer Probenehmer wurde an ein HPLC-System gekoppelt, den man über eine Steuerungssoftware automatisierte. So konnten verschiedene Parameter wie Rührergeschwindigkeit, Gasfluss, pH-Wert, Feed-Fluss und Glucose- sowie Ethanol-Konzentration online gemessen werden [173]. Weitere chromatographische Anwendungen mit Kopplung an membranbasierte online Probenahme diskutiert van de Merbel [159].

Tabelle 14: Kommerzielle Anbieter von Prozesschromatographen

Hersteller	Bezeichnung	Detektoren	Anwendungsgebiete
Bayer Technology Services	Baychro <i>MAT</i> ® (GC, HPLC, GPC)	unbekannt	Bestimmung der Molmasse in Polymeranlagen, Prozesskontrolle, Nebenkomponenten im ppm-Bereich, Isomerenbestimmung
Dionex	DX 800 Prozesschromatograph (LC)	UV-, Leitfähigkeits-, und Elektrochemischer Detektor	Spurenbestimmung in Reinstwasser, org. Säuren bei Nylonherstellung, Nitrit/Nitrat Kläranlage, Fermenter-Monitoring
Agilent	6850, 6890, Micro GC 3000	Wärme-Leitfähigkeits- Detektor (WLD), Flammen-Ionisations- Detektor (FID), Stickstoff- Phosphor-Detektor (NPD), S-Detektor, Heliumionisations- Detektor (HID)	Gasanalyse, VOCs
Siemens	MicroSAM Prozess- Gas-Chromatograph, MAXUM edition II	WLD, FID, Flammen- photometrischer Detektor (FPD), Elektroneneinfang- Detektor (ECD), HID, Elektrolytischer Leitfähigkeits-Detektor (ELCD)	Gasanalyse, VOCs

Neben dem akademischen Bereich der online HPLC zur Prozesskontrolle bzw. Prozessmonitoring im biologischen Prozessen werden online HPLC-Methoden auch in der Umweltanalytik eingesetzt. Entwicklungen aus der umweltanalytischen Forschung zielen auf eine automatisierte Target-Analyse zur Abwasserüberwachung ab. Die meisten Methoden beruhen auf einer automatisierten Festphasenextraktion (SPE) oder Immunosorbentien zur Probenvorbereitung und Anreicherung von Abwasserinhaltsstoffen (Nitroaromaten, aromatische Amine, etc.), flüssigchromatographischen Trennung und Kopplung mit Dioden Array Detektion und Massenspektrometrie. Die Probenahme erfolgt offline, so dass diese

Verfahren insgesamt nicht zu den vollautomatisierten kontinuierlichen online Verfahren gezählt werden [174]-[176].

Die Weiterentwicklung der LC-MS-Technik hat dazu geführt, dass im Bereich der Umweltanalytik Screening-Methoden zur simultanen Target-Analyse von 100 Pestiziden entwickelt wurden [177]. Die Entwicklung monolithischer Säulen und 1,8 µm-Säulenmaterials (Zorbax Rapid Resolution HT Columns, Agilent) ermöglicht durch die Einführung von sogenannten High-Speed- und High-Through-Put-Analysen die zeitliche Optimierung vieler Methoden beim pharmazeutischen Screening [178], [179].

Die Anwendung eines industriell eingesetzten, vollautomatisierten, kontinuierlichen, online Systems zur Überwachung des Kläranlagenzulaufs ist bei der BASF in Ludwigshafen bekannt [180]. Mit Hilfe eines automatisierten HPLC-DAD-Systems mit dem Namen Hydra (Hydrophilen Analysator) wird im 30-Minuten-Takt der Abwasserzulauf der Werkskläranlage auf polare Abwasserinhaltsstoffe aus den Produktionsabwässern einem Monitoring unterzogen. Bei Überschreitung von Grenzwerten einzelner Verbindungen kann der belastete Abwasserteilstrom nach Bedarf in Auffangbehältern zwischengelagert werden, um die Kläranlage vor Stossbelastungen zu schützen. Parallel wird ein GC-MS mit Wasseraufgabe (ARGUS - Analysensystem zur Registrierung gefährlicher oder ungewöhnlicher Stossbelastungen) betrieben, die zur Überwachung der Konzentration flüchtiger Verbindungen im Abwasser dient [181]. Viele der industriell eingesetzten Methoden und ihre Anwendungsbereiche sind unveröffentlicht, da der Einsatz prozessanalytischer Verfahren ein Know-how-Vorteil gegenüber Konkurrenten darstellt. Zur Vervollständigung sind in Tabelle 14 verschiedene kommerzielle Anbieter von Prozesschromatographen und ihre Anwendungsgebiete dargestellt.

#### 4.4.2 Prozessmassenspektrometrie

Bereits in den 80iger Jahren beschreiben Scrivens und Ramage die Entwicklung der online Massenspektrometrie [183]. Zu diesem Zeitpunkt hat sie sich bereits in der Multikomponentengasanalyse etabliert. Die Standardausstattung bestand aus einem Elektronenstoss-Ionisierungsquelle (EI), Quadrupol Massenspektrometer und Farraday-Cup-Detektor oder Elektronenvervielfacher. Die Schwerpunkte der Anwendung von online Massenspektrometrie gliedern sich in die drei Analysenbereiche:

- Gase und flüchtige Verbindungen
- Pyrolyse
- nicht-flüchtige Verbindungen in flüssigen Proben

Ein Übersicht über die Massenspektrometrie in der Biotechnologie mit Schwerpunkt auf Gase, flüchtige Verbindungen und Pyrolyse zur Überwachung und Kontrolle von Bioreaktoren und Fermentern geben Heinzle et Reuss und Heinzle [184]-[185]. Der aktuelle Stand ist in verschiedenen Zusammenfassungen enthalten [148]-[150]. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten beschreiben den Einsatz der Online-MS zur quantitativen Analyse flüchtiger Verbindungen in der Lebensmittelüberwachung wie der Acrylamidbildung mittels Proton-Transfer-Reaction-MS [186], Laser-MS als Online-Sensor zur Prozessüberwachung von Aromastoffen bei der Kaffeeröstung und im Bereich der Umweltanalytik zur Raumluftüberwachung auf Anästhesiegase in Postanästhesiepflegeräumen mit Proton-Transfer-Reaction-MS [187]. Der Vorteil von chemischen Ionisierungsmethoden (Chemical Ionization Mass Spectrometry – CIMS) wie der Proton-Transfer-Reaction-MS liegt in der Form der selektiven und weichen Ionisierung einzelner Verbindungen in komplexen Gemischen, bei der eine geringere Fragmentierung erfolgt als bei der klassischen EI [188].

Die Analyse schwer und nicht flüchtiger Verbindung aus flüssiger Probe erfordert die LC-MS-Kopplung mittels Interfacetechniken wie "Electrospray Ionisation" (ESI) Interface, "Atmospheric Pressure Chemical Ionisation" (APCI) Interface oder "Atmospheric Pressure Photo-

ionisation" (APPI) Interface. Kopplungen von ESI-MS oder APCI-MS mit automatisierter Probenahme zur Online-ESI/APCI-MS im Bereich der Biotechnologie sind nicht bekannt.

Schügerl bezeichnet die online LC-MS im Jahr 2001 als nicht durchführbar, da die Probenvorbereitung Erfahrung und Zeit benötigt [140]. Die Hauptproblemstellung für die Umsetzung von Online-ESI/APC/APPI-MS-Methoden ist wie in der Offline-LC-MS die Reduktion von Matrixeffekten, die die Ionisierung stören und zu wenig empfindlichen und schlecht reproduzierbaren Messungen führen. Trotz der enormen Entwicklung dieser Technik bei der Analyse schwer und nicht flüchtiger Verbindung aus flüssiger Probe, wird die Anwendung in der Prozess-Massenspektrometrie zur Zeit aufgrund der nicht ausreichenden Genauigkeit und Präzision in der Quantifizierung in Frage gestellt [189].

Einige aktuelle Arbeiten zeigen, dass sich die Online-LC-MS in verschiedenen Bereichen als Prozessanalysentechiken einsetzen lässt. Ferguson et al. entwickelten eine ESI-MS-Methode zur Bestimmung von drei steroiden Estrogenen in Abwasser in Kopplung mit einer Immunoaffinitätsextraktion. Der Einsatz der hochselektiven Immunosorbentien erlaubt eine nahezu vollständige Matrixeliminierung, die in Wiederfindungsraten von >90 % widergespiegelt werden [190]. Nahezu Echtzeit-Online-Massenspektrometrie mit Membraneinlasstechnik (MIMS) wurde zur quantitativen Bestimmung von Methanol in wässrigen und gasförmigen Proben benutzt. Die Membran trennt dabei das unter Vakuum stehende EI-MS von der Probenahmestelle. Der Stofftransport des Methanols durch die Membran erfolgte nach dem Prinzip der Pervaporation [191]. Eine Anwendung in der industriellen Prozessüberwachung zur Online-Multikomponentenanalyse von Spuren-Kontamination in der Halbleiterherstellung wird in Form eines "In-Process Mass Spectrometry Trace Contamination Analyzers (IPMS TCA)" mit einem ESI-TOF-MS beschrieben [192]. Den aktuellen Stand der Gerätetechnik in der LC-MS beschreibt [193].

In der quantitativen Prozess-Massenspektrometrie spielt die "day-to-day"- und die "period-to-period"-Reproduzierbarkeit eine enorme Rolle, da eine hohe Genauigkeit und Richtigkeit des Analysenwertes Vorraussetzung in der Prozessanalyse ist. Die Entwicklung von Modellen zur Beurteilung und Einschätzung der wechselnden Empfindlichkeit von Massenspektrometern soll helfen, Vorhersagen für Genauigkeit von Messwerten treffen zu können [194].

#### 4.4.3 Multiprozessanalysatoren

In der Bioprozessanalytik erweist sich der parallele Einsatz von Mehrkompontenanalysatoren und die datentechnische Auswertung mittels multivariater statistischer Datenanalyse als äußerst effektiv für das Monitoring von biologischen Prozessen in Bioreaktoren und Fermentern. Unter Einsatz einer elektronischen Nase (EN), eines Nahinfrarotspektrometers (NIRS) und eines Massenspektrometers konnte ein Modell zur Bioprozesskontrolle entwickelt und am realen Prozess validiert werden [195].

"Da viele biologisch relevante Parameter bei einer Kultivierung oftmals gar nicht oder nur schwach direkt bestimmt werden können, wendet man zunehmend so genannte Softwaresensoren an. Mit Hilfe von z.B. Luenberger- oder Kaman-Filtern kann aus den erzielten Messdaten der Status der betrachteten Prozesse vorhergesagt werden, auch wenn direkte Messdaten z.B. der Substratkonzentration nicht zur Verfügung stehen. Mit Hilfe neuronaler Netze oder auch der Hauptkomponentenanalyse können weiterhin Daten vorangegangener Prozesse genutzt werden, um einen aktuellen Prozess zu bewerten [162]."

# 5 Prozessanalytische und verfahrenstechnische Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung für das prozessanalytische Monitoring des biologischen Abbauverhaltens ausgesuchter Azofarbstoffe teilt sich in zwei Aufgabengebiete. Im ersten Teil wird die Entwicklung und Etablierung eines instrumentellen Analysenverfahrens mit massenspektrometrischer Detektion beschrieben. Schwerpunkt sind die Probenahme, flüssigchromatographische Trennung und Detektion. Der zweite Teil beschreibt das biologische Verfahrenskonzept, welches gekoppelt mit dem prozessanalytischen Verfahren zur Überwachung des Farbstoffabbaus eingesetzt werden soll.

#### 5.1 Chemikalien und Standards

Die zur Chromatographie eingesetzten Chemikalien wie Ammoniumacetat (zur Analyse), Ameisensäure (zur Analyse), Wasser (HPLC-grade LiChrosolv®) und Acetonitril (LiChrosolv® gradient grade) wurden von Merck, Darmstadt bezogen oder von Carl Roth, Karlsruhe ROTISOLV, HPLC Gradient Grade Wasser und ROTISOLV, Acetonitril ≥99,9 %. Das Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumacetat (TBAAC) (Reinheit >99%) stammte von Fluka, Buchs (Schweiz).

Abbildung 6: Strukturformeln der Standardsubstanzen

Die zur Kalibrierung und Methodenevaluierung eingesetzten Referenzsubstanzen wie aromatische Amine, sulfonierte aromatische Amine und sulfonierte Azofarbstoffe wurden von DyStar, Leverkusen zur Verfügung gestellt und sind in Abbildung 6 strukturmäßig dargestellt. Die Bezeichnung der Farbstoffe wurde aus den Colour Index (C.I.) abgeleitet. Im weiteren wird auf die Abkürzung C.I. verzichtet. Eine Referenzprobe für TAHNDS<sub>DP2</sub> wurde aus Flüssigkeit des anaeroben Bioreaktors im Labor hergestellt. Die Zusammensetzung der Standardlösung ist in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Standardlösung \*STDL – Stammlösung, \*\*STL-Qualitätskontrolle (Angabe der Molekulargewichte für die Na-Salzform der Sulfonsäuregruppen)

Nummer	Name	MW	Abkürzung	Reinheit [%]	c STDL* [µM]	c STL** [µM]
1	Sulfanilsäure	195,2	SS	98	5000	100
2	Metanilsäure	195,2	MS	98	5000	100
3	Orthanilsäure	195,2	OS	86	5000	100
4	N-acetyl-p-Base	243,3	NAPB	60	500	10
5	p-Base	201,2	PB	60	5000	100
6	H-Säure	363,3	HS	82,5	500	10
7	RB-OH	575,5	RB-OH	60	2500	50
8	RB-NH <sub>2</sub>	575,5	RB-NH <sub>2</sub>	60	2500	50
9	RB5-Hydrolysat	787,4	RB5-H	73	2500	50
10	RO16-Hydrolysat	493,5	RO16-H	40	2500	50
11	RO107-Hydrolysat	515,5	RO107-H	40	2500	50
12	4,6-Dihydroxy-3,5- Diiminonaphthalin-2,7- disulfonsäure	392,3	TAHNDS <sub>DP2</sub>	50	5000	100
13	Direct Blue 71	1030	DB71	50	2500	50
14	Acid Orange 7	375,4	AO7	50	2500	50

#### 5.2 UV-VIS-Messungen und CSB-Bestimmung

Zur Bestimmung der spektralen Absorption der Abwasserproben wurde ein Einstrahlspektrometer Lamnda 10 der Firma Perkin Elmer eingesetzt. Nach geeigneter Verdünnung der Probe wurde die Absorption in einer 1 cm Quarzküvette im Wellenlängen-Bereich von 200 bis 800 nm mit einer Auflösung von einem Nanometer bestimmt.

Die Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) wurde mit standardisierten Küvettentests der Firma Dr. Lange, Düsseldorf nach Anleitung durchgeführt. Die oxidierbaren Bestandteile der Probe werden bei diesem Test in Schwefelsäure von Kaliumdichromat oxidiert. Über ein Photometer kann der CSB bestimmt werden. Vor der Bestimmung des CSBs wurden die Abwasserproben verdünnt, um den hohen Salzgehalt zu verringern. Nachfolgende CSB Küvetten-Tests wurden eingesetzt: LCK014 Messbereich 1000-10.000 mg L<sup>-1</sup> und LCK114 Messbereich 150-1000 mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.3 Untersuchte Farbstoffe und Abwässer

Als Modellfarbstoff für die biologische Behandlung von azofarbstoffhaltigen Abwasser-konzentraten wurde der weltweit zur Reaktivfärbung eingesetzte Farbstoff Reactive Black 5 ausgewählt. Zu diesem Farbstoff liegen bereits Untersuchungen zur biologischen Entfärbung und auch mit anderen chemisch-physikalischen Verfahren vor [3], [14]-[15], [45]-[46], [85]. Mit einer Jahresproduktion von ca. 50.000 pro Jahr ist er der am meisten hergestellte Azofarbstoff [3]. Für die mechanistischen Untersuchungen wurde der Farbstoff unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert (43g NaOH auf 500g Farbstoff), mit Schwefelsäure neutralisiert und für den Versuch in einer entsprechende Konzentration eingestellt. Die Daten sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung Modellabwässer und Realabwässer

Modellkonzentrat Einwaage [g L <sup>-1</sup> ] Reinheit 70%	te (20 g <sub>NaCl</sub> L <sup>-1</sup> ) RB5-H [mM]		525	585	620
7,6	5,5	5775	10806	22228	19217
15,2	11	15531	23473	44152	38171

Aufschluss über die Begleitverbindungen im Hydrolysat des Farbstoffes ergab eine chromatographische Trennung mit anschließender Dioden-Array- und massenspektrometrischer Detektion, die mit Hilfe des im folgenden beschriebenen Analysenverfahrens identifiziert werden konnten (Säule: AQ, Methode: Monitoring-Methode). In Abbildung 7 (links) ist das für ein Hydrolysat typische Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 585 nm dargestellt. Neben dem hydrolysierten Farbstoff, der einen Anteil von rund 78 % besitzt, konnte die teilhydrolysierte Komponente RB5-HV mit rund 12 % und das Farbstoffdimer Di-RB5-H mit 10 % Anteil nachgewiesen werden. Weitere Nebenverbindungen haben an der Farbigkeit beu 585 nm nur einen vernachlässigbaren geringen Anteil.

Als Beispiel für die Zusammensetzung eines realen Abwassers aus der Textilfärbung ist in Abbildung 7 (rechts) ein Chromatogramm im Wellenlängenbereich von 210 bis 800 nm dargestellt. Es handelt sich um eine Ausziehflotte, bei der eine Farbstoff-Trichromie eingesetzt wurde. Die drei eingesetzten Reaktivfarbstoffe entsprechen denen, die in der Stammlösung zu finden sind: RB5-H, RO16-H und RO107-H. Die Analyse zeigt, dass neben den hydrolysierten Farbstoffverbindungen (RB5-H, RO16-H und RO107-H) auch teilweise Farbstoffe in der noch nicht hydrolysierten Vinylform nachzuweisen waren (RB5-HV, RO16-V, RO107-V). Neben den Farbstoffen ließ sich mit 0,5 % Peakflächenanteil in geringer Konzentration p-Base identifizieren.

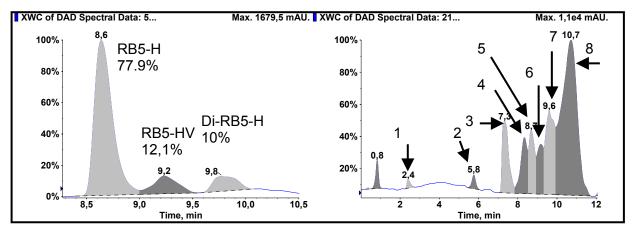


Abbildung 7: Links – Chromatogramm (585nm) des Modellabwassers bestehend aus hydrolysiertem Reactive Black 5 und Nebenfarbstoffen; Rechts – DAD-Chromatogramm (215 - 800 nm) eines Realabwassers aus der Reaktivfärbung mit: 1 – p-Base (0,5 %), 2 – Unbekannt (1,1 %), 3- RO107-H (9,9 %), 4 - RO16-V (7,9 %), 5 - RB5-H (7,7 %), 6 - RB5-HV (6,4 %), 7 - RO107-V (15,4 %), 8 - RO16-H (51 %)

#### 5.4 Online-HPLC-MS/MS-Analysenmethode

In Abbildung 8 ist der Aufbau des Analysenverfahrens zum kontinuierlichen Monitoring und zur Prozesskontrolle des anaerob-aeroben Abwasserbehandlungsverfahrens dargestellt. In den Bioreaktoren befinden sich mikrofiltrationsbasierte Inline-Sonden über die mit einer Zweikanalschlauchpumpe (Pumpe 1) kontinuierlich Probe entnommen wird. Die Filtrate werden jeweils separat in Entgaser gepumpt, aus denen sie mit einer definierten Flussrate von Kolbenpumpen (anaerob: Pumpe 2, aerob: Pumpe 3) in Kapillaren eingespeist werden, die an Ventil 1 angeschlossen sind. Für die Verbindung der Probenahme im Erdgeschoss

zur HPLC in der 1. Etage werden Kapillaren aus 75m 1/16" I.D. 0,5mm PEEK verwendet. Je nach Ventilstellung wird das Filtrat des anaeroben oder aeroben Reaktors zu Ventil 2 gepumpt, wobei das andere Filtrat parallel in einen Sammelbehälter gepumpt wird. In Ventil 2 durchläuft das Filtrat eine Injektionsschleife (4,7 µL Injektionsvolumen) und wird in den Sammelbehälter geführt. Die Pumpen 1-3 werden manuell bedient. Die Ventile 1 und 2 lassen sich über die LC-MS-Methode in der Gerätesoftware Analyst 1.4 ansteuern. Die binäre HPLC-Pumpe (Pumpe 4) fördert die Eluenten ebenso über Ventil 2. Durch Umschalten des Ventil 2 erfolgt die Injektion der Probe auf die HPLC-Säule. Der chromatographischen Trennung ist ein Diodenarray-Detektor (DAD) nachgeschaltet. Das aus dem DAD austretende Eluat wird zu Ventil 3 geführt, das über die Methode gesteuert wird.

Tabelle 17: Gerätespezifikationen des Online MF-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS-Analysenverfahrens

Gerät	Тур	Hersteller	Bemerkung
Inline Probe-	ESIP 5441 (anaerob) ESIP 5442 (aerob)	Trace Biotech, Braunschweig	Mikrofiltrationsmembranen (Porengröße 3 µm) mit
nahme- sonde			Isopropanol/Wasser (v/v 70/30) bei 1 mL min <sup>-1</sup> zwei Stunden vorkonditionieren
Pumpe 1	Peristalikpumpe, Reglo- Digital, MS-4/12-100	Ismatec, Wertheim- Mondfeld	Tygon-Schläuche I.D. 1,02 mm
Entgaser	-	Trace Biotech, Braunschweig	
Pumpe 2, 3	Isokratische HPLC-Pumpe K-120	Knauer, Berlin	
Ventil 1 Ventil 2	6-Port-2-Wege-Ventil HPLC internes Ventil	Vici Valco Agilent, Waldbronn	
Ventil 3	LC-MS internes Ventil	Applied Biosystems, Darmstadt	
HPLC	1100 Entgaser 1100 G1312A Binäre Pumpe 1100 G1313A automatischer Probengeber	Agilent, Waldbronn	
Säule	1100 G1316A Säulenofen Siehe 0 und 5.4.4		
DAD	1100 Dioden Array Detektor	Agilent, Waldbronn	Spaltbreite 4, Scan- Frequenz 1.25 Hz)
Suppressor	753 Suppressor Module mit drei Kanälen	Metrohm, Herisau, (Schweiz)	Kationen-Kapazität: 250 µM
	(abwechselnd Suppression, Regeneration, Spülung)		Regeneration: 1 mL min-1 0.2 mol L-1 H2SO4 Wasser-Aceton (80:20, v/v), Spülung: 1 mL min-1 Wasser-Acetonitril (95:5, v/v),
ESI-MS/MS	Qtrap	Applied Biosystems, Darmstadt	Hybrid-Triple-Quadrupol- Massenspektromter mit linerar lonenfallenfunktion (LIT)

In Ruhestellung wird das Eluat in den Abfallsammelbehälter geführt. In Aktivstellung durchläuft es den Kationensuppressor, um die Tetrabutylammonium-Ionen des eingesetzten Ionenpaarreagenz vor dem Eintritt in das ESI-Interface abzutrennen. Die Injektion in das ESI-MS/MS erfolgt nach dem Splitten des Eluats im Verhältnis 1:4 (200 µL min<sup>-1</sup>). Detaillierte Angaben zu den eingesetzten Geräten sind in Tabelle 17 aufgelistet. Sämtliche automatisierte Geräte (Ventil 1-3, HPLC, DAD, Suppressor und ESI-MS/MS) werden über die Methoden in der LC-MS-Software Analyst 1.4 (Applied Biosystems) programmiert und gesteuert.

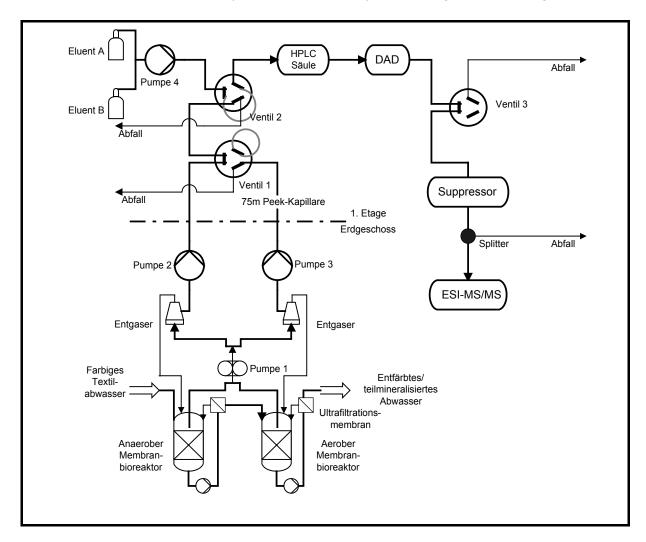


Abbildung 8: Aufbau des Online-MF-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS zum Monitoring des anaerob-aeroben Abwasserbehandlungsverfahrens

Die Einstellungen des ESI-MS/MS sind im folgenden für die Monitoring-Methoden dargestellt. Abweichende Einstellungen sind im Text angegeben.

Das ESI-MS/MS wird mit einem Splitverhältnis von 1:4 mit einer TurbolonSpray Ionenquelle (ESI) im negativen Ionenmodus unter den folgenden allgemeinen Einstellungen betrieben (Angaben in englischer Sprache wie in der Gerätesoftware):

- Absolutdruck (Vacuum Gauge): 1,33 (3,7) mPa,
- Temperatur (Temperature): 400 °C (bei Ionenpaarchromatorgaphie mit nachgeschalteter Ionensuppression) und 500°C (bei Chromatographie auf Säulen mit polarer Selektivität),
- Vorhanggas (Curtain gas): 276 kPa,
- Gas zur kollisionsinduzierten Dissoziation (collisionally activated dissociation - CAD): 34.5 kPa,
- Ionensprayspannung (Ion Spray Voltage): -4500 V,

- Vernebelungsgas (Nebulizer Gas GS1): 310 kPa,
- Turbogas (Turbo Gas GS2): 552 kPa.

Alle eingesetzten Gase werden mit einem Stickstoffgasgenerator der Firma PEAK Science, Schottland aus Luft generiert und bestehen laut Hersteller aus Stickstoff mit einer Reinheit von 99,999 %. Die allgemeinen Einstellungen der genutzten Scan-Modi waren (Q – Quadrupol, Enhanced Modus = Q3 in der linearen Ionenfallenfunktion, zusätzlich die Angaben in englischer Sprache wie in der Gerätesoftware):

(1) Multireaktionsüberwachungsmodus (Multiple Reaction Monitoring Modus -MRM):

Auflösung Q1 (Resolution) Unit,

Auflösung Q3 (Resolution): Unit,

Detektorspannung (Negativmodus, Channel Electron Multiplier - CEM ):2300 V

- (2) Erweiterter Full-Scan-Modus (Enhanced MS Modus EMS) und (3) Erweiterter Produktionenmodus (Enhanced Product Ion Modus EPI). Q1 wird als Standard-Quadrupol Massenspektrometer und Q3 in der linearen Ionenfallenfunktion (LIT) unter den folgenden Konditionen betrieben:
  - Scanrate: 4000 u s<sup>-1</sup>
  - Q0 Falle: "ein"
  - lineare lonenfallenfüllzeit (LIT fill time): 20 ms
  - Dynamische Füllzeit (Dynamic Fill Time): "ein", 2-150 ms
  - Q3 Eingangsbarriere (Entry Barrier): 8 V
  - Scanbereich (Scan Range): 100-1000 u
  - Entclusterungsspannung (Declustering Potential DP): -90 V
  - Eingangsspannung (Entrance Potential EP): -10 V
  - Kollisionsenergie (Collision Energy CE): -20 V

Die Einstellungen bezüglich der Entclusterungsspannung (DP), Eingangsspannung (EP) und der Kollisionsenergie (CE) im EPI/EMS-Modus können wechseln und sind, wenn erforderlich, im Text angegeben.

#### Online-LaChrom-Analysensystem

Bedingt durch die zeitlichen Entwicklung der Geräteanschaffung im Laufe der Versuchsreihen, wurde ein Teil der Arbeiten zur Untersuchung der Membrancharakterisierung und Probenahmetechniken mit einem anderen HPLC-Gerät durchgeführt. Die Versuchsanordung zur Untersuchung der Membranen ist im entsprechenden Kapitel 5.4.1 dargestellt und erläutert. Diese Untersuchungen wurden mit einem LaChrom® Hitachi System von Merck, Darmstadt durchgeführt. Die dazu eingesetzten Geräte waren:

- Niederdruckgradientenpumpe L-7100
- Automatisierter Probengeber L-7250 (für off-line Injektionen)
- Säulenofen L-7450
- Dioden-Array Detektor L-7450A

Alle Geräte waren über das Dateninterface L-7000 verbunden, das über die Merck La Chrom HSM-Software D-7000 unter Windows NT 4.0 betrieben wurde. Die Wahl der chromatographischen Säule ist im Text erklärt. Standardmäßig wurde eine 25 x 4 mm LiChroCART  $^{\odot}$  HPLC-Säule (LiChrospher 60 RP-select B, 5  $\mu$ m) von Merck mit einer Select B Vorsäule bei konstant 40°C eingesetzt, die etwa alle 1000 Injektionen getauscht werden mußte.

Als Eluent A wurde ein Acetonitril-Wasser-Gemisch mit 1 mM Tetrabutyammoniumhydrogensulfat (TBAHS - 10:90, v/v) und als Eluent B Acetonitril eingesetzt. Die Gradienten sind auf Seite 52 in Abbildung 12 dargestellt.

#### 5.4.1 Membranbasierte Online-Probenahme

Bei Überwachung der Gase und flüchtigen Verbindungen aus Fermentern und Bioreaktoren werden zur Beprobung ausschließlich Membranen in Kopplung mit Prozessmassenspektrometern eingesetzt (siehe Kapitel 4.1). Mikro- oder Ultrafiltrationsmembran basierte Probenahmeverfahren eignen sich besonders für kontinuierliche Beprobung und bieten ausreichend Probe an, um verschiedene prozessanalytische Instrumente anschließen zu können [20], [159]-[160]. Für eine Kopplung an HPLC mit Dioden Array Detektor und massenspektrometerischen Detektor wurden zwei membranbasierte Probenahmesysteme untersucht, die die folgenden Kriterien erfüllten:

- Einsatz im Dauerbetrieb
- Geringes Membranfouling
- Geringer Wartungsaufwand
- Konstante Membranflusscharakteristik
- Geringes Totvolumen, kleine hydraulische Verweilzeit

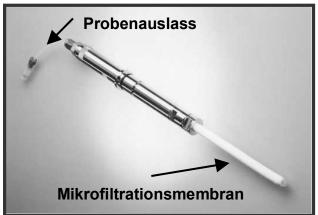
Die Voraussetzungen und Anforderungen an die bereitgestellte Probe waren:

- Sauerstofffreiheit der Probe (anaerober Bioreaktor)
- Vollständige Abtrennung von Biomasse und sonstigen Feststoffen
- Reproduzierbare Rückhalteeigenschaften für die prozessrelevanten Analyten

Zur Charakterisierung der Probenahmesysteme wurde das LaChrom-Online-Analysensystem eingesetzt. Bei dem mikrofiltrationsbasierten Probenahmesystem handelte es sich um das kommerzielle System ESIP 5441/2 von Trace Biotech (siehe Abbildung 9 links, Tabelle 17). Es wurde direkt in die Probe, d.h. in den anaeroben Bioreaktor zur Beprobung eingebracht. Für die Untersuchung der Eigenschaften von Ultrafiltrationsmembranen wurde ein selbst gebautes System eingesetzt, das aus einer kontinuierlich durchströmten Cross-Flow-Membranzelle (80 cm² Membranfläche, siehe Abbildung 9 rechts) und einer Permeatdurchlaufzelle bestand, aus der die Permeatprobe kontinuierlich entnommen werden konnte [197].

Beide Systeme wurden im anaeroben Bioreaktor installiert, dem zuvor hydrolysierter Reaktivfarbstoff Reactive Black 5 (RB5-H) zugesetzt wurde. Die Membranen wurden über Zeiträume von wenigen Tagen bis zu 117 Tagen eingesetzt. Die spezifischen Permeatflüsse der untersuchten Membranen zeigen eine Abhängigkeit vom Molekülgrößentrennwert (MWCO), wobei bei den GN- und PW-Membranen der Einfluss des Membranfilmmaterials mitentscheidend ist. Am Beispiel der GK- und PW-Membranen ist zu sehen, dass die spezifischen Permeatflussraten mit der Betriebsdauer signifikant abnehmen. Dies ist auf den Bewuchs der Membranoberfläche mit Bakterien (Fouling) und die Bildung einer Deckschicht

zurückzuführen. Die Membranen waren in regelmäßigen Abständen etwa alle fünf bis sieben Tage zu reinigen.



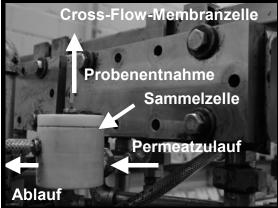


Abbildung 9: (Links) Mikrofiltrationsbasierte Inlineprobenahmesonde ESIP 5441, (Rechts) Membrantestzelle mit Permeatdurchlaufzelle

Tabelle 18: Betriebsparameter von Ultrafiltrations- und Mikrofiltrationsmembranen zur online Probenahme (n. b. – nicht bestimmt)

Membrantyp	Einheit	GK UF	GN UF	PW UF	PP MF
Hersteller		Desal	Desal	Desal	Trace
Material		Polyamid	Polyamid	Polyether	Poly-
				-sulfon	propylen
MWCO	[kDa PPG]	3.500	10.000	10.000	-
Totvolumen	[mL]	63	63	63	4,2
Totzeit	[min]	10,4	7,2	5,7	2,8
Membranfläche	[cm²]	80	80	80	39
Porengröße	[µm]	-	-	-	0,2-0,6
Betriebsdruck	[MPa]	0,5	0,5	0,5	-
Spez. Permeatfluss - 0 h	[L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	53	83	113	23
Spez. Permeatfluss – 24 h	[L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	47	n. b.	40	23
Spez. Permeatfluss – 72 h	[L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]	27	n. b.	n. b.	23
Reinigungsintervall	[d]	8	n. b.	n. b.	7,4
Betriebsdauer	[d]	42/28/42/45	n. b.	n. b.	117

Die Bestimmung des Retentionsverhaltens der in Tabelle 19 aufgeführten vier Verbindungen wurde für beide Membranen hintereinander durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die stoffspezifischen Retentionseigenschaften, die für Einzelsubstanzen mit Standardabweichung zwischen 2 – 12 % gut redproduzierbar waren, unterscheiden sich trotz der Molekültrenngrenzedifferenz zwischen Typ GK und GN von 6500 u nicht wesentlich. Die molaren Massen aller untersuchten Verbindungen liegen weit unter den Herstellerangaben zur Molekültrenngrenze. Ihre Retention kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden.

Bei sehr polaren und ionischen Substanzen wie den organischen Sulfonsäuren kommt es zur Bildung einer Solvathülle um die dissozierten Sulfonsäuregruppen, die das anionische Molekül abschirmen und den für den Stofftransport durch die Membran bestimmenden Diffusionkoeffizienten beeinflussen. Der Stofftransport des Farbstoffmoleküles (RB5-H) und seiner Intermediate (TAHNDS $_{DP1-2}$ ) ähnelt bei den untersuchten Ultrafiltrationsmembranen

dem Stofftransport von Salz durch Umkehrosmosemembranen, d.h. er ist lösungs-diffusionskontrolliert und nicht nach dem Porenmodell erklärbar [198]-[200].

Tabelle 19: Stoffspezifisches Retentionsverhalten von Ultrafiltrationsmembranen zur Online-Probenahme (n. b. – nicht bestimmt, Konzentrationsbereich: 1 - 2 mM p-Base; 70 - 140 $\mu$ M TAHNDS<sub>DP1</sub>, 30 - 470  $\mu$ M TAHNDS<sub>DP2</sub>; 0 – 180  $\mu$ M RB5-H, Temperatur = 39 °C, Leitfähigkeit = 13 mS cm<sup>-1</sup>)

Membran Typ		GK UF (n=49)	GN UF (n=4)
Molekulargewichtstrenngrenze	[Da]	3500	10.000
Verbindung/M <sub>r</sub>	M [g mol <sup>-1</sup> ]	Retention [% ± s	]
p-Base/ M <sub>r</sub> 201	201	0	0
TAHNDS <sub>DP1</sub> (H-Form)	347	$58 \pm 4$	58 ± 1
TAHNDS <sub>DP2</sub> (H-Form	348	$83 \pm 2$	$92\pm3$
RB5-H (H-Form)	743	$68\pm8$	n. b.

Einen weiteren Hinweis für den Mechanismus eines lösungs-diffusions-kontrollierten Stofftransportes zeigt der Vergleich der Retention von TAHNDS $_{\rm DP1}$  und TAHNDS $_{\rm DP2}$ , die sich in der molaren Masse um 1 u unterscheiden. Unter der Annahme, dass die Ultrafiltrationsmembranen als Porenmembranen behandelt werden können und der Stofftransport druckkontrolliert ist, dürfte der Unterschied im Molekulargewicht von 1 u nicht zu einer unterschiedlichen Retention von 58 zu 83 % bzw. 58 zu 92 % führen (siehe Tabelle 19).

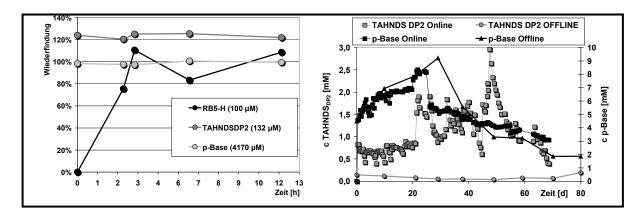


Abbildung 10: Links - Wiederfindung des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black 5 und seiner Hauptabbaukomponenten bei Probenahme mit Mikrofiltrationssonde in Abhängigkeit von der Zeit; Rechts - Vergleich Offline- und Online-MF-HPLC-DAD Monitoring des anaeroben Bioreaktors

Mit der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich Ultrafiltrationsmembranen für den Einsatz als kontinuierliche Probenahmesysteme in Bioreaktoren eignen, wenn die Anzahl der zu überwachenden Verbindungen beschränkt ist und detaillierte Kenntnisse über ihr Retentionsverhalten vorliegen. Die stoffspezifischen Retentionseigenschaften der Ultrafiltrationsmembranen wurden bei der verfahrenstechnischen Entwicklung des Bioverfahrens genutzt, um in der aeroben Stufe durch die Retention der farbigen Metabolite wie TAHNDS<sub>DP1-2</sub> die Verweilzeit zu erhöhen und damit eine weitere Entfärbung zu erzielen (Details zur Retention von Farbigkeit siehe Kapitel 5.5.1).

Mikrofiltrationsmembranen werden zu den Porenmembranen gezählt, bei denen der Stofftransport druckkontrolliert ist. Die in den Inline-Sonden eingesetzten Mikrofiltrationsmembranen sind als Hohlmembrankartuschen ausgeführt, die in der so genannten Dead-

### Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

End-Filtration betrieben werden. D.h., sie werden wie ein Kerzenfilter betrieben, über den mit Hilfe eines Unterdrucks Flüssigkeit angesaugt wird. Die Porengröße der Mikrofiltrationsmembranen von 0,2 - 0,6 µm sorgt für einen Ausschluss von Biomasse bzw. Bakterien und Makromolekülen. Sie werden häufig zur Aufkonzentration kolloidaler Suspensionen eingesetzt. Durch die Bildung einer Deckschicht kann sich der Permeatfluss und die Trenncharakteristik hinsichtlich der Abtrennung kleinerer Verbindungen erweitern.

Abbildung 10 (links) zeigt die Wiederfindungsraten einer mit hydrolysiertem Farbstoff Reactive Black 5 und seinen Abbauprodukte TAHNDS<sub>DP2</sub> und p-Base versetzten Lösung, die kontinuierlich über eine ESIP 5441 mikrofiltrationsbasierte Inline-Sonde beprobt und mit dem "Online-LaChrom-Analysensystem" (Vgl. Beschreibung Kapitel 5.4) analysiert wurde. p-Base zeigte zu Versuchsbeginn eine 100 %ige Wiederfindung, die über einen Zeitraum von 12 Stunden konstant war. Die Wiederfindung des Intermediates TAHNDS<sub>2</sub> lag nahezu konstant bei 120 %. Nach zwei bis drei Stunden stellte sich im Permeat die Konzentration des Farbstoffs ein, die von allen drei untersuchten Verbindungen die stärkste Streuung zeigte. Zurückzuführen ist dieses Verhalten auf die Affinität des Farbstoffs zur Oberfläche der PP-Membran, die erst nach Erreichen eines Gleichgewichts- oder Sättigungszustandes mit dem Farbstoff denselben an das Permeat abgab. Durch die kontinuierliche Beprobung des Bioreaktors mittels der Inline-Sonden waren die Vorrausetzungen für eine repräsentative Probenahme mit Wiederfindungsraten von 100 +/- 20 % gegeben.

Je nach Förderleistung der Probenahmepumpen variierten die Totzeiten von der Probenahme bis zur Analyse im Bereich von 15 bis 30 Minuten was bei den langsamen Abbaukinetiken der Farbstoffe im Stunden bzw. Tagebereich (siehe Kapitel 6.1.2, Seite 126) ausreichend ist. Die insgesamt längere Totzeit im Vergleich zu den geringen Totzeiten der Probenahmesysteme (siehe Tabelle 18, Seite 47) ist auf die Überbrückung der Distanz von 75 m zwischen dem Bioreaktor und dem Analysensystem zurückzuführen, die mittels einer Kapillare (I.D. 0,5 mm) realisiert wurde.

Ein Beweis für die sauerstofffreie Beprobung des Bioreaktors ist die Detektion der Verbindung TAHNDS<sub>DP1</sub>, die bei Sauerstoffkontakt einer Autooxidationsreaktion unterliegt und zu TAHNDS<sub>DP2</sub> reagiert (siehe hierzu Abbildung 64, Seite 121). Sie ist bei einer Offline-Beprobung des Bioreaktors nur schwer nachweisbar [201]. Diese, der Reduktion des Azofarbstoffs nachgelagerte Reaktion, zeigt, dass für die Untersuchung und das Verständnis der Entfärbemechanismen im anaeroben Bioreaktor eine Online-Beprobung erforderlich ist.

In Abbildung 10 (rechts) ist der Vergleich des Konzentrationsverlaufs der beiden Hauptabbauprodukte des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Black 5 im Bioreaktor dargestellt, die mit dem "LaChrom-Analyseverfahren" durch Offline-Analyse und Online-Analyse gemessen wurden (Beschreibung des Analysenverfahrens siehe Kapitel 5.4). Der Verlauf der Konzentration von p-Base zeigt bei der stichprobenartigen Überprüfung mit der offline-Messungen eine gute Übereinstimmung mit der online gemessenen Probe. Das Abbauprodukt TAHNDS<sub>DP2</sub> war in den offline gemessenen Proben im Vergleich in einer sehr viel geringeren Konzentration nachweisbar. Ursache für die starken Abweichungen können Folgereaktionen der Abbauprodukte in der Offline-Probe sein. Vereinzelt wurden Polymerisationen und Dimerbildung bei den Folgeprodukten der anaeroben Reduktion von Azofarbstoffen beobachtet [201].

Mit mikrofiltrationsbasierter kontinuierlicher Online-Probenahme wurde die Analyse der beiden reduktiven Abbauprodukte des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black (TAHNDS $_{DP1}$  und TAHNDS $_{DP2}$ ) im anaeroben Bioreaktor in einem Zeitraum von 36 Stunden 22 mal mit dem Online-MF-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS-Analysenverfahren wiederholt (Methode siehe Kapitel 5.4.2: Säule SB, Methode 4). Die Konzentration beider Verbindungen konnte mit hoher Reproduzierbarkeit bei einer relativen Standardabweichung von 12 % für TAHNDS $_{DP1}$  und 4 % für TAHNDS $_{DP1}$  mit dem Massenspektrometer bestimmt werden.

Die mikrofiltrationsbasierte Sonde wurde daher für beide Bioreaktoren zur kontinuierlichen Online-Probenahme eingesetzt. Bei kontinuierlichem Betrieb des Bioreaktors mit Abwasser-

konzentrat war beim anaeroben Bioreaktor ein Membranreinigungsintervall von zwei bis drei Tagen erforderlich. Beim Betrieb des aeroben Reaktors zeigte sich, dass das Schlammwachstum zu einem höheren Fouling der Membran führte, wodurch das Reinigungsintervall auf einen Tag verkürzt wurde. Bei der Reinigung wurden die Membranen mit 10 - 20 mL Wasser rückgespült und der Biofilm bzw. die Deckschicht auf der Membranoberfläche mit einer Kunststoffbürste mechanisch entfernt.

### 5.4.2 Ionenpaarchromatographie mit nachgeschalteter Kationensuppression

Eine bereits etablierte ionenpaarchromatographische Methode (siehe Abbildung 12, Methode 4), die beim Monitoring von Bioreaktoren mit MF-IP-HPLC-DAD (siehe Kapitel 5.4.1) eingesetzt wurde, sollte an die IC-ESI-MS/MS-Kopplung angepasst und unter Berücksichtigung der chromatographischen Größen wie Selektivität, Auflösung und Analysendauer zur Trennung der Standardlösung (siehe Kapitel 5.1) optimiert werden. Um die Analysendauer bei ausreichender Auflösung und Selektivität zu reduzieren, wurden analytische RP-Säulen mit 3μ- zw. 5μ-Partikeln und kürzerer Säulenlänge zwischen 50 und 70 mm (andere 125 -150 mm) getestet. Die genaue Aufstellung der fünf untersuchten Säulen ist in Tabelle 20 angegeben.

Tabelle 20: Getestete Umkehrphasen für die TBA-Ionenpaarchromatographie

Abk.	Тур	Modifikation	L x d [mm]	d <sub>p</sub> [μm]	Hersteller
SB	LiChrospher 60, RP-select B	C18 ep <sup>1</sup>	125 x 4	5	Merck, Darmstadt
ZE	ZORBAX Eclipse XDB-C8	C8, dep <sup>2</sup> , hd <sup>3</sup>	150 x 4,6	5	Agilent, Waldbronn
AQ	ProntoSIL AQ	C18, pep⁴	53 x 4	3	Bischoff, Leonberg
NHD	Nucleosil HD	C18, hd	70 x 4	3	M&N, Düren
SR	Chromolith SpeedROD	C18 ep	50 x 4,6	Monolit	Merck, Darmstadt

¹ep – endcapped phase, ²dep – double endcapped phase, ³hd – high denisty, ⁴pep – polar endcapped phase

Weitere Merkmale dieser Säulen sind die Modifizierungen des Kieselgels (Endcapping, Double-Endcapping und polares Endcapping) zur Unterdrückung der Wechselwirkung von Analyten mit den freien Silanolgruppen, was bei basischen Verbindungen zu Tailing und bei sauren Verbindungen zu Donnan-Ladungsabstoßungsreaktionen führt. Durch ein so genanntes polares Endcapping (AQ-Säule) wird eine bessere Benetzbarkeit der Alkylketten mit wässrigem Eluenten bewirkt, die bei nicht modifizierten Kieselgelen bei einem organischen Anteil unter 10% zu einem Kollabieren der Alkylketten und einem Zusammenbrechen der Trennung führen. Das so genannte polare oder hydrophile Endcapping wird durch Behandlung des hydrophoben Kieselgels mit hydrophilen Silanen erzielt. Alternativ zu den Kieselgel basierten Phasen wurde eine monolithische Phase getestet, die sich durch ihren geringen Druckverlust insbesondere für schnelle chromatographische Trennungen mit hohen Flussraten eignet.

Die klassischen analytischen Strategien zur Identifizierung sulfonierter Farbstoffe sowie sulfonierter aromatischer Amine machen sich den anionischen Charakter durch die negative Ladung der dissozierten Sulfonsäuregruppen zu Nutze. Bei der flüssigchromatographischen Trennung dieser Verbindungen kann es je nach Molekülstruktur bzw. Molekülgröße zu Donnan-Ladungsabstoßungsreaktionen an den Poren des Kieselgels der RP-Phasen kommen, die durch negativ geladene freie Silanolgruppen auf der Partikeloberfläche hervorgerufen werden. Zur Unterdrückung der Ionenabstoßung können anorganische Elektrolyte wie Natriumactetat, Natriumsulfat, Kaliumphosphat und Natriumnitrat eingesetzt werden [202]-[205].

Alternativ dazu wird die Ionenpaarchromatographie bzw. die so genannte Seifenchromatographie eingesetzt, bei der die zu chromatographierenden Anionen mit einem kationischen Ionenpaarreagenz ein Ionenpaar bilden (siehe Abbildung 11) [205]-[206]. Über die Konzentration des Ionenpaarreagenz kann die Retention der anionischen Verbindungen gesteuert werden [207]. Retentionsentscheidend ist die molare Oberflächenkonzentration des Ionenpaarreagenz. Die zur Retention führende Wechselwirkung wird auf den aufgesetzten Ionen-Austauschmechanismus zwischen dem kationischen Ionenpaarreagenz und dem anionischen Analyt zurückgeführt. Die Retention möglicher kationischer Analyten nimmt dabei ab.

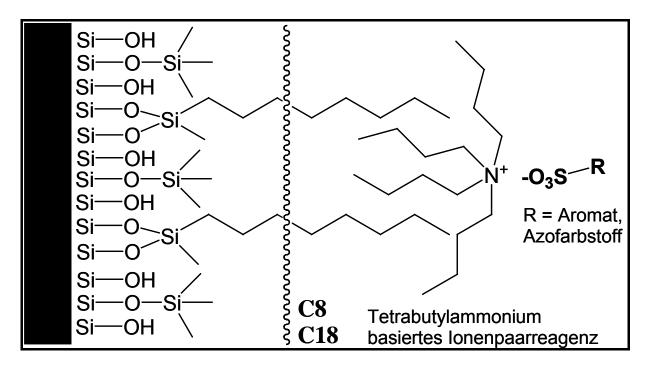


Abbildung 11: C8 oder C18 Kieselgel mit Ionenpaarreagenz zur Chromatographie organischer Sulfonsäureverbindungen

Aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit sind Tetraalkylammonium-Salze, die häufig bei sulfonierten Verbindungen eingesetzt werden, weniger gut für die LC-MS-Kopplung geeignet. Socher et al. entwickelten eine Methode zur Kopplung von Tetrabutylammonium-Ionenpaar-chromatographie mit LC-MS zur Analyse von linearen Alkylsulfonaten [208]-[209]. Diese Technik eignet sich auch zur Kopplung von Ionenchromatographie mit MS-Detektion zur Bestimmung von EDTA sowie polaren Herbiziden, wobei das Vorschalten eines Ionen-Suppressors vor das LC-MS das Signal-Rausch-Verhältnis um zwei Größenordnungen verbessert [210]. Als Nachteil erweist sich die Adsorption kationischer Verbindungen am Suppressor, der unspezifisch neben den Tetrabutylammonium-Kationen auch andere Kationen festhält. Details hierzu werden in Kapitel 5.4.3 beschrieben.

Die Funktion eines Anionenaustauschers zur Suppression anionischer Ionenpaarregenzien bei Kopplung von Ionenpaarchromatographie mit LC-MS untersuchten Forngren et al. [211]. Membranbasierte Verfahren zur Suppression von nicht-flüchtigen oder störenden Ionen untersuchten Conboy et al. und Escott et al. [212]-[213]. Storm et al. beschreiben die flüchtiger Trialkylaminen als Alternative zu den wenig Verwendung Tetraalkylammonium-basierten Ionenpaarreagenzien [214]. Der Nachteil dieser Reagenzien liegt in der "Verschmutzung" des Systems mit dem Ionenpaarreagenz, was zu dem so genannten "Carry-Over-Effekt" führt [208]. Bei einem Wechsel des Chromatographiesystems (Säule, Analyten) und insbesondere des Eluentensystems wird Verschleppung des Ionenpaarreagenz beobachtet, die die Empfindlichkeit des Elektrospray-Massenspektrometers herabsetzt.

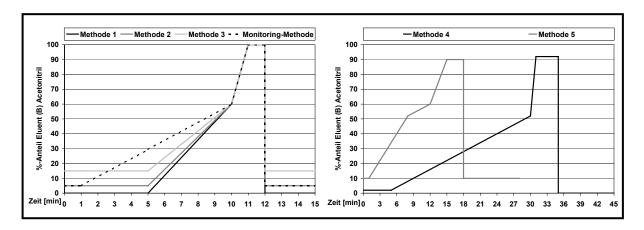


Abbildung 12: Links - Methoden 1-3 zur Evaluierung der RP-Säulen AQ, NHD, SR und Monitoring Methode (Eluent A: 5mM TBAAC Wasser-Acetonitril, Eluent B: Acetonitril); Rechts - : Methoden 4 und 5 zur Evaluierung der RP-Säulen ZE und SB (Eluent A: 5mM TBAAC Wasser-Acetonitril, Eluent B: Acetonitril)

Die in Tabelle 15 (Seite 41) aufgeführte Zusammensetzung der Standardlösung (STDL) beinhaltet neben dem überwiegenden Anteil an sulfonierten Verbindungen zwei nichtsulfonierte Verbindungen (p-Base, NAPB). p-Base soll als Modellsubstanz mit der gleichen Methode chromatographiert werden. Für die Retention der p-Base mit ihrer leicht protonierbaren Aminogruppe ist ein rein wässriger oder wässriger Eluent mit geringem organischen Anteil erforderlich. Die in Abbildung 12 (links und rechts) dargestellten Methoden berücksichtigen diese säulenspezifischen Bedingungen. Zu Beginn der Methoden wird die Säule fünf Minuten isokratisch betrieben, um das Retentionsverhalten der kationischen p-Base zu beobachten, deren Retention mit der Konzentration an lonenpaarreagenz abnimmt [207].

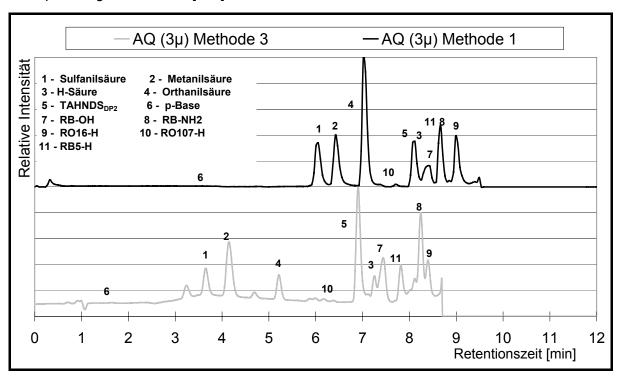


Abbildung 13: Chromatogrammvergleich (TIC der MRM-Messung) der Standardlösung auf einer AQ-Phase (3µ) mit Methode 1 (0% Acetonitril) und Methode 3 (15% Acetonitril)

Der Einfluss des organischen Anteils im Eluent auf die Retention sulfonierter aromatischer Amine sowie die der drei Isomere der Aminobenzensulfonsäure ist in Abbildung 13 illustriert. Neben der Retentionszeitverschiebung ist hier bereits der chromatographische Einfluss (Eluentzusammensetzung) auf die Detektionsintensität bzw. die ESI-Ionisierungseffizienz absehbar (siehe dazu 5.4.6). Ebenso zeigt sich, dass eine Erhöhung des organischen Anteils im isokratischen Teil des Chromatogramms einen starken Einfluss auf die Retention der kationischen p-Base hat.

Die Darstellung der berechneten Kapazitätswerte (k´-Werte) für die Verbindungen der Standardlösung in Abbildung 14 (Bestimmung des Säulentotvolumens durch Acetonitrilinjektion) gibt einen Überblick der Retentionsverhalten auf unterschiedlichen Säulen und mit verschiedenen Methoden. Die Werte sind nach der Retentionsreihenfolge der p-Base sortiert (geringste Retention: AQ (3 $\mu$ ) Methode 1, höchste Retention ZE (5 $\mu$ ) Methode 4). Der für die chromatographische Trennung erforderliche k´-Wert >1 wird mit der AQ-Phase (Methode 1 und 2), SB-Phase (Methode 4) und ZE-Phase (Methode 5 und 4) erreicht. Die bei ZE und SB eingesetzte Methode 4 ist aufgrund des geringen organischen Anteils von nur 2 % im Eluent für einen Dauerbetrieb nicht geeignet. Optimale Säulenkapazitätswerte werden mit einem organischen Anteil von 0 – 5 % Acetonitril auf der AQ-Phase erzielt, die durch das polare endcapping auch ohne organischen Anteil rein wässrig betrieben werden kann. Die Retention der sulfonierten Verbindungen wird auch bei hohem organischen Anteil im Eluent erreicht.

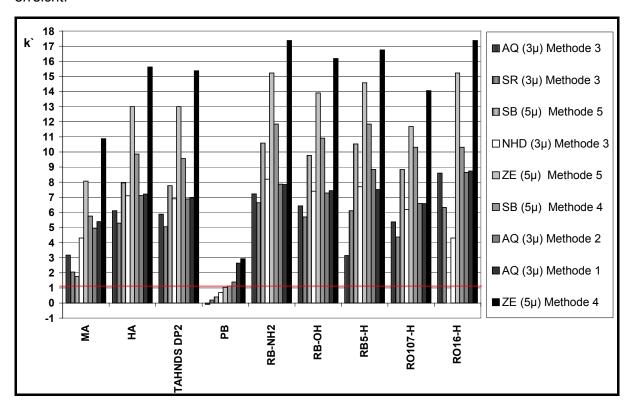


Abbildung 14: k'-Werte ausgesuchter Verbindungen auf unterschiedlichen Säulen

Zur besseren Beurteilung der Trennleistungen der einzelnen Phasen werden die Auflösung  $R_S$  und der Trennfaktor  $\alpha$  in Abbildung 15 für zwei Isomerpärchen betrachtet. Eine ausreichende Trennung eines der beiden Isomerenpaare liegt vor, wenn gilt  $\alpha = k^2/k^2 \neq 1$  also  $k^4 \neq k^2$  ist. Abbildung 15 A zeigt, dass bei den getesteten Phasen eine ausreichende Selektivität zur Trennung der Isomeren mit Trennfaktoren ungleich eins beobachtet werden

kann. Der Einfluss des organischen Anteils an der isokratischen Phase wird bei der AQ-Phase (Methode 1-3) deutlich. Die Trennungsfaktoren der schneller eluierenden Isomere Sulfanil- und Metanilsäure steigen mit dem organischen Anteil im Puffer (0, 5, 15%) schneller als die des später eluierenden Isomerenpaares RB-OH/RB-NH<sub>2</sub>.

Ein höherer organischer Anteil im Eluent steigert somit die Selektivität zur Trennung der Isomere, verringert aber die Retention der aromatischen Amine wie p-Base in der Weise, dass sie bei einem Anteil von 15% Acetnonitril im Eluent im isokratischen Teil zu Beginn der Methode nicht mehr reteniert (k`< 1 siehe Abbildung 14). Die NHD-Säule zeigt ein ähnliches Verhalten wie die AQ-Säule in Abhängigkeit vom organischen Anteil. Die bei der SR-Säule gemessenen Trennfaktoren sind nahezu identisch mit denen der AQ-Säule.

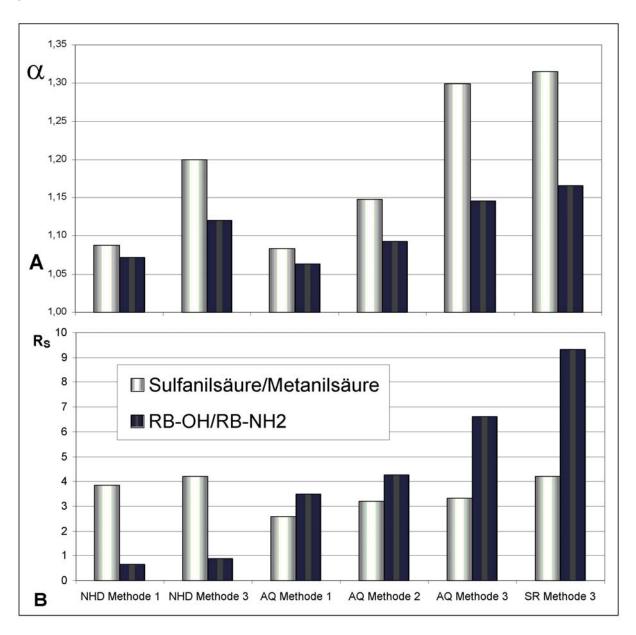


Abbildung 15: (A)  $\alpha$ -Werte und (B) Auflösung zweier Isomere unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen auf unterschiedlichen Säulen

Die Auswertung der berechneten Auflösung  $R_S$  [ $R_S$  = (2 ( $t_{R2} - t_{R1}$ ) / ( $w_1 + w_2$ )] für die NHD-Säule zeigt (siehe Abbildung 15 B), dass für RB-OH/RB-NH<sub>2</sub> nur  $R_S$ -Werte <1 erreicht werden, die keine ausreichende chromatographische Trennung der Isomeren erlaubt. Die

Auflösung von Sulfanil-/Metanilsäure bleibt unter der Änderung des organischen Anteils bei der NHD und AQ-Säule fast konstant. Bei der AQ-Säule ist die chromatographische Auflösung für RB-OH/RB-NH<sub>2</sub> höher als für Sulfanil-/Metanilsäure. Beim Trennfaktor kehrt sich dieses Verhältnis um. Ursache dafür ist die geringere Peakbreite der Isomere RB-OH und RB-NH<sub>2</sub> im Vergleich zu Sulfanil- und Metanilsäure. Der gleiche Effekt war auch an der monolithischen SR-Säule zu beobachten, die bei den sulfonierten Isomeren gute Trennleistungen erzielte.

Die AQ-Säule zeigte hinsichtlich Selektivität und Auflösung der sulfonierten Verbindungen bei gleichzeitiger Retention von aromatischen Aminen wie der p-Base die besten Ergebnisse. Zum Prozessmonitoring wurde die Methode 2 modifiziert, in dem die isokratische Fahrweise zu Beginn der Methode von fünf Minuten auf eine Minute reduziert wurde (siehe Monitoring Methode Abbildung 12). Damit konnte ein flacherer Gradienten gefahren und der zeitliche Abstand zwischen den früh und später eluierenden Substanzen (p-Base 2,5', Sulfanilsäure 4') verringert werden (Vergleiche mit Abbildung 13). Die Equilibrierung der AQ-Säule mit dem ionenpaarreagenzhaltigen Eluenten konnte im Vergleich zur hydrophoberen SB-Säule von etwa 5,5 Bettvolumen (10 Minuten) auf 3 Bettvolumen (3 Minuten) reduziert werden, wodurch eine weitere Reduktion der Analysendauer erzielt wird.

#### 5.4.3 Charakterisierung des Kationensuppressors in der HPLC-Kopplung

Der Kationensuppressor wurde wie unter Kapitel 5.4 in Tabelle 17 beschrieben zwischen dem Dioden-Array-Detektor und dem Elektrospray-Interface betrieben. Aufgrund der unspezifischen Suppression aller im Lösemittel bzw. Eluent vorhandenen Kationen können auch kationische Verbindungen aus der Probe festgehalten werden. Zur Beurteilung der Adsorption von Azofarbstoffen, aromatischen Aminen und sulfonierten aromatischen Aminen wurden verschiedene Azofarbstoffe und Verbindungen, die zur Gruppe der Synthesevorprodukte, Synthesenebenprodukte und Abbauprodukte von Azofarbstoff gehören, untersucht [216]. Diese sind in

Tabelle 22 und Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 21: Chemikalien zur Charakterisierung des Kationensuppressors

Chemikalie	Hersteller
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS)	Fluka Chemika, Reinheit > 99%
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Fluka Chemika, Reinheit > 99%
Tetrabutylammoniumacetat (TBAAC) Wasser Acetonitril Aceton Schwefelsäure	Fluka Chemika, elektrochemical grade Roth GmbH, Rotisolv HPLC Gradient Grade Roth GmbH, Rotisolv HPLC Gradient Grade Riedel de Haen, Chromasolv für die HPLC Titrisol Merck c: 2,5 mol/l

Tabelle 22: Farbstoffe zur Charakterisierung des Kationensuppressors

Farbstoff	Hersteller
AO5	Sigma Aldrich, Reinheit ca. 50 %
AO52 (Methylorange)	Merck KGaA, Reinheit ca. 95 %

### Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

RO16-H	DyStar hydrolysiert von M. Tauber, Reinheit ca.40 %
RO107-H	DyStar hydrolysiert von M. Tauber, Reinheit unbekannt
RB5-H	Sigma Aldrich, Reinheit ca. 55 %
DB71	Sigma Aldrich, Reinheit ca. 50 %

Tabelle 23: Vor- und Abbauprodukte, die von der Fa. DyStar Textilfarben GmbH & Co Deutschland KG in Leverkusen zur Verfügung gestellt wurden

Vor- und Abbauprodukte Fa. DyStar Textilfarben GmbH & Co Deutschland KG in Leverkusen	Reinheit
5AA8ANS (5-Acetylamino-8-amino-2 Naphthalinsulfonsäure	unbekannt
4ADP (4-Aminodiphenylamin)	unbekannt
SS (Sulfanilsäure)	unbekannt
NNDMPDA (N,N-Dimethylphenylendiamin)	ca. 97 %
3ANS (C-Säure)	unbekannt
DAN (1,4-Diaminonaphthalin dihydrochloridsalz)	unbekannt
PB (Parabase)	unbekannt
VPB (Vinylparabase)	unbekannt
MS (Metanilsäure)	98 %
HS (H-Säure)	82,5 % enthält Nickel
OS (Orthanolsäure)	unbekannt
N-Acetylparabase	unbekannt
SPBE (Sulfo-p-parabaseester)	unbekannt
ES (Etylensulfon)	unbekannt
DAS (Diaminophenylsulfon)	unbekannt
CA (Chloranilin)	unbekannt

### 5.4.3.1 Instrumentierung und Methoden zur Charakterisierung des Ionensuppressors

Um den Suppressor erfolgreich zur Entfernung des Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumacetat und -hydrogensulfat für die Massenspektrometrie einsetzten zu können, benötigt man
die Austauschkapazität der einzelnen Kationenaustauscher-Kartuschen. Dabei wird mittels
Retentionszeit die molare Menge des Tetrabutylammoniumkations bestimmt, die pro
Kartusche vom Suppressor maximal gebunden werden kann Weiterhin wird die möglichst
vollständige Regenerierung nach erfolgter Adsorption getestet. Das Suppressor-Modul 753
der Fa. Metrohm wurde an die Ionenchromatographie Basic 792 der Fa. Metrohm
angeschlossen. Dieses Chromatographie-System besteht aus einer pulsationsarmen
Doppelkolbenpumpe und einem sehr empfindlichen Leitfähigkeitsdetektor (siehe Abbildung
16). Der Puffer wird ohne Zwischenschaltung einer Trennsäule über den Suppressor 753
gepumpt und dann im Detektor die Leitfähigkeit gemessen. Ist die Aufnahmekapazität des
Kationenaustauschers für Tetrabutylammonium erreicht, steigt die Leitfähigkeit im Detektor
durch die zusätzlichen Kationen des Puffers an.

Isokratische Pumpe: Fluß 1ml/min Tetrabutylammoniumacetat (c:1, 5 und 10 mM/L

mit 10 % Acetonitril)

Leitfähigkeitsdetektor: Detektortemperatur 40 °C mit einer Abweichung von +/- 0,01 °C

Suppressor 753: Regenerierlösung 200 mM/L Schwefelsäure mit 20 % Aceton,

sowie die Neutralisierung mit entionisiertem Wasser mit einem

Fluss von 0,5 ml/min durchgeführt.

Software: Metrohm Basic 792

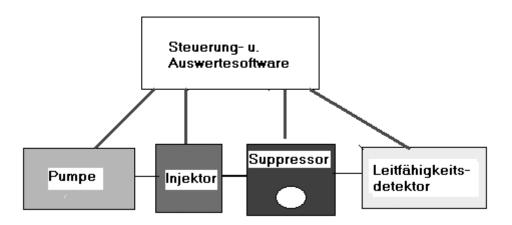


Abbildung 16: Aufbau der IC mit integriertem Suppressor

# Einfluss der Ionenzugabe zum Puffer (pH-Wert Einstellung) auf die Gesamtleitfähigkeit vor und nach dem Suppressor

Mit dem Ionenchromatograph 792 von Metrohm wurde die Leitfähigkeit des Puffers mit entsprechendem pH-Wert vor und nach dem Suppressor bestimmt. Dabei verzichtet man wieder auf den Einsatz einer Trennsäule und bestimmt die Leitfähigkeit des Puffers direkt im Leitfähigkeitsdetektor. Anschließend erfolgt der Vergleich mit vorgeschalteten Suppressionsmodul 753.

Tabelle 24: Menge der zugegebenen Säuren und Laugen zur pH-Wert Einstellung des Puffers

Puffer	pH- Wert	Zugabe an Säure bzw. Lauge pro Liter Puffer	Erhöhung der lonenkonzentration durch Zugabe der Lauge bzw. Säure [mol/L]	Gesamtkationen -konzentration [mmol/L]
TBAHS (c: 1 mM)	3,3	ohne Zugabe	-	1,000
TBAHS (c: 1 mM)	5,0	9,4 ml NaOH c: 0,1 mol/l	9,4 * 10 <sup>-4</sup> mol/l Na <sup>+</sup>	1,00094
			9,4* 10 <sup>-4</sup> mol/I OH <sup>-</sup>	
TBAHS (c: 1 mM)	7,5	10,1 ml NaOH c: 0,1 mol/l	1,0 *10 <sup>-3</sup> mol/l Na <sup>+</sup>	1,001
			1,0 * 10 <sup>-3</sup> mol/l OH <sup>-</sup>	
TBAAC (c: 5 mM)	3,0	51 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c: 0,05 mol/l	2,55 * 10 <sup>-3</sup> mol/IH <sup>+</sup>	5,0025
TBAAC (c: 5 mM)	5,0	15 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c: 0,05 mol/l	$0.75 * 10^{-3} \text{ mol/l H}^{+}$	5,00075
TBAAC (c: 5 mM)	6,6	ohne Zugabe	-	5,000
TBAAC (c: 5 mM)	7,5	0,6 ml NaOH c: 0,1 mol/l	0,6 * 10 <sup>-4</sup> mol/l Na <sup>+</sup>	5,00006
			0,6* 10 <sup>-4</sup> mol/l OH <sup>-</sup>	

### Bestimmung von Absorptionsmaxima mittels HPLC mit *Diodenarray-Detektion*

Die Untersuchung möglicher Wechselwirkungen der Analyten mit dem Kationenaustauscher erfolgt über Vergleichsmessungen absorbieter Strahlungsmengen mit dem UV/Vis-Detektor (siehe Abbildung 17). Um die Wechselwirkungen der Analyten am Suppressor möglichst empfindlich zu bestimmen, werden vorher die Absorptionsmaxima im UV/Vis-

Strahlungsbereich der Farbstoffe und deren Vor- und Abbauprodukte bestimmt. Als Methode wird hier die Ionenpaarchromatographie eingesetzt, so dass man zusätzliche Informationen über das stoffspezifische Retentionsverhalten der Analyten erhält.

#### **Instrumentierung und Methode**

Die LaChrom HPLC Anlage von Merck wird mit folgenden Einstellungen betrieben:

Niederdruckgrad. Eluent A: 1mM/L TBAHS u. 10 % ACN, pH 3,2

Pumpe L7100: Eluent B: Acetonitril; Gradient nach 5 min 100% A mit einer

Steigung von 2%/min mit Eluent B, nach 25 min mit einer

Steigung von 10 %/min auf 90% Eluent B.

Fluß: 1ml/min

Autosampler L7200: Injektionsvolumen: 20 µl

Säule: Select-B von Merck (Temperatur: 40 °C)

Detektor L7450: Diodenarray Messbereich 200 – 800 nm

Steuersoftware: D-7000-Multi-HSM Manager

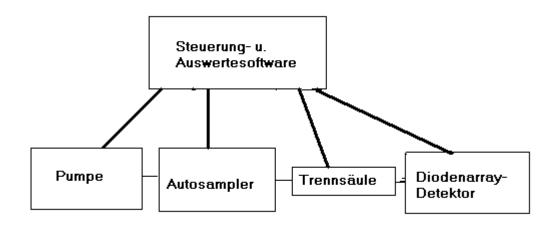


Abbildung 17: Aufbau der HPLC mit Diodenarray-Detektion

Tabelle 25: Eingesetzte Konzentrationen der Abbau- bzw. Vorprodukte der Farbstoffe

Abkürzung	Summenformel	Molekular- gewicht (g/mol)	Konzen-tration [mM/L]	Lösungsmittel/ Bemerkungen
5AA8ANS	$C_{12}H_{12}N_2O_4S$	280,30	1,8	Methanol schwer löslich
4ADP	$C_{12}H_{12}N_2$	184,24	2,5	Wasser, leichte Fluoreszenz
SS	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	173,18	2,7	Wasser, leicht löslich
NNDMPDA	$C_8H_{12}N_2$	136,19	1,2	In Acetonitril, dunkelrote Färbung
3ANS	$C_{10}H_7NO_6S_2Na_2$	347,28	0,9	Wasser, farblos leicht fluoreszierend
DAN	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> ·2 HCI	231,12	3,1	Methanol, schwer löslich, leicht orange
РВ	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	201,24	1,6	Wasser farblos
VPB	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	183,23	1	Wasser farblos
MS	$C_6H_7NO_3S$	173,19	1,7	Wasser farblos
HS	$C_{10}H_9NO_7S_2$	319,31	0,6	Wasser farblos
SPBE	$C_8H_{11}NO_9S_2$	329,22	3,6	Wasser farblos
NAPB	$C_{10}H_{13}NO_4S$	219,16	1,1	Acetonitril farblos
ES	$C_{14}H_{16} N_2O_4S_2$	340,30	0,98	Acetonitril sehr schlecht, mit Rückstand
DAS	$C_{12}H_{12} N_2O_2$	216,14	2,05	Acetonitril
OS	$C_6H_7NO_3S$	173	4,7	Wasser
CA	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NCI	127,5	10,1	Acetonitril

Tabelle 26: Eingesetzte Konzentrationen der Farbstoffe

Farbstoff	Molekular- gewicht [g/mol]	Konzentration [mM/L]	Lösungsmittel
AO52	327,2	1	Wasser
AO5	375,4	1	Wasser
RO107-H	464,7	0,86	Wasser
RO16-H	514	0,97	Wasser
RB5-H	788,1	0,83	Wasser
DB 71	1029,9	1	Wasser

#### Bestimmung des Molaren Absorptionskoeffizienten im UV/Vis-Detektor

Um mögliche Wechselwirkungen der Analyten mit dem Kationenaustauscher zu untersuchen, werden Absorbtionsmessungen der Substanzen erst direkt im UV/Vis-Detektor durchgeführt und anschließend nachdem sie den Suppressor passiert haben. Durch die Ermittlung des Molaren Extinktionskoeffizienten bei unterschiedlichen pH-Werten können zusätzlich Aussagen über den Einfluss des pH-Wertes auf die absorbierte Strahlungsmenge und darüber hinaus über pH-bedingte Strukturänderungen bzw. Veränderungen der Ladungsverteilung in den Molekülen gemacht werden.

#### **Instrumentierung und Methode**

Einsatz einer LaChrom HPLC Anlage von Merck bestehend aus:

Niederdruckgrad. Eluent: 1mM/L TBAAC u. 10 % Acetonitril, pH 3,0 u. 7,5

Pumpe L7100: Fluß:1ml/min

Autosampler L7200: Injektionsvol.: 20 µl

Detektor L 7400: UV/Vis-Detektor mit Durchflussküvette, Schichtdicke: 1 cm

Steuersoftware: D-7000 Multi-HSM-Manager

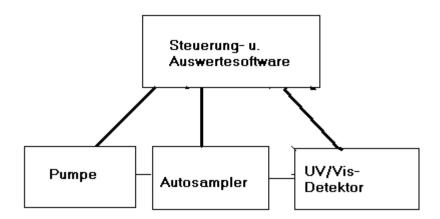


Abbildung 18: Anlage zur Bestimmung des Molaren Extinktionskoeffizienten

#### Referenzsubstanzen

Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe werden bei einer Wellenlänge von 436 nm und mit den in Tabelle 3.4.1 angegebenen Konzentrationen bestimmt. Die Wellenlänge 436 nm wird auch zur Bestimmung der Farbigkeit von Abwässern mittels Durchsichtsfarbzahl im Abwasserreinigungsbereich verwendet, DIN EN ISO 7887. Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Vor- bzw. Abbauprodukte wird das bestimmte Absorptionsmaximum des jeweiligen Stoffes gewählt.

Tabelle 27: Farbstoffkonzentrationen zur Bestimmung des Molaren Extinktionskoeffizienten bei 436 nm

Farbstoff	MG [g/mol]	Konzentration [mM/L]
AO52	327,2	0,397
AO5	375,4	0,139
RO107-H	464,7	0,088
RO16-H	514	0,089
RB5-H	788,1	0,098
DB 71	1029,9	0,070

Tabelle 28: Vor- und Abbauprodukte zur Bestimmung des Molaren Extinktionskoeffizienten beim jeweiligen Absorptionsmaximum

	Name & Summenformel	Molekular- Gewicht (g/mol)	Konzentratio n [mM/L]	Absorptions- maximum [nm]
5AA8ANS	$C_{12}H_{12}N_2O_4S$	280,30	1,00	250
4ADP	$C_{12}H_{12}N_2$	184,24	1,24	280
SS	$C_6H_7NO_3S$	173,18	2,24	210
NNDMPDA	$C_8H_{12}N_2$	136,19	1,054	200
3ANS	$C_{10}H_7NO_6S_2Na_2$	347,28	3,054	230
DAN	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> 2 HCl	231,12	1,503	250
PB	$C_8H_{11}NO_3S$	201,24	1,451	280
VPB	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	183,23	1,435	280
MS	$C_6H_7NO_3S$	173,19	1,611	210
HS	$C_{10}H_9NO_7S_2$	319,31	0,429	240
SPBE	$C_8H_{11}NO_9S_2$	329,22	0,696	
				210
NAPB	$C_{10}H_{13}NO_4S$	219,16	1,076	210
ES	$C_{14}H_{16}N_2O_4S_2$	340,30	0,487	200
DAS	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	216,14	2,054	200
os	$C_6H_7NO_3S$	173,19	0,942	210
CA	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NCI	127,5	1,656	210

## Wechselwirkungen der Analyten mit dem Suppressor unter *Einfluss von Puffer und pH-Wert*

Um mögliche Wechselwirkung der Farbstoffe sowie deren Vor- und Abbauprodukte mit dem Kationenaustauscher zu untersuchen wird der Suppressor zwischen eine HPLC-Pumpe und geschaltet. Mittels UV/Vis-Detektor eines Eluenten. hier die für chromatographische Trennung benötigten Ionenpaarreagenzien Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und -acetatlösungen, werden die Analyten über den Kationenaustauscher gespült. Anschließend wird ihre Konzentration im Eluat über die Absorption von Strahlung (Lambert-Beersches-Gesetzt) im UV/Vis-Detektor bestimmt. Durch den direkten Vergleich mit den Messungen der Absorption im UV/Vis-Detektor ohne Suppressoreinsatz wurde die Differenz und damit die Menge der am Kationenaustauscher adsorbierten Substanz bestimmt.

Um optimale Bedingungen für eine Methode mit möglichst geringen Wechselwirkungen der Analyten am Suppressor zu finden, werden die zwei Puffersysteme Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und – acetat im pH-Wert Bereich 3-7,5 untersucht.

#### **Instrumentierung und Methode**

Niederdruckgrad. ' Eluent: 5 mM/LTetrabutylammoniumacetat mit 10 % Acetonitril,

Pumpe L7100 1mM/L Tetrabutylammoniumhydrogensulfat mit 10 % Acetonitril

Merck Hitachi pH-Wert Einstellung siehe Kapitel 3.2.2.

Fluß: 1ml/min, isokratisch

Autosampler L7200: Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor L 7400 UV/Vis-Detektor mit Durchflussküvette, Schichtdicke 1 cm

Wellenlänge, siehe Kapitel 3.4.

Suppressor 753: Regeneration mit Schwefelsäure 200 mM/L und 20 % Aceton

Steuersoftware: D 7000 Multi HSM Manager

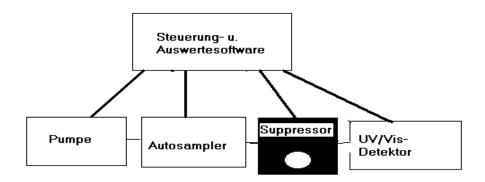


Abbildung 19: Aufbau der HPLC für die Charakterisierung des Suppressors

#### 5.4.3.2 Kapazitätsbestimmungen des Suppressors für TBAAC

#### 10 mM/L Tetrabutylammoniumacetat-Puffer mit 10 % Acetonitril

Für die Bestimmung der Kapazität des Kationenaustauschers für Tetrabutylammoniumionen wird der Suppressor 753 zwischen eine Pumpe und einen Leitfähigkeitsdetektor geschaltet. Die maximale Adsorptionskapazität einer Kationenaustauschkartusche wird mittels Retentionszeitmethode bestimmt. Der von der Pumpe über den Kationenaustauscher geförderte Tetrabutylammoniumpuffer, insbesondere die Kationen des Puffers, werden vom Austauscher gebunden. Erst wenn dessen Kapazität erreicht bzw. überschritten wird, erreichen auch die Tetrabutylammoniumkationen den Detektor und die Leitfähigkeit steigt an. Dann wird der Suppressor im Turnus einmal weitergeschaltet und die für den Austausch benutzte Kartusche wird mit Schwefelsäure und Aceton regeneriert, während die andere für den Austauschprozess zur Verfügung steht.

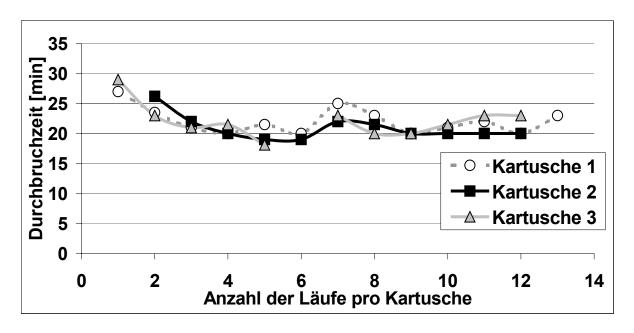


Abbildung 20: Durchbruchzeit mit 10 mM/L Tetrabutylammoniumacetatpuffer

Die Ergebnisse der Kapazitätsbestimmung mittels Retentionszeitmethode zeigen reproduzierbare reversible Adsorptions- bzw. Desorptionsprozesse (Abbildung 20). Über den gesamten Zeitraum der Untersuchung bleibt die Durchbruchzeit für das Tetrabutylammoniumkation mit einer Konzentration von 10 mM/L bei allen drei Kationenaustauscherkartuschen zwischen 20 und 25 Minuten konstant. Bei einem Fluss von 1 ml/min und einer Pufferkonzentration von 10 mM/L beträgt die Adsorptionskapazität Q des Kationenaustauschers für TBAAC 250  $\mu M$  pro Kartusche. Theoretisch möglich wären 430  $\mu M$  pro Trockenmaterial pro Kartusche.

Wichtig für die Reproduzierbarkeit des Ionenaustausches ist die Zugabe von 20 % Aceton zur schwefelsauren Regenerierlösung. Aceton bewirkt eine bessere Desorption des organischen Kations Tetrabutylammonium vom Austauscher und sichert damit eine reproduzierbare Austauscherkapazität nach der Regeneration und Neutralisierung.

#### 5 mM/L Tetrabutylammoniumacetat-Puffer mit 10 % Acetonitril

Beim Einsatz eines niedriger konzentrierten 5 mM/L Puffers erhöht sich die Durchbruchzeit von 20 - 25 auf 40 – 45 Minuten, die Austauschkapazität Q bleibt bei 250  $\mu$ M pro Kartusche konstant.

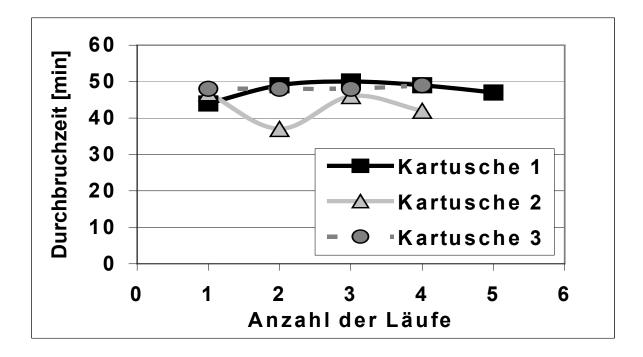


Abbildung 21: Durchbruchzeit mit 5 mM/L Tetrabutylammoniumacetatpuffer

Die chromatographische Methode zur Bestimmung von Azofarbstoffen und deren Abbauprodukten wird mittels Zugabe des Ionenpaarreagenzes Tetrabutylammoniumacetat in einer Konzentration von 5 mM/L durchgeführt. Für die Auftrennung wird eine Gradientenmethode von ca. 30 min eingesetzt. Das bedeutet, die jeweilige für die Bindung des Tetrabutylammoniumkations eingesetzte Kartusche kann bei einer Pufferkonzentration von 5 mM/L mindestens über eine Zeitspanne von 30 min eine Adsorption des Kations gewährleisten. Der Suppressor muss nicht während einer Messung in der Chromatographie geschaltet werden. Er kann mit jeweiliger neuer Probeninjektion weitergeschaltet werden. Somit steht für jede neue Messung eine reproduzierbar regenerierte Kationenaustauschkartusche zur Verfügung.

#### 1 mM/L Tetrabutylammoniumacetat-Puffer mit 10% Acetonitril

Der Durchbruch findet nach 230 min statt. Auch hier entspricht die Austauschkapazität Q wieder ca. 250 µM pro Kartusche. Die theoretische Austauschkapazität von 430 µM pro Kartusche entspricht einer Angabe für Wasserstoff-lonen. Es handelt sich hier um die statische Austauschkapazität für einen maximalen lonenaustausch mit vollständigem Erreichen der Austauschgleichgewichte. Das Tetrabutylammonium-lon ist ein größeres Molekül in dem die positive Ladung durch die organischen Butylreste abgeschirmt wird. Dadurch verringert sich die Affinität zum lonenaustauscher und damit auch die Austauschkapazität Q. Außerdem wird hier im dynamischen Bereich, soll heißen im Fließbetrieb, die Kapazität bestimmt, die grundsätzlich niedriger als die statische Kapazität ausfällt. Der Metrohm Suppressor 753 mit den drei Kationenaustauschkartuschen besitzt für jede Kartusche eine ausreichende Kapazität, um bei einer flüssigchromatographischen Trennung des Analysengemisches mit einer Zeitdauer von 30 min, das störende Kation des 5 mM/L Tetrabutylammoniumpuffers zu adsorbieren und damit vor der Massenspektrometrie zu entfernen.

# 5.4.3.3 Der Einfluss der Ionenzugabe zum Puffer auf die Gesamtleitfähigkeit vor und nach dem Suppressor

Um den Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf die Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Kationenaustauscher zu untersuchen, werden die Puffer mittels verdünnter Schwefelsäure bzw. Natronlauge auf pH-Werte im Bereich 3 – 7,5 eingestellt (siehe Methode in Kapitel 3.3). In diesem pH Bereich ist der Betrieb der in dieser Arbeit eingesetzten chromatographischen Trennsäulen mit Reverse-Phase Materialien möglich.

Im Leitfähigkeitsdetektor wurde die Leitfähigkeit vor und nach dem Ionenaustausch des Kationenaustauschers ermittelt.

Tabelle 29 Leitfähigkeitsmessungen	der Puffer	TBAHS und	TBAAC	bei verschiedenen	pH-
Werten					-

Puffer	Zugabe an Säure bzw. Lauge pro Liter Puffer	Ionenkonzentratio n der zugeführten Menge an Säuren bzw. Laugen	pH- Wert	Leitfähigkei t vor dem Suppressor [µS/cm]	Leitfähigkei t nach dem Suppressor [µS/cm]
TBAHS 1 mM	ohne	-	3,3	319,7	506,2
TBAHS 1 mM	9,4 ml NaOH c: 0,1 mol/l	9,4 * 10 <sup>-4</sup> mol/l Na <sup>+</sup> 9,4* 10 <sup>-4</sup> mol/l OH <sup>-</sup>	5,0	176,4	507,5
TBAHS 1 mM	10,1 ml NaOH c: 0,1 mol/l	1,0 *10 <sup>-3</sup> mol/l Na <sup>+</sup> 1,0 * 10 <sup>-3</sup> mol/l OH <sup>-</sup>	7,5	178,1	510,8
TBAAC 5 mM	51 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c: 0,05 mol/l	2,55 * 10 <sup>-3</sup> mol/l H <sup>+</sup>	3,0	533,3	483,4
TBAAC 5 mM	15 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c: 0,05 mol/l	0,75* 10 <sup>-3</sup> mol/l H <sup>+</sup>	5,0	286,6	482,5
TBAAC 5 mM	ohne	-	6,6	242,2	66,6
TBAAC 5 mM	5 ml NaOH c: 0,1 mol/l	0,5 *10 <sup>-3</sup> mol/l Na <sup>+</sup> 0,5 * 10 <sup>-3</sup> mol/l OH <sup>-</sup>	7,5	252	70,2

Die Ionenpaarreagenzien werden mit unterschiedlichen Konzentrationen für die Chromatographie eingesetzt. Der 1mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfatpuffer zeigt einen sauren pH-Wert von 3,3. Der relativ hohen Konzentration an H $^+$ -Ionen entsprechend misst man hier eine relativ hohe Leitfähigkeit von ca. 320 µS/cm (siehe Tabelle 29). Durch den Austausch des Tetrabutylammonium-Kations gegen H $^+$ -Ionen am Kationenaustauscher steigt die Leitfähigkeit aufgrund der höheren Äquivalentleitfähigkeit der H $^+$ -Ionen nach Passieren des Kationenaustauschers auf Werte um 500 µS/cm an. Mit der Anhebung des pH-Wertes auf pH 5 bzw. pH 7,5 sinkt die Leitfähigkeit des Puffers, um dann nach dem Austausch der Kationen am Suppressor wieder um Werte von 500 µS/cm anzusteigen.

Der Tetrabutylammoniumacetatpuffer zeigt ein etwas anderes Verhalten (Tabelle 29). Er wird mit einer Konzentration von 5 mM/L eingesetzt und besitzt einen aufgrund der Pufferwirkung des Acetat-Anions einen beinah neutralen pH-Wert von 6,6. Seine Leitfähigkeit beträgt ca. 250  $\mu$ S/cm. Nach Passieren des Kationenaustauschers werden die frei werdenden H<sup>+</sup>-Ionen vom Acetatanion weiter abgepuffert und die Leitfähigkeit wird niedriger mit einem Wert von ca. 60  $\mu$ S/cm. Wird der Puffer angesäuert, steigt seine Leitfähigkeit und die Pufferwirkung des Acetat-Ions reicht nicht mehr aus, die durch den Austausch entstehenden H<sup>+</sup>-Ionen zu neutralisieren. Die Leitfähigkeitswerte steigen nach dem Kationenaustausch auf ca. 500  $\mu$ S/cm an, vergleichbar mit den Ergebnissen des 1 mM/L Tetrabutylammoniumhydrogensulfatpuffers.

### Bestimmung der Absorptionsmaxima auf der HPLC mit *Diodenarray- Detektion*

Um eine optimale Wellenlänge für die Untersuchung der Wechselwirkungen der Vor- und Abbauprodukte mit dem Kationenaustauscher zu nutzen, wurden die Absorptionsmaxima im UV/Vis-Strahlungsbereich der Vor- und Abbauprodukte mit der Methode aus Kapitel 3.3 bestimmt. Für die Farbstoffe wurde die Wellenlänge 436 nm ausgewählt, da sie einer der Wellenlängen entspricht, wie sie auch zur Bestimmung der Färbung des Abwassers eingesetzt werden In der folgenden Tabelle 30 werden die Konzentrationen und die entsprechenden Flächenwerte bei 436 nm dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wellenlänge eine ausreichende Empfindlichkeit für die Untersuchung der Farbstoffe gewährleistet.

Tabelle 30: Flächenwerte der Azofarbstoffe bei 436 nm im Diodenaarraydetektor

	AO5	AO52	RO16-H	RO107-H	RB5-H	DB71
Retentions- zeit [min]	27,8	24,9	19,3	17,2 u. 19,6	23,5 u. 25,8	26,5
Absorptions-	275	270	260	240	230	580
maxima [nm]	430	460	300 490	430	310 588	
Fläche bei 436 nm [AU]	7934075	1101635	407040	384391 468535	38670 353380	567490

Tabelle 31: Absorptionsmaxima und Flächen der Vor- und Abbauprodukte im Diodenarraydetektor

	5AA8 ANS	4ADP	SA	NNDM PDA	3ANDS	DAN	РВ	VPB
Retentions-zeit [min]	5	6,2	2,7	5,0 u. 30,7	14,6	10	3,4	10,2
Absorptions- maxima [nm]	230	280	210	200 u. 455	230	210	268	280
Fläche im Absorptions- maximum [AU]	4405 62	10159 574	793033 2	14551 39	676020 9	89090 8	44432 84	4179860

### Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Tabelle 32: Absorptionsmaxima und Flächen der Vor- und Abbauprodukte im Diodenarraydetektor

	MeS	HS	SPBE	NAPB	ES	DAS	os	CA
Retentions- zeit [min]	2,4	14,6	13,5	3,0	10,1	8,1	4,9	5,4
Absorption s-maxima	210	240	210	210	200	200	210	210
[nm] Fläche im Absorption s-maximum [AU]	5692040	1570315	2805120 4	8356422	1112315	2672528 0	5459320 3	48216523

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen der Vor- und Abbauprodukte mit dem Kationenaustauscher werden die jeweiligen Wellenlängen der in Tabelle 4.3.2 angegebenen Absorptionsmaxima eingesetzt. Diese liegen in einem Strahlungsbereich von 200 – 300 nm. Betrachtet man die Retentionszeiten die aus der Ionenchromatographie resultieren, so sieht man, dass zuerst die kleineren organischen Moleküle der Vor- und Abbauprodukte eluieren. Im großen und ganzen kann man sagen, je größer der organische Anteil im Molekül desto stärker die Wechselwirkungen mit der C<sub>18</sub>-Phase der Trennsäule, desto später retenieren die Substanzen. Enthält das Molekül aber polare funktionelle Gruppen, wird die Bildung eines Ionenpaares mit dem Ionenpaareagenz der mobilen Phase wieder verstärkt, was zu einer geringeren Verzögerung der Substanzen auf der stationären Phase führt.

Die ersten Substanzen die nach der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methode nach 2 – 3 min retenieren sind die Parabase (PB), die Acetylparabase (NAPB), die p-, o- und m-Sulfanilsäuren (SA, OA; MA), wobei von den Isomeren die Orthanilsäure aufgrund der Molekülstruktur die größeren Wechselwirkungen zeigt. Darauf folgen Referenzsubstanzen in der Reihenfolge: 5-Acetylamino-8-amino-2-naphthalinsulfonsäure (5AA8ANS), Chloranilin (CA), 4-Aminoduphenylamin (4ADP), N,N-Dimethylphenylendiamin (NNDMPDA). Diese eluieren im Bereich von 4- 6 min. Dann retenieren die Substanzen (DAS), Ethylensulfon (ES), Vinylparabase (VPB) und Diaminophenylsulfon Diaminonaphthalin (DAN) im Bereich von 8 -10 min und die Analyten Sulfo-p-baseester (SPBE), C-Säure (3ANDS), H-Säure (HS) im Bereich von 12 - 15 min. Die Azofarbstoffe folgen dann mit zunehmendem Acetonitrilanteil der mobilen Phase in der Reihenfolge RO107-H, RO16-H, RB5-H, DB71, AO52 und AO5. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 30-Tabelle 32 im einzelnen dargestellt.

#### Bestimmung des Molaren Absorptionskoeffizienten im UV/Vis- Detektor

Um eine mögliche Bindung der Analyten am Kationenaustauscher zu untersuchen, werden zuerst die Molaren Absorptionskoeffizienten bestimmt. Die Methode wurde breits beschrieben.

Tabelle 33: Molare Absorptionskoefizienten der Azofarbstoffe bei der Wellenlänge 436 nm

	AO5	AO52	RO16-H	RO107-H	RB5-H	DB71
Konz. [µM/L]	139	397	88	89	97	70
Fläche beim TBAAC Puffer pH 3,0	6335668	5430026	1120769	1818092	1016190	966936
Molarer Absorptionsk. [cm <sup>-1</sup> *µM <sup>-1</sup> ]	45580	13676	12736	20660	10369	13813
Fläche beim TBAAC Puffer pH 7,5	6542613	8606161	1126768	1682206	1023895	1096978
Molarer Absorptionsk. [cm <sup>-1</sup> *µM <sup>-1</sup> ]	47069	21678	12804	19115	10447	15671

Die Ergebnisse in Tabelle 33 zeigen den Einfluss des pH-Wertes auf die Farbigkeit und damit auf den Molaren Absorptionskoeffizienten der Farbstoffe. Vor allem bei AO52 (Methylorange) steigt er von 13676 μM<sup>-1</sup>\* cm<sup>-1</sup> bei pH 3,0 auf 21678 μM<sup>-1</sup>\* cm<sup>-1</sup> bei pH 7,5. Diese entspricht dem Farbumschlag von rot nach gelb im Einsatz als Säure/Base Indikator.

Tabelle 34: Molare Absorptionskoeffizienten der Vor- und Abbauprodukte bei 200 – 280 nm

Substanzen	Konzen- tration [μΜ]	Wellen- länge [nm]	Fläche mit TBAAC Puffer [pH 3,0]	Molarer Absorptions- koeffizient bei pH 3,0 [cm <sup>-1</sup> *µM <sup>-1</sup> ]	Fläche mit TBAAC Puffer [pH 7,5]	Molarer Absorptions- koeffizient bei pH 7,5 [cm <sup>-1</sup> *µM <sup>-1</sup> ]
5AA8ANS	1000	250	2387302	2387	3250748	3250
4ADP	1279	280	18831081	14723	16599758	12978
SS	2240	210	16263747	7247	1083785	4849
NNDMPDA	1054	200	13056506	12387	11848386	11241
3ANS	3054	230	17683576	5790	16621675	5442
DAN	1503	250	13453482	8957	18462888	12292
PB	1451	280	11984826	8259	12129658	8359
VPB	1435	280	18184382	12672	17930169	12494
MeS	1611	210	1475921	9161	16889675	10484
HS	429	240	13123638	30591	12014363	28005
SPBE	696	210	8864816	12736	8757167	12582
NAPB	1076	210	7926086	7366	7568074	7026
ES	487	200	3123168	6413	2588374	5315
DAS	2054	200	25789928	12555	24507485	11931
OS	942	210	8052843	8548	7391453	7846
CA	1656	210	11566947	6981	6388774	3857

Auch bei den Farbstoffen AO5 und DB71 erhöht sich der Molare Absorptionskoeffizient mit steigendem pH-Wert leicht. In Tabelle 34 sind die Absorptionskoeffizienten der Vor- und Abbauprodukte der Farbstoffe aufgelistet. Auffällig ist hier der Einfluss des pH-Wertes bei den Stoffen OS und SS, 4ADP, CA und ES. Im pH-Bereich 3 liegen die Werte für den Absorptionskoeffizienten dieser Substanzen deutlich höher als im neutralen Medium. Den

größten Molaren Absorptionskoeffizienten zeigt HS mit ca. 3000 µM<sup>-1\*</sup> cm<sup>-1</sup>. 4ADP, VPB, SPBE und DAS besitzen Molare Absorptionskoeffizienten von ca. 12000 µM<sup>-1\*</sup> cm<sup>-1</sup>. Bei den anderen Substanzen liegen die Werte im Bereich von 3000 bis ca. 10000 µM<sup>-1\*</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 5.4.3.4 Wechselwirkungen der Azofarbstoffe mit dem Suppressor unter Einfluss von Puffer und pH-Wert

#### Puffersystem 5 mM/L Tetrabutylammoniumacetat

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen der Azofarbstoffe mit dem Kationenaustauscher wurden, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, zwei Puffersysteme Tetrabutylammoniumacetat (Eigen-pH-Wert 6,6) und -hydrogensulfat mit pH-Werten von 3.0, 5.0 und 7.5 eingesetzt. Die Azofarbstoffe wurden in bekannter Konzentration einmal direkt im UV/Vis-Detektor vermessen und anschließend mit dem Detektor vorgeschaltetem Suppressor im Vergleich untersucht. Beim Passieren des stark sauren Kationenaustauschers kommt es durch den Austausch des Tetrabuytlammoniumkations gegen H<sup>+</sup>-Ionen zu einer erhöhten Konzentration an H<sup>+</sup>-Ionen in der Lösung. Dieses könnte einen Einfluss auf den Molaren Absorptionskoeffizienten und auf die kationischen Eigenschaften der Farbstoffe haben.

Bei den Azofarbstoffen handelt es sich um aromatische Verbindungen, die Amino-, Hydroxylund Sulfonsäuregruppen als funktionelle Substituenten in ihren Molekülen besitzen. Die Azound die Aminogruppen liegen in wässrigen Lösungen, vor allem im sauren pH-Bereich,
protoniert vor. Damit bekommt das organische Molekül eine positive Ladung und reagiert wie
ein Kation, welches somit auch mit dem Kationenaustauscher in Wechselwirkung treten
könnte. Wenn diese organischen Kationen am Kationenaustauscher gebunden werden,
stehen sie für eine Untersuchung in der Massenspektrometrie nicht mehr zu Verfügung.

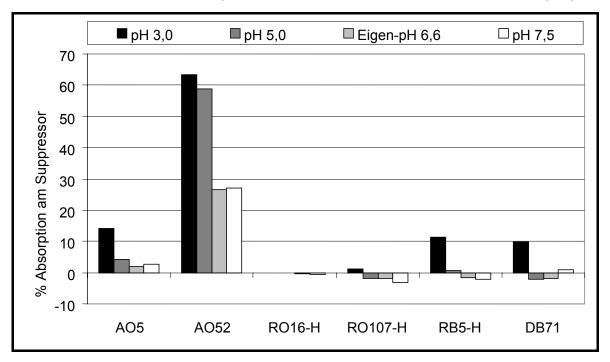


Abbildung 22: Bindung der Azofarbstoffe am Kationenaustauscher unter Einsatz des 5 mM Tetrabutylammoniumacetatpuffers bei verschiedenen pH-Werten

In der Abbildung 22 werden die Ergebnisse der Wechselwirkungen der Farbstoffe mit dem Kationenaustauscher in Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur dargestellt. Am Beispiel des Farbindikators Methylorange, hier AO52, kann der Einfluss des pH-Wertes auf die Farbigkeit und damit auch auf die Molekülstruktur deutlich gezeigt werden. Bei Methylorange

handelt es sich um einen Azofarbstoff, an dem sich an der Azobrücke zwei in p-Stellung substituierte Phenylringe befinden (Abbildung 23). An einem der Phenylringe befindet sich eine Sulfonsäuregruppe und am anderen eine Dimethylaminogruppe als Substituent. Die Dimethylaminogruppe am Phenylring hat aufgrund des positiven mesomeren Effektes nur geringe basische Eigenschaften, die allerdings teilweise durch den Elektronen schiebenden Effekt der Methylgruppen wieder verstärkt werden. Im sauren Milieu findet eine Protonierung statt, die über zwei mesomere Grenzstrukturen und der Bildung eines chinoiden Systems stabilisiert wird. Dabei kommt es zu einer Farbänderung von gelb nach rot. Der Farbstoff kann aufgrund seiner Farbveränderung resultierend aus der Protonenumlagerung als Indikator bei Neutralisationsreaktionen bzw. -titrationen eingesetzt werden.

Die Eigenschaft der Bildung eines stabilen Kations des Farbstoffes AO52 führt zu einer Bindung von 27-30 % des eingesetzten Farbstoffes bei den pH Werten 6,6 und 7,5 am stark sauren Kationenaustauscher. Durch Ansäuern des Puffers mit Schwefelsäure auf pH 5 bzw. pH 3, nahm die Protonierung des Farbstoffes deutlich zu und damit stieg auch die Adsorption am Kationenaustauscher auf ca. 60 % des gelösten Farbstoffes.

Abbildung 23: Mesomere Grenzstrukturen des Farbstoffmoleküls AO52

Die Molekülstruktur von AO5 gleicht der von AO52 (Abbildung 24). Allerdings befindet sich anstelle der Methylgruppen eine weitere Phenylgruppe an der Aminogruppe. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffes wird zusätzlich in dieses delokalisierte System der  $\pi$ -Elektronen des aromatischen Restes miteinbezogen. Daurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung eines Protons und dadurch die Bildung eines stabilen Kations. Auch tritt hier keine Umlagerung des Protons im Molekül, wie bei Methylorange beschrieben, auf. Dadurch wird der Farbstoff nur mit ca. 5 % absorbierter Menge bei pH 6,6 und pH 7,5 deutlich weniger gebunden als Methylorange bei gleichen pH-Werten. Und auch bei pH-Werten von 5 und 3 liegt die absorbierte Substanzmenge mit maximal 15 % deutlich unter der von Methylorange bei diesem pH-Wert.

Abbildung 24: Mesomere Grenzstrukturen des protonierten Farbstoffes AO5

Das Molekül des Reaktivfarbstoff RO16-H besteht aus einer Azogruppe, an der sich auf der einen Seite ein Phenylrest mit einer Ethanolsulfonylgruppe befindet und auf der anderen Seite ein Naphthylrest, der mit einer Hydroxylgruppe an 1.-, einer Sulfonsäuregruppe an 3.- und einer N-Acetylaminogruppe an 6. Position substituiert ist. Eine Protonierung ist hier einmal an der Azogruppe und andererseits an der N-Acetylaminogruppe möglich (Abbildung 25). Die Azogruppe ist jedoch durch die Tautomerie zwischen der sich in ortho-Stellung befindenden Hydroxylgruppe vor einer Protonierung geschützt [3]. Die N-Acetylaminogruppe besitzt nur eine geringe Basizität, da die Naphthyl- und Carbonylgruppe elektronenziehend wirken und das freie Elektronenpaar des Stickstoffes mehr in die mesomeren Grenzformeln des Säureamids und des Naphthylrestes mit einbezogen wird. Zusätzlich wird der negative induktive Effekt der Naphthylgruppe durch die elektronenziehenden Einflüsse der Hydroxylund der Sulfonsäuregruppe noch verstärkt. Diese Molekülstruktur lässt sich nur sehr schlecht in eine kationische Verbindung überführen und wird deshalb auch bei niedrigen pH-Werten nicht vom Kationenaustauscher gebunden.

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_4 \\ \text{CH}_5 \\$$

Abbildung 25: Mesomere Grenzstrukturen des protonierten Farbstoffes RO16-H

Der Reaktivfarbstoff RO107-H besteht aus zwei Phenylringen (siehe Abbildung 26), die über eine Azogruppe verbunden sind. An dem einen Phenylring befindet sich eine N-Acetylaminogruppe in ortho-Stellung zur Azogruppe, in meta Stellung eine Sulfonsäuregruppe und direkt daneben in para-Stellung eine Aminogruppe. Die Sulfonsäuregruppe bewirkt durch ihren – I-Effekt und ihren –M-Effekt direkt in Nachbarschaft zur Aminogruppe einen verstärkten mesomeren Effekt auf das freie Elektronenpaar am Stickstoff. Die Elektronendichte am Stickstoffatom wird so verringert, das sich kein stabiles Kation mehr ausbilden kann. Auch hier findet daher, wie beim Farbstoff RO16-H, praktisch keine Bindung am Kationenaustauscher statt.

Abbildung 26: Mesomere Grenzstrukturen des protonierten Farbstoffes RO107-H

Der Farbstoff RB5-H enthält eine Naphthylgruppe die über zwei Azogruppen mit jeweils einem Phenylring verbunden ist (Abbildung 27). An den beiden Phenylringen befinden sich jeweils eine Ethanolsulfonylgruppe. Am Naphthylring befinden sich eine Aminogruppe in 1-, zwei Sulfonsäuregruppen in 3- und 5- und eine Hydroxylgruppe in 8-Position. Bei der Hydroxylgruppe überwiegt der positive mesomere Effekt der freien Elektronenpaare den negativen induktiven Effekt. Die zwei Sulfonsäuregruppen wirken mit ihrem negativen induktiven als auch negativen mesomeren Effekt und verringern die Elektronendichte im aromatischen System. Außerdem kommt es zu ähnlichen Tautomerie-Effekten wie beim Farbstoff RO16-H. Dadurch wird die Azogruppe vor einer externen Protonierung geschützt. Die Ausbildung einer positiven Ladung an der Aminogruppe erfolgt nur im sauren pH Bereich. Zusätzlich erhöhen die zwei Sulfonsäuregruppen aufgrund ihrer anionischen Eigenschaften die Wasserlöslichkeit und damit behindern sie die Bindung am Kationenaustauscher. Dieser Farbstoff wurde in den Untersuchungen bei pH 5 bis pH 7,5

nicht am Kationenaustauscher gebunden und bei pH 3 nur mit 10 % der eingesetzten Menge adsorbiert.

Abbildung 27 Mesomere Grenzstrukturen des protonierten Farbstoffes RB5-H

Das Farbstoffmolekül DB71 besteht aus einem Grundgerüst von vier Naphtylringen, die untereinander über drei Azogruppen verbunden sind (Abbildung 28). Am ersten Naphthylring befinden sich zwei Sulfonsäuregruppen, am zweiten keine und am dritten eine Sulfonsäuregruppe. Die relativ große Anzahl der Sulfonsäuregruppen bewirkt eine gute Löslichkeit des Farbstoffes im Wasser bzw. Puffer und verleiht dem Molekül anionische Eigenschaften. Am endständigen vierten Naphthylring befinden sich eine Aminogruppe in 3-, eine Sulfonsäuregruppe in 6- und eine Hydroxylgruppe in 7-Position. Diese Konstellation der funktionellen Gruppen an einer Naphthylgruppe gleicht der, die man auch im Molekül von Reactive Black 5 vorfindet. Mit dem Unterschied, dass es eine Sulfonsäuregruppe weniger enthält und die Aminogruppe anstatt in 1-Position in 3-Position am Naphthylring gebunden ist. Auch dieser Farbstoff DB71 bildet nur im sauren Bereich (hier pH 3,0) eine positive Ladung am Stickstoffatom der Aminogruppe aus. Dieser Effekt ist jedoch so gering, dass wie bei RB5-H auch nur bei pH 3,0 des Puffers nur ca. 10 % des Farbstoffes am Kationenaustauscher zurückgehalten werden.

$$SO_3H$$
 $SO_3H$ 
 $S$ 

Abbildung 28: Mesomere Grenzstrukturen des Farbstoffes DB71

## Puffersystem 1 mM/L Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

Zum Vergleich wurden die Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkungen der Stoffe am Kationenaustauscher mit einem anderen Puffersystem vorgenommen. Dieses Puffersystem wird in der HPLC in einer geringeren Konzentration (im Vergleich zu Tetrabutylammoniumacetat 5 mM) von 1 mM verwendet. Es hat einen Eigen-pH-Wert von 3,3 im Vergleich zu Tetrabutylammoniumacetat mit einem Eigen-pH-Wert von 6,6. Die Pufferkapazität des Hydrogensulfat-lons ist im Vergleich zum Acetat-lon geringer. In diesem Versuch wurde mit Natronlauge (0,1 mol/L) der pH-Wert des Tetrabutylammoniumhydrogensulfatpuffers auf 5 und 7,5 eingestellt und anschließend der Einfluss des pH-Wertes auf eine mögliche Adsorption am Suppressor untersucht. Wichtig für die Betrachtung der Ergebnisse ist, dass durch die Zugabe der Natronlauge zum Puffer zusätzliche Kationen in die mobile Phase gelangen, die wiederum am Kationenaustauscher gegen H<sup>+</sup>-Ionen ausgetauscht werden.

Die durch den Austausch entstehenden H<sup>+</sup>-lonen werden nicht durch die mobile Phase abgepuffert, wie das beim Tetrabutylammoniumacetat der Fall ist, sondern können in direkten Kontakt mit den Analyten treten. Die Untersuchung zeigt eine stärkere Bindung der Farbstoffe AO5 (8%) und AO52 (50 %) im Vergleich zu den Reaktivfarbstoffen mit maximal 9 % und DB71 mit maximal 9 % im sauren pH Bereich. Dieses Ergebnis ist mit dem des Terabutylammoniumhydrogenacetatpuffer vergleichbar und begründet sich durch die im vorherigen Kapitel dargestellten Molekülstrukturen. Allerdings tritt hier bei den Farbstoffen AO5 und AO52 ein anderer Trend als im Tetrabutylammoniumacetatpuffer auf. Die adsorbierte Menge der Farbstoffe steigt scheinbar mit zunehmenden pH-Wert an. Bei beiden Puffersystemen werden beim sauren pH-Wert Bindungswerte zwischen 50 und 60 % für den Farbstoff Methylorange erhalten. Für die pH-Werte 5 bzw. 6,6 und 7,5 weichen die Ergebnisse der Messungen in beiden Puffersystemen jedoch stark voneinander ab. Beim Tetrabutylammoniumacetat werden beim pH-Wert 7,5 ca. 25 % des Farbstoffes gebunden,

während beim Tetrabutylammonium-hydrogensulfatpuffer ca. 70 % des Farbstoffes gebunden werden.

Die Erklärung für diesen Unterschied liegt im unterschiedlichen Abpufferungsverhalten der lonenpaareagenzien und in der Zugabe von Natronlauge zum Tetrabutylammoniumhydrogensulfatpuffer um diesen auf pH 7,5 einzustellen. Die Natrium-lonen werden zusätzlich zu den Tetrabutylammoniumionen gegen H<sup>+</sup>-lonen ausgetauscht und werden nicht abgepuffert, so können sie mit dem Farbstoff reagieren. Dieses führt zu einer stärkeren Bindung von Methylorange beim pH-Wert 7,5 und 5,0 im Puffersystem Tetrabutylammoniumhydrogensulfat. Auch beim Farbstoff AO5 tritt dieser Effekt auf. Jedoch nicht so ausgeprägt wie beim AO52. Hier verringert sich die adsorbierte Menge von 10 % auf ca. 6 % bei einer Veränderung des pH Wertes von 7,5 auf 3,3.

Für die Reaktivfarbstoffe, die aufgrund ihrer Molekülstruktur relativ unempfindlich gegenüber Protonierungsreaktionen sind, ergeben sich für beide Puffersysteme vergleichbare Resultate. Nur im sauren pH Bereich tritt eine leichte Adsorption der Farbstoffe RO16-H (4 % bei pH 3,3), RB5-H (8 % bei pH 3,3) und DB71 (9 % bei pH 3,3) auf. Ein besonderer Effekt bei den Messungen in beiden Puffersystemen sind die höheren Extinktionswerte nach Durchlaufen des Suppressors im Vergleich zu den Messungen ohne Suppressor für die Farbstoffe RO107-H, RB5-H und DB71. Dieser Effekt tritt vorwiegend bei neutralem pH Wert auf und betrifft die Substanzen, die nicht am Kationenaustauscher gebunden werden. Wahrscheinlich wird durch den Einfluss des stark sauren Kationenaustauschers der Molare Absorptionskoeffizient der Stoffe verändert, wie es auch bei Methylorange (AO52) und anderen Analyten im nächsten Kapitel der Fall ist.

Tabelle 35: Übersicht über die Bindungsmenge der Farbstoffe am Kationenaustauscher mit verschiedenen Puffern und pH-Werten

	1mM/L TBAHS pH 3,3	1mM/L TBAHS pH 5,0	1mM/L TBAHS pH 7,5	5mM/L TBAAC pH 3,0	5mM/L TBAAC pH 5,0	5mM/L TBAAC pH 6,6	5mM/L TBAAC pH 7,5
AO5	6,5	7,4	9,9	14,2	4,2	2,0	2,6
AO52	49,9	67,2	72,5	63,3	58,9	26,6	27,2
RO107-H	3,2	-0,6	1,8	0,2	0	0,4	0,5
RO16-H	-0,6	-1,0	-2,4	1,2	-1,8	-1,7	-3,1
RB5-H	6,8	0,8	-2,3	11,2	0,7	-1,5	-2,2
DB71	8,5	1,0	-2	9,7	-2,1	-1,9	1,0

# 5.4.3.5 Wechselwirkungen der Vor- und Abbauprodukte mit dem Suppressor unter Einfluss von Puffer und pH-Wert

### Puffersystem 5 mM/L Tetrabutylammoniumacetat

Beim anaeroben biologischen Abbau der Azofarbstoffe entstehen oftmals kurzkettige aromatische Amine als Intermediate. Die Azogruppe wird gespalten und im sauerstoffarmen Milieu zu einer Aminogruppe reduziert. Zur Aufklärung des Abbaumechanismuss der Farbstoffe ist die Strukturanalyse mittels LC/MS sehr wichtig. Deshalb wurden bekannte wichtige Intermediate und Ausgangs- bzw. Kupplungskomponenten auf ihre Eigenschaften bezüglich der Kationenbildung und damit der möglichen Bindung am Suppressor untersucht. Vor allem der Einsatz von Puffersystemen mit nahezu neutralen pH-Werten (6,6 und 7,5) sollen eine Kationenbildung möglichst verhindern und somit die Stoffe den Kationenaustauscher passieren lassen, damit man sie im Massenspektrometer analysieren kann. An den Ergebnissen dieser Untersuchung sieht man besonders deutlich, dass gerade

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

die Substanzen die freie Amino- und keine Sulfonsäuregruppen im Molekül besitzen, vom Suppressor zurückgehalten werden.

Dieses sind die Substanzen 4ADP, NNDMPDA, DAN, PB, VPB, ES, DAS und CA deren Struktur in Abbildung 29 dargestellt sind. Beim 4ADP handelt es sich um ein Abbauintermediat aus dem Farbstoff AO5. Wie aus den vorherigen Untersuchungen der Bindung der Farbstoffe bekannt ist, werden vorwiegend im sauren pH Bereich ca. 10 % dieses Farbstoffes am Kationenaustauscher zurückgehalten. Nach der reduktiven Spaltung der Azogruppe befindet sich ein Molekül mit Sulfonsäuregruppe und Aminogruppe in para Stellung (Sulfanilsäure) und ein Molekül ohne Sulfonsäuregruppe, die Substanz 4ADP im Abwasser (siehe Abbildung 30). Durch die zwei Aminogruppen am 4ADP reagiert diese Abbaukomponente basischer als sein Ursprungsfarbstoff. Dazu kommt seine geringe Wasserlöslichkeit aufgrund der nicht vorhandenen Sulfonsäuregruppen. Beide Faktoren tragen zu dem Ergebnis der 100 % igen Bindung am Kationenaustauscher bei.

Gleiches gilt für die Substanz NNDMPDA. Hierbei handelt es sich um ein Intermediat des anaeroben Abbaues von Methylorange (AO52). Schon die Untersuchungen dieses Farbstoffes zeigten aufgrund der guten Stabilisierung eines Kations in diesem Molekül eine relativ große Bindung am Kationenaustauscher. Nach der Spaltung der Azogruppe befindet sich nun noch eine zusätzliche Aminogruppe am Molekül. Ohne eine Sulfonsäuregruppe in der Struktur, wird auch dieser Stoff zu 100 % bei den untersuchten pH-Werten am Kationenaustauscher gebunden. Die Sulfanilsäure (SS), die beim Abbau beider Farbstoffe entsteht, enthält zwar auch eine Aminogruppe, aber zeigt aufgrund anionischer Eigenschaften durch die Sulfonsäuregruppe keine Adsorption am Kationenaustauscher.

Auch die Substanzen, die beim reduktiven Abbau der Reaktivfarbstoffe entstehen, wie DAN, PB und VPB enthalten keine Sulfonsäuregruppen, jedoch freie Aminogruppen. Diese Stoffe bilden stabile Kationen bzw. reagieren schwach basisch (pKs > 5) im wässrigen Medium und bleiben so unabhängig vom pH-Wert des Puffers zu mehr als 95 % am Kationenaustauscher zurück.

Sobald diese Aminogruppe jedoch durch eine Acetylgruppe geschützt wird, wie das bei der NAPB der Fall ist, kann keine Protonierung und damit auch keine Adsorption am Kationenaustauscher stattfinden (Abbildung 30).

Ethylensulfon

Chloranilin

$$\mathbf{H_2}\mathbf{\bar{N}} - \underbrace{\begin{array}{c} \mathbf{\bar{O}} \\ \mathbf{\bar{N}} \\ \mathbf$$

Diaminophenylsulfon

Abbildung 29: Mesomere Grenzstrukturen der Stoffe, die vom Suppressor gebunden werden

Die Substanz ES besitzt zwei Amino- und zwei Sulfongruppen im Molekül (Abbildung 29). Dieses Molekül besitzt somit teilweise kationische sowie auch anionische Eigenschaften und wird zu ca. 70 - 80 % am Kationenaustauscher zurückgehalten.

Die Substanzen CA und DAS bilden aufgrund ihrer freien Aminogruppen auch bei neutralen pH-Werten stabile Kationen und werden zu 100 % am Suppressor adsorbiert.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die Protonierung der aromatischen Amine und damit die Ausbildung von Kationen auch im neutralen pH-Bereich stattfindet und eine Wechselwirkung mit dem Kationenaustauscher durch pH-Wert Einstellungen im neutralen Bereich nicht verhindert werden kann.

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

$$\begin{array}{c} H_2N \\ \hline \\ N \\ \hline \\ N \\ \\ N \\$$

Abbildung 30: Mesomere Grenzstrukturen der Stoffe, die am Kationenaustauscher adsorbieren

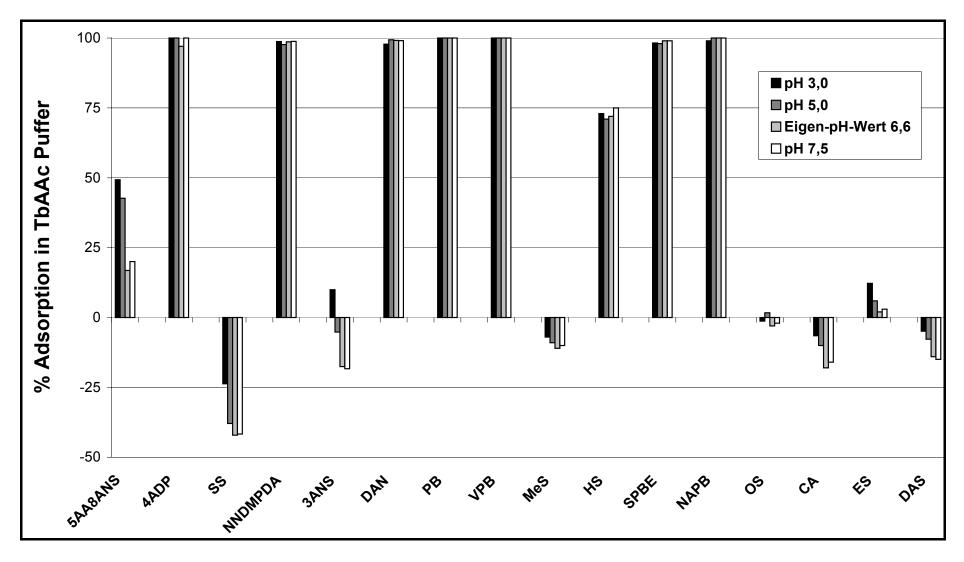


Abbildung 31: Bindung von Intermediaten und Abbaustoffen der Farbstoffe am Kationenaustauscher im Puffersystem Tetrabutylammomniumacetat mit unterschiedlichem pH-Wert

Die aromatischen Aminosulfonsäuren, die in wässrigen Lösungen anionische Verbindungen bilden, werden vom Kationenaustauscher nicht zurückgehalten (Abbildung 32 und Abbildung 33).

MS, SS, OS (pK<sub>S</sub>-Wert  $\leq$  3), 3ANDS (Abbauprodukt von DB71) und die HS, sowie SPBE (Vorstufen bei der Herstellung der Reaktivfarbstoffe Reactive Black 5 und RO16-H), zeigen keinerlei Wechselwirkungen mit dem Kationenaustauscher (Abbildung 32). Erst bei Einstellung eines leicht sauren pH-Wertes von 5 bzw. 3 des Puffers kommt es zu einer geringen Adsorption der Stoffe C-Säure (ca. 10 %) und Metanilsäure (ca. 12 %). Beim Intermediat 5AA8ANS wird beim niedrigeren pH-Wert die Affinität zum Kationenaustauscher verstärkt (von ca. 20 % bei pH 6,6 und 7,5 auf 40 % bei pH 3,0).

Abbildung 32: Mesomere Grenzstrukturen der Abbaustoffe, die nicht am Kationenaustauscher gebunden werden

Abbildung 33: Mesomere Grenzstrukturen der Abbaustoffe, die nicht am Karionenaustauscher gebunden werden

In der Abbildung 32 sieht man deutlich, dass für die Substanzen SS und OS, NAPB und HS negative prozentuale Bindungswerte durch die Wechselwirkungen mit dem Kationenaustauscher erhalten werden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Werten der Molaren Absorptionskoefizienten bei verschiedenen pH-Werten, erklärt sich dieser Effekt durch den Einfluss des stark sauren Kationenaustauschers (Organische Polymermatrix mit Sulfonsäuren) auf die Molekülstruktur. Beim pH-Wert 3 sind die Absorptionskoeffizienten größer als bei pH-Wert 7,5. Zum Beispiel bei p-Sulfanilsäure beträgt der Molare Absorptionskoeffizient im sauren pH-Bereich 7247 cm <sup>-1</sup>\*µM<sup>-1</sup>, dagegen bei pH 7 nur 4850 cm <sup>-1</sup>\*µM<sup>-1</sup>. Dadurch wird im UV/Vis-Detektor nach dem Passieren des Kationenaustauschers eine größere Menge des Stoffes als bei der direkten Bestimmung im Detektor gemessen.

### Puffersystem 1 mM/L Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

Um einen eventuellen Einfluss des Puffers auf die Wechselwirkungen der Analyten mit dem Kationenaustasucher zu untersuchen wurden die gleichen Versuche mit einem Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Puffer durchgeführt. Dieser Puffer besitzt bei einer Konzentration von 1 mM pro Liter einen pH-Wert von 3,3. Durch Zugabe von Natronlauge wurde dieser auf 5,0 bzw. 7,5 angehoben. Die Ergebnisse der Untersuchung mit TBAHS als mobiler Phase werden in der Abbildung 4.6.6. dargestellt.

Wieder werden für die Stoffe ohne Sulfonsäuren- aber mit freien Aminogruppen, wie 4ADP, NNDMPDA, DAN, PB, VPB, ES, DAS und CA (Abbildung 29) Bindungswerte um die 100 % gemessen. Der Versuch durch pH-Wert-Optimierung im nahezu neutralen pH-Bereich (5 bis 7,5) eine basische Reaktion und damit die Bildung von stabilen Kationen zu verhindern, war auch in diesem Puffersystem erfolglos.

Sobald die Moleküle jedoch Sulfonsäuregruppen in ihren Strukturen besitzen, verringern sich die Wechselwirkungen mit dem Kationenaustauscher. Aufgrund ihrer anionischen Eigenschaften werden die Stoffe NAPB, der SPBE, HS, SS und OS nicht am Suppressor zurückgehalten. Die Analyten 3ANS und MS werden nur in ganz geringer Menge von

weniger als 5 % am Suppressor zurückgehalten. Eine Ausnahme bildet hier das Intermediat 5AA8ANS. Es zeigt ein mit den Farbstoffen AO5 und AO52 vergleichbares Verhalten im Tetrabutylammoniumhydrogensulfatpuffer. Der Trend einer geringeren Absorption im sauren pH-Bereich könnte auch hier durch die Zugabe der Natronlauge zur Einstellung der pH-Werte 5 und 7,5 und der dadurch zusätzlich frei gesetzten H<sup>+</sup>-Ionen entstehen. Diese zusätzlichen H<sup>+</sup>-Ionen reagieren mit dem Analyten und es kommt zu einer stärkeren Bindung am Kationenaustauscher.

Ein Effekt der auch im Tetrabutylammoniumacetatpuffer zu beobachten war, ist die leicht erhöhte Adsorption für Stoffe, die den Suppressor ohne Bindung passieren. Dadurch wird für die Bindungsrate eine negative % Zahl erhalten. Dieses trifft hier für die Stoffe, Ssund OS, HS und NAPB zu. Vor allem bei der p-Sulfanilsäure tritt dieser Effekt sehr stark auf. Das bedeutet, beim Durchlaufen des stark sauren Kationenaustauschers verändert sich der Koeffizient und eine größere Strahlungsabsorption wird festgestellt.

Tabelle 36: Übersicht über die Bindungswerte der Intermediate und Abbaustoffe am Kationenaustauscher mit verschiedenen Puffern und pH-Werten

	1mM TBAHS pH3,3	1mM TBAHS pH5,0	1mM TBAHS pH 7,5	5mM TBAAC pH 3,0	5mM TBAAC pH 5,0	5mM TBAAC pH 6,6	5mM TBAAC pH 7,5
5AA8ANS	25	49	50	49,3	42,6	16,8	20,0
4ADP	100	99,8	99	100	100	97	100
SS	-17	-22	-32	-22	-30	-38	-38
NNDMPDA	99	95	95	98,7	97,6	98,6	98,8
3ANS	5	6,3	-3	10,6	0,6	-17	-18,2
DAN	100	100	100	97,8	99,4	99,16	99,1
PB	100	100	100	100	100	100	100
VPB	99,8	99,6	99,7	100	100	100	100
MS	3,3	5	5,5	10	5	1	2
OS	-10	-8	-9	-8	-10	-18	-17
HS	-2	-9	-18	-8	-10	-14	-15
ES	77	78	80	72	71	71,5	77
NAPB	-5	-4	-7	-5	-7	-10	-8
SPBE	-2	-1	-3	-1	2	-2	-1
DAS	98	99	100	98	98	99	100
CA	99	100	99	100	100	100	100

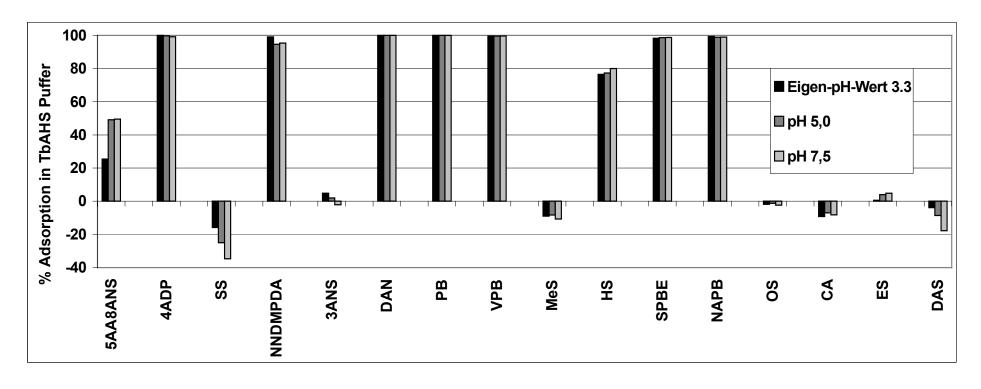


Abbildung 34: Bindung von Intermediaten und Abbaustoffen der Farbstoffe am Kationenaustauscher im Puffersystem Tetrabutylammomniumhydrogensulfat mit unterschiedlichem pH-Wert

#### Anwendung des Suppressors in Kopplung mit LC-MS

Die Bestimmung der Austauschkapazität des Ionenaustauschers ergab mit einem Wert von 250 µM pro Kartusche eine ausreichende Kapazität, um in einer 15 minütigen Chromatographiemessung den mit einer Konzentration von 5 mM/L fließenden Terabutylammoniumpuffer zu entfernen. Mit einer Taktzeit von 40 min wird die belegte Kationenaustauschkartusche zur Regenerierung mit Schwefelsäure und Aceton, und nach weiteren 40 min zur Neutralisierung mit Wasser weiter geschaltet. Demnach ist es auch möglich, den Suppressor für die eine Methode mit 10mM Tetrabitylammoniumacetat einzusetzten.

Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen kationischen Analyten und dem aufgrund von Sulfonsäuregruppen stark sauren Kationenaustauscher kann man zwei Gruppen von Molekülen unterscheiden: Aromatische Amine einmal mit und andererseits ohne Sulfonsäuregruppen. Aromatische Amine und Azofarbstoffe, die in wässrigen Lösungen mit einem pH-Wert zwischen 3 und 7,5 basische Reaktionen zeigen und protonierte Verbindungen bilden, werden vom Kationenaustauscher teilweise zurückgehalten. Bei den Farbstoffen handelt es sich dabei um AO52 und AO5. Im Tetrabutylammoniumacetatpuffer werden bei einem pH Wert von 7,5 noch ca. 30 % von AO52 gebunden. Wird der pH-Wert auf pH 3 erniedrigt steigt dieser Wert auf 60 % an. Der Farbstoff AO5 wird bei neutralem pH-Wert mit nur 3 % gebunden, bei pH 3 allerdings steigt die Menge aufgrund der stärkeren Protonierung des Moleküls auf 14 % an. Auch für die Reaktivfarbstoffe und DB71 ist ein neutraler pH-Wert der mobilen Phase optimal. Nur bei pH-Werten von 3 kommt es zu einer geringen Bindung von RB5-H und DB71 von bis zu 10 % am Kationenaustauscher.

Sulfonierte organische Moleküle wie SS, HS, 3ANDS und SPBE treten aufgrund anionischer Eigenschaften bei Puffer pH-Werten von 6 - 7 nicht in Wechselwirkung mit Kationenaustauscher. Sie können in der Massenspektrometrie qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Problematischer erweist sich die Kationensuppression für die Analyse der Abbau-komponenten die keine Sulfonsäuregruppe jedoch freie Aminoverbindungen im Molekül besitzen. Die Bildung von protonierten Verbindungen findet hier auch bei neutralen pH Werten von 6 oder 7,5 statt.

Deshalb werden diese Stoffe, wie 5AA8ANS, 4ADP, NNDMPDA, DAN, PB, VPB, ES, CA und DAS auch bei pH 7,5 der mobilen Phase bis zu 95 % am Kationenaustauscher gebunden. Für quantitative Messungen muss jedoch entweder auf ein alternatives Messsystem ohne Ionenpaarreagenz und damit ohne Kationenaustauscher oder aber auf den Diodenarray-Detektor der HPLC ausgewichen werden.

Der Einsatz des Ionen-Suppressors zwischen der chromatographischen Trennung mit Dioden Array Detektion und dem Elektrospray-Interface stellt ein zusätzliches Totvolumen dar, das zu einer Bandenverbreiterung der Peaks führen kann. Abbildung 35 zeigt im Vergleich Peaks der Standardlösung, die mit der Monitoring Methode (DAD und MRM) gemessen wurden. Die zu beobachtenden Bandenverbreiterung führt zu keinem wesentlichen Verlust an chromatographischer Auflösung. Auch andere Untersuchungen zeigen, dass dieser Effekt nicht zu einer Verschlechterung der Empfindlichkeit des LC-ESI-MS führt [208].

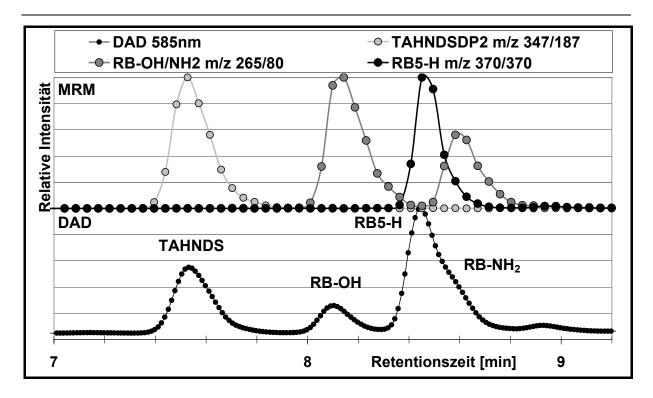


Abbildung 35: Vergleich der Peakbreiten von RB5-Hydrolysiert, RB-OH/NH<sub>2</sub> und TAHNDS<sub>DP2</sub> vor (Dioden Array Detektor) und nach (ESI-MS/MS) der Kationensuppression

#### 5.4.4 Chromatographie an Umkehrphasen mit polarer Selektivität

Speziell auf die chromatographischen Erfordernisse polarer Verbindungen zugeschnittene Phasen stellen die Umkehrphasen mit polarer Selektivität dar. Sie enthalten z.B. Amid- oder Carbamatgruppen in den Alkylketten, um die Analyse stark basischer, saurer und polarer Verbindungen unter Verwendung rein wässriger Eluenten zu verbessern (siehe Abbildung 36). Die polare Funktionalität soll hierzu einerseits die hydrophilen Eigenschaften erhöhen (Benetzbarkeit mit wässrigen Eluenten) und andererseits die Wechselwirkung wie Wasserstoffbrücken-bildung und Dipol-Dipol zwischen Analyt und stationärer Phase steigern.

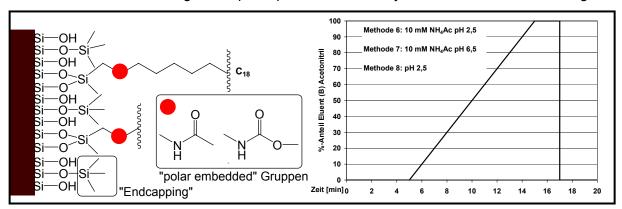


Abbildung 36: (Links) C18 RP-Phase mit "Endcapping" oder polar "embedded" Gruppen (Carbamat-, Amid-Gruppe) [217]; (Rechts) Methoden 6-8 zur Evaluierung der polar embedded/modifizierten RP-Säulen [Eluent A: Wasser (pH-Werteinstellung mit Ameisensäure), Eluent B: Acetonitril]

Der Effekt der verbesserten Retention und Peak-Symmetrie beispielsweise phenolischer Verbindungen wird der Abschwächung der Restsilanolaktivität durch die eingebundenen polaren (embedded) Gruppen zugeschrieben [215]. Zur Untersuchung der Retentions-

eigenschaften der Standardlösung auf Phasen mit polarer Selektivität im Vergleich zur Ionenpaarchromatographie wurden eine Reihe Säulen getestet, die aufgrund einer polaren Modifikation der Alkylketten durch polares "Endcapping", polares "Embedding" oder eine endständige Phenylgruppe (Retention durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung) in Betracht kamen (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Getestete polar embedded/endcapped Umkehrphasen ohne TBA-Ionenpaarreagenz

Abk.	Тур	Modifikation	L x d [mm]	d <sub>ρ</sub> [μm]	Hersteller
SH	Synergi Hydro	C18 pep <sup>1</sup>	150 x 4,6	4	Phenomenex, Aschaffenburg
PA5µ	ProntoSIL ace-EPS	C18 pebp <sup>2</sup>	125 x 4	5	Bischoff, Leonberg
PA3µ	ProntoSIL ace-EPS	C18 pebp	125 x 4	3	Bischoff, Leonberg
SS	Symmetry Shield	C18 pebp	150 x 4,6	5	Waters, Eschborn
PP	ProntoSIL Phenyl	Propyl-Phenyl	150 x 4,6	5	Bischoff, Leonberg

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>pep – polar endcapped phase, <sup>2</sup>pebp – polar embedded phase

Für den Vergleich der Retentionseigenschaften wurde die Standardlösung mit jeweils drei Methoden untersucht, die in Abbildung 36 (rechts) dargestellt sind. Sie unterscheiden sich im pH-Wert (Einstellung mit Ameisensäure) und im Gehalt an Ammoniumacetat. Um die Retention sehr polarer Verbindungen zu beurteilen, beginnen die Methoden mit einer fünfminütigen, rein wässrigen isokratischen Phase.

Die Darstellung der Kapazitätswerte in Abbildung 37 zeigt, dass Metanilsäure und H-Säure auf keiner der getesteten Phasen mit polarer Selektivität zurückgehalten. Die Retentionseigenschaften der PP-Säule sind insgesamt am schwächsten für alle untersuchten Verbindungen in der Standardlösung. Auch die SH-Säule zeigt bei der Retention der übrigen Verbindungen eine nicht ausreichende Selektivität. Die mit der Methode 7 (pH 6.5) gemessenen Werte sind in den folgenden Grafiken nicht dargestellt, weil die Retention bei diesem pH-Wert noch geringer war als bei Methode 6. Neben Metanilsäure wurden auch die Isomere Sulfanil- und Orthanilsäure auf keiner der untersuchten Säulen ausreichend (k`>1) reteniert. Die hochsubstituierte Verbindung TAHNDS<sub>DP2</sub> wird nur auf den PA-Säulen mit 3µ und 5µ-Material und unter spezifischen Bedingungen reteniert. Bei identischem polar modifiziertem Kieselgel zeigt sich der Einfluss der Partikelgröße auf die Retention, die für kleine polare Verbindungen auf der PA mit 5µ-Matrial durchweg höher ist als bei PA 3µ-Material. Dieser Effekt kehrt sich für größere Moleküle um (ab RB-NH<sub>2</sub>). Die nicht beobachtete Retention von Metanilsäure und H-Säure ist wahrscheinlich auf die Restsilanolaktivität zurückzuführen, die zu einem Donnan-Ladungsauschluss der anionischen Verbindungen führt [202]. Auch unter den getesteten neutralen Pufferbedindungen lagen die sulfonierten Verbindungen in der dissozierten Form vor.

Die Einführung polarer Gruppen in die Alkylketten zur Abschirmung der Restsilanolaktivität unterbindet bei keiner der untersuchten Säulen den Ionenausschluss durch Ladungsabstossung vollständig. Der rein wässrige, angesäuerte Eluent führt zu einer Verbesserung der Retention anionischer Verbindungen im Vergleich zur Chromatographie mit Ammoniumacetat. Die höhere Retention polarer Verbindungen wird einerseits auf die verringerten hydrophoben Eigenschaften der Phasen mit eingebundenen polaren Gruppen und eine höhere Wasserstoffbrückenbildungswechselwirkung zurückgeführt [215], wenn rein wässrige Eluenten ohne Zugabe von Puffersalzen verwendet werden. Andererseits führt die Verwendung von Ammoniumacetat zu einer Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten, die die nicht-spezifischen polaren Wechselwirkungen der anionischen Verbindungen stört und zu einer verringerten Retention führt. Zusätzlich kann die Adsorption von Ammoniumacetat an der stationären Phase zu einer Verstärkung der Ladungsabstoßung anionischer Verbindungen führen.

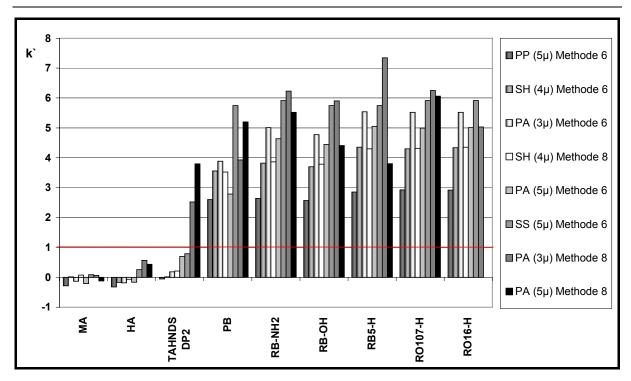


Abbildung 37: k'-Werte ausgesuchter Verbindungen auf unterschiedlichen Säulen

Die durchgeführten Untersuchungen belegen dies am Beispiel der PA-Säulen mit 3μ- und 5μ-Material, bei denen ohne Zusatz von Ammoniumacetat höhere Retentionszeiten für die sehr polaren anionischen Verbindungen beobachtet wurden. Dieser Effekt lässt sich auch für die kationische Verbindung p-Base bestätigen. Hier liegt die Retention auf der PA (5μ)-Säule bei wässrigem Eluent wesentlich höher als mit Ammoniumacetat-Puffer. Chen et al. beschreiben, dass sich eine Erhöhung des Ammoniumacetatgehalts bis zu einem Gehalt von 100 mM positiv auf die Stufenzahl einer Säule, die Peak-Symmetrie und die Retention polarer Substanzen auswirkt [218]. Die Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften werden den elektrolytischen Eigenschaften des Ammoniumacetats zugeschrieben, das die Wechselwirkungen der freien Silanolgruppen mit den Analyten und somit auch die Ladungsabstoßung unterdrücken soll. Die beschriebenen Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Retention polarer Substanzen auf polar modifizierten Säulen nicht durch die Zugabe höherer Mengen an Ammoniumacetat verbessert werden können. Die sich überlagernden Wechselwirkungen, die zu einer Retention bzw. Nicht-Retention anionischer Verbindungen führen, sind noch nicht vollständig verstanden.

Ein Vergleich der Chromatogramme mit Standardlösung auf der PA ( $3\mu$ )-Säule mit und ohne Ammoniumacetat ist in Abbildung 38 dargestellt. Der höheren Retention speziell der kleineren, polaren und anionischen Verbindungen bei wässrigem ammoniumacetatfreiem Eluent steht eine im Vergleich mit ammoniumacetathaltigem Eluenten sehr viel schlechtere Peak-Symmetrie (Tailing bei Peak 4, 5, 7) und höhere Peakshalbwertsbreite gegenüber. Letzteres kann sich negativ auf die Auflösung der einzelnen Verbindungen auswirken. Der Trennfaktor und die Auflösung des Isomerenpaares RB-OH/RB-NH<sub>2</sub> sind  $\alpha$  = 1,05, R<sub>S</sub> = 3,9 (ohne Ammoniumacetat) und  $\alpha$  = 1,05, R<sub>S</sub> = 4,3.

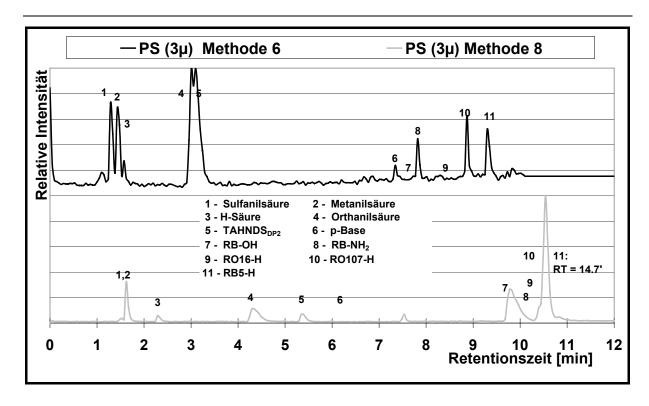


Abbildung 38: Chromatogrammvergleich (TIC der MRM-Messung) Standard-Lösung auf polar embedded Prontosil Ace (3µ) Phase mit (Methode 6) und ohne Ammoniumacetat (Methode 8)

Phasen mit eingebundenen polaren Gruppen (PA-, und SS-Säule) sowie Phasen mit polarem Endcapping (SH-Säule) zeigen im Vergleich zu herkömmlichen C8 und C18 RP-Phasen (ZE- und SB-Säule) eine verbesserte Retention polarer und anionischer Verbindungen. Für die "kleinen" sulfonierten aromatischen Amine (Sulfanilsäure, H-Säure) ist die Retention und Selektivität dieser neu entwickelten Phasen gegenüber der Ionenpaarchromatographie nicht ausreichend. Zur Trennung größerer sulfonierter Moleküle wie Azofarbstoffen konnten bei diesen Phasen sehr gute Eigenschaften beobachtet werden, die auch zur Isomerentrennung ausreichend sind. Für den Einsatz zum Monitoring verschiedenster polarer kationischer und anionischer Verbindungen sind diese Phasen insgesamt jedoch nicht geeignet.

# 5.4.5 Kalibrierung Dioden Array Detektor - Elektrospray Massenspektrometer

Die Durchführung der Kalibrierung des Analysenverfahrens mit der Standardlösung wurde in Anlehnung an die Kriterien der "Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation" durchgeführt [219]. Als Referenzstandard wurde eine Stammlösung mit den unter Kapitel 5.1 in Tabelle 15 aufgelisteten Verbindungen erstellt, die nach Einwaage in HPLC-Wasser gelöst wurden und bei 4°C gekühlt gelagert wurde. Die Konzentrationen der Standardlösung, die zur Qualitätskontrolle gemessen wurde, ist ebenso in Tabelle 15 angeführt. Zertifizierte Referenzsubstanzen standen für diese Untersuchung nicht zur Verfügung.

Die zu beurteilenden Parameter der bioanalytischen Analysenmethode schließen ein:

- Selektivität,
- Genauigkeit, Präzision, Wiederfindung,
- Kalibrierkurve und Stabilität des Analyten in einer mit Salt versetzten Probe.

Letzteres entfällt bei dieser Untersuchung, weil die Probenahme online aus dem Reaktor erfolgt und die Stabilität der Standardlösung zur Qualitätskontrolle laufend gemessen wurde.

#### Selektivität

Zur Beurteilung der Selektivität soll nach der "Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation" der Einfluss von Matrixkomponenten auf die Detektion der Referenzverbindungen untersucht werden, um auszuschließen, dass koeluierende endogene Matrixbestandteile, Metabolite oder Abbauprodukte die Detektion der Referenzsubstanz beeinflussen [219]. Die Erfahrungen beim Mehrkomponenten-Monitoring von Farbstoffen in anaeroben und aeroben Bioreaktoren mit Online-HPLC-DAD zeigten, dass die Selektivität eines Dioden-Array-Detektors zur Unterscheidung von in kurzen Abständen eluierenden ähnlich farbigen Verbindungen bzw. nicht farbigen Abbauprodukten, die im UV-Bereich absorbieren, nicht ausreicht.

Durch die nicht vorhandene Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen ist eine selektive und differenzierte Beurteilung von Abbauprozessen von Mehrkomponentensystemen nicht möglich. Ein hohes Maß an Selektivität ermöglicht ein massenselektiver Detektor wie ein Triple-Quadrupol-Massenspektromer. Bei Methode des "Multiple Reaction Moniorings" wird der Analyt unter zuvor bestimmten optimalen Bedingungen im Elektrospray-Interface ionisiert und die Analyt-Ionen ins MS geführt (siehe Abbildung 39).

Der erste Quadrupol "Q1" filtert das in der Methode festgelegte Precursor-Ion, um es in den zweiten Quadrupol "Q2" weiterzuleiten (entspricht bis hier dem Selected Ion Mode - SIM). Im Q2 wird das Ion in Gegenwart von Stickstoff als Kollisionsgas unter festgelegten Bedingungen kollisionsinduziert fragmentiert (collision induced dissociation – CID). Das dritte Quadrupol "Q3" ist so eingestellt, dass nur ein vorher definiertes Fragment-Ion (in der Regel das intensivste Ion) zum Detektor geführt wird. Die Einstellungen zur Bestimmung der optimalen Bedingungen hinsichtlich der Selektivität (charakteristische Fragmentierung) und Empfindlichkeit (Auswahl des intensivsten Precursor- und Fragmentions) können durch Injektion einer Referenzlösung mit einer Spritzenpumpe ins ESI-MS/MS bestimmt werden. Die Software Analyst 1.4 generiert für jede untersuchte Referenzsubstanz automatisch eine MRM-Methode. Alle Einzelmethoden können in einer Gesamtmethode zusammengefasst werden. Die für diese Arbeit eingesetzte Monitoring-Methode ist im Anhang zu finden.

Die Bestimmung der MRM relevanten Parameter erfolgte wie beschrieben für alle in Tabelle 39 aufgeführten Referenzsubstanzen, die in HPLC-Wasser gelöst wurden und umfasst die folgenden Einstellgrößen: m/z Transient Q1 (u)  $\rightarrow$  Q3 (u), Entclusterungsspannung (DP in V), Eintrittsspannung (EP in V), Kollisionszelleneintrittsspannung (CEP in V), Kollisionszellenaustrittsspannung (CXP in V).

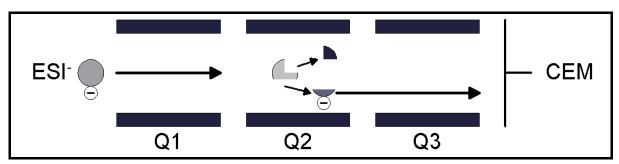


Abbildung 39: Multiple Reaction Monitoring mit dem Hybridmassenspektrometer Qtrap

### Genauigkeit, Präzision und Wiederfindung

Laut Definition wird die Genauigkeit einer Methode durch die Richtigkeit und Präzision ausgedrückt [220]. Die Richtigkeit ist die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Annäherung des Erwartungswertes des Ermittlungsergebnisses an den Bezugswert, wobei dieser nach Festlegung oder Vereinbarung der wahre oder richtige Wert sein kann. Bei der Präzision, die als qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Übereinstimmung voneinander unabhängiger Ermittlungsergebnisse einer Methode definiert ist, gilt, dass der Variationskoeffizient bei drei bis fünf Wiederholung < 15 % und an der unteren und oberen Grenze der Quantifizierung (LLOQ -. Lower Limit of Quantification und ULOQ - Upper Limit of Quantification) < 20 % sein sollte [219].

Die Präzision unterteilt sich in die Präzision einer Messreihe, mehrerer Messreihen zueinander sowie die so genannte Day-to-Day-Präzision. Die Genauigkeit soll durch drei bis fünf Wiederholungen der Messungen einer Konzentration bestimmt werden und im Mittel nicht mehr als 15% schwanken. An der unteren Grenze der Quantifizierung kann sie 20% sein. Die Wiederfindung bezieht sich in der Regel auf die Probenvorbereitung, bei der ein gewisser Verlust an Analyt zu Wiederfindungsraten <100 % führen. In der Regel wird sie bei drei Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) bestimmt.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Genauigkeit, Präzision und Wiederfindung wurden mit den Referenzsubstanzen der Standardlösung bestimmt und sind in Tabelle 39 angegeben. Die gemessene Genauigkeit der Kalibrierkurve liegt im linearen Bereich bei allen Verbindungen unter 15 % und an der unteren Bestimmungsgrenze bei weniger als 20 %. Daher sind die Werte in der Tabelle nicht angegeben. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindung unter Einfluss von Matrixeffekten werden in Kapitel 5.4.6 diskutiert.

Die Überprüfung der Day-to-Day-Präzision durch Injektion der Standardlösung (n = 34) an fünf aufeinander folgenden Tagen parallel zum Online-Monitoring zeigte eine Genauigkeit der MS/MS-Detektion von durchschnittlich 19 % für die mit 13 Verbindungen kalibrierte Monitoring-Methode. Schlechtere Reproduzierbarkeiten mit Standardabweichungen von 27 – 35 % hatten die drei Isomere der Aminobenzensulfonsäure (Metanil-, Orthanil-, und Sulfanilsäure) und die früh eluierende N-Acetyl-p-Base mit 33%. Außer RO16-H, TAHNDS<sub>DP</sub> und DB71 mit 17 – 18 % Standardabweichung lagen die Wiederholpräzesionen für alle anderen Verbindungen unter 15 %. Um die hohe Präzision der Methode fortlaufend auch während der Online-Injektion mehrwöchiger Versuchsreihen zu halten, ist die regelmäßige Reinigung wichtiger ESI-MS-Bauteile wie beispielsweise Curtain-Plate und Orepheus notwendig.

#### Kalibrierkurve

Die Kalibrierkurve gibt das Verhältnis des Geräteansprechverhaltens zur Referenzkonzentration wieder. Zur Durchführung der Kalibrierung wurden 20 unterschiedliche Konzentrationen aus der Stammlösung angefertigt und jeweils fünf Mal mit der Monitoring-Methode (siehe Abbildung 12) im MRM-Modus (Angabe der Transienten in Tabelle 39) gemessen. Die Ergebnisse der Detektion mit DAD und MS/MS sind in Tabelle 39 dargestellt.

Die MS/MS-Messung der Referenzsubstanzen ist im Vergleich zum DAD die empfindlichere Methode. Die Nachweisgrenzen (NWG) der massenspektrometrischen Detektion liegen durchschnittlich um 35 ng mL<sup>-1</sup>, die des Dioden Array Detektors etwa um das Vierfache höher im dreistelligen ng mL<sup>-1</sup>-Bereich (Mittelwert 121 ng mL<sup>-1</sup>). Die Konzentrationen an der unteren Bestimmungsgrenze des MS/MS betragen 2,8 - 4807 ng mL<sup>-1</sup> (Mittelwert 1,15 μg mL<sup>-1</sup>), die des DAD zwischen 353 - 5198 ng mL<sup>-1</sup>.

Tabelle 38: Nachweisgrenzen (NWG) und lineare Messbereiche zur Bestimmung von aromatischen Aminen, sulfonierten aromatischen Aminen, Azofarbstoffen und sulfonierten Azofarbstoffen mit LC-MS, LC-MS/MS und LC-DAD

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Analyt/ Matrix	NWG [ng mL <sup>-1</sup> ]	Linearer Messbereich [µg mL <sup>-1</sup> ]	Interface/ Ionisierung	Detektor	Stand/ Referenz
aromatischer Amine/ Textilien	7-453	0,1-30	APCI/ positiv	MS/MS Applied Biosystems API2000	2005, [236]
Sulfonierte Azofarbstoffe / Trinkwasser	7-28	15-464	-	Perkin-Elmer Lamnda 19 Spektrophotometer	2000, [237]
Sulfonierte Azofarbstoffe / Trinkwasser	1-70	0,001-0,8	Elektrospray/ negative	VG Platform ESP MS, Micromass	1997, [238]
Sulfonierte Azofarbstoffe / Abwasser	50	-	Elektrospray/ negative	Sciex TAGA 6000E MS/MS	1989, [239]
Sulfonierte Azofarbstoffe / Abwasser	100-7500	0,75-50	Elektrospray/ negative	Finnigan MT LCQ Iontrap MS	1999, [240]
Sulfonierte Aromaten/ Abwasser	3-74	-	Elektrospray/ negative	Quattro-LC MS/MS, Micromass	1999, [214]
Azofarbstoffe	15-200	-	Thermospray/ positiv	Finnigan MT MS/MS	1986, [241]
Azofarbstoffe	0,05-20	-	Thermospray/ positiv	Finnigan MT MS/MS	1989, [242]

Im Vergleich hierzu liegt der gesetzliche Grenzwert für den blauen Bereich der Durchsichtigkeitsfarbzahl (620 nm) am Ablauf einer Textilabwasser behandelnden Kläranlage bei 3 m $^{-1}$  und entspricht einer Farbstoffkonzentration (Reactive Black 5) von etwa 450 ng mL $^{-1}$  (0,6 µM). Die Nachweisgrenzen vergleichbarer LC-MS/MS-Methoden zur Bestimmung verbotener aromatischer Amine aus der reduktiven Spaltung von Azofarbstoffen liegen im mittleren ng mL $^{-1}$ -Bereich und die linearen Arbeitsbereiche zwischen 0,1-30 µg mL $^{-1}$  [226].

Die Nachweisgrenzen und Arbeitsbereiche weiterer Analysenverfahren sind in Tabelle 38 dargestellt. Die mit einem UV-VIS spektroskopischen Analysenverfahren erzielten Nachweisgrenzen unterscheiden sich bei den aufgeführten Analysenverfahren unwesentlich von den mit MS oder MS/MS gemessenen Werten. Beim Vergleich der linearen Arbeitsbereiche liegen LC-MS Analysenverfahren im mittleren ng L<sup>-1</sup>-Bereich, das mit UVVIS-Detektion arbeitenden Analysenverfahren im mittleren μg L<sup>-1</sup>-Bereich. Der Vorteil des Detektion mit Dioden-Array gegenüber den massenspektrometrischen Analysen liegt in der Unempfindlichkeit gegenüber Matrixeffekten. Die in Tabelle 38 angeführten Abkürzungen sind:

**MW** - Molare Masse, **RT** - Retentionszeit, **Q1** - *m/z* des Transienten am ersten Quadrupol, **Q3** - *m/z* des Transienten am dritten Quadrupol, **DP** - Entclusterungsspannung, **EP** – Eintrittsspannung, **CEP** - Kollisionszelleneintrittsspannung, **CXP** – Kollisionszellenaustrittsspannung, **NWG** - Nachweisgrenze, **LLOQ** - Untere Grenze der Kalibriergerade, **ULOQ** - Obere Grenze der Kalibriergerade, **r**<sup>2</sup> - Regressionskoeffizient, **RSD** - Relative Standardabweichung, **WL** - Wellenlänge

Tabelle 39: Übersicht Kalibrierung mit DAD und MS/MS

c = µM, n=5	B	NAPB	Sulfanil säure	l Metanil säure	Sulfanil Metanil Orthanil säure säure säure		RO107-H TAHNDS <sub>DP2</sub> H-Säure	H-Säure	RB-OH	RB5-H	RB-NH2	RB-NH2RO16-H DB71	DB71	A07
MM	201	242	173	173	173	442	348	319	532	743	532	492	942	353
RT (min)	2,2	3,8	4,7	5,4	6,1	1,1	7,3	7,5	7,8	8,0	8,3	8,4	9,1	9,4
Q1 (amu)	200	241	171,8	171,8	171,8	441	346,9	317,8	264,6	370,5	530	490,7	469	352
Q3 (amu)	107,9	132,0	80	80	80	186,1	187,1	237,8	80	370,6	317,9	279	469	80
DP (V)	-56	-56	-51	-51	-51	8-	-61	-151	-31	4	-91	-71	-111	-61
EP (V)	-10	φ	-10	-10	-10	-7	-10	φ	<sub>0</sub>	-7	ဝှ	-7	-7	တု
CEP (V)	<u>+</u>	-100	-12	-12	-12	-22	-18	-16	4-	-18	-38	-24	-38	-18
CE (V)	-28	-54	-34	-34	-34	99-	-44	-36	48	φ	-54	-48	-10	-78
CXP (V)	0	0	0	0	0	4-	-4	4-	0	4-	4	4-	9-	0
NWG (MRM)	,***n.b.	6,0	0,005	0,59	0,005	0,001	0,001	0,010	0,003	0,012	0,019	0,509	0,00007	0,0001
ГГОР	1	19,5	0,153	4,88	0,305	0,610	0,153	0,122	4,88	1,22	1,22	9,77	0,061	0,008
ULOD	1	625	78,1	78,1	156	625	78	7,81	313	313	625	325	7,81	31,3
***	ı	*0,9838	, *0,9940	*0,9940 *0,9953	*0,9934	*0,9977	*0,9985	*0,9927	*0,9989	*0,9982	*0,9994	*0,9982	*0,9942	*0,9957
RSD (%)	•	14,0	11,3	7,8	1,4	6,1	7,0	8,9	6,2	4,7	4,3	4,6	8,2	7
WL [nm]	270	270	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	585	300	200	285	200	200	285	400
NWG (UVVIS)	1,33	127	1	1	1		0,33	0,26	0,26	0,15	0,32	0,32	0,04	80'0
ПСОБ	9,77	156	ı	1	1	ı	4,88	15,6	2,44	0,61	9,77	4,88	~	~
ULOD	2500	2500	ı	ı	ı	ı	625	200	625	625	625	625	200	125
****		-*0,9978-	<del>~</del>	ı	ı	ı	9666'0*	*0,9997	*0,9993	*0,9991	*0,9963	**0,9987*0,9971	*0,9971	*0,9978
RSD (%)	3,1	2,6	1	1	1	ı	3,6	80	1,1	7	6,5	10,8	2,8	2'9
*Quadratisch	ne Regre	ession, x	-1 Wichtu	ng, ** Lir	neare Re	gression, x	*Quadratische Regression, x <sup>-1</sup> Wichtung, ** Lineare Regression, x <sup>-1</sup> Wichtung, ***n. b. – nicht bestimmt	***n. b. – r	nicht best	immt				

## 5.4.6 Robustheit des kontinuierlichen Online-Prozessanalysenverfahrens

Die Kalibrierung des Analysenverfahrens erfolgte mit matrixfreien Standardlösungen aus in HPLC-Wasser gelösten Referenzsubstanzen. Aufgrund der Verunreinigungen der Referenzsubstanzen beinhaltete die Standardlösung Anteile an anorganischen Salzen und organischen Verbindungen aus der Farbstoffsynthese und Farbstoffformulierung (siehe auch Tabelle 15, Seite 41 und Kapitel 6.1.1.1, Seite 108).

Realproben von azofarbstoffhaltigen Abwässern aus Reaktivfärbeprozessen enthalten neben den hydrolysierten Farbstoffen je nach Färbeverfahren bis zu 80 g L¹ NaCl und entsprechend der eingesetzten Menge an vinylsulfonbasierten Reaktivfarbstoffen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, das bei der basenkatalysierten Eliminierung (mit Natronlauge) der Sulfoestergruppe freigesetzt wird (siehe Kapitel 3.2, Seite 18). Anorganische und organische Verunreinigungen von Proben haben bei der quantitativen Bestimmung mit LC-MS einen großen Einfluss auf die Ionisierung im Elektrospray Interface [221]-[227]. Drei Probleme führen bei der MS-Detektion zu einer erhöhten Messunsicherheit bei der Quantifizierung: Matrixeffekte, Adduktbildung und Interferenzen.

Bei der Untersuchung von Matrixeffekten werden Signalsuppression, aber auch Signalerhöhung beobachtet, wobei sich beide Effekte negativ auf die Quantifizierung auswirken. Die Matrixeffekte auslösenden Ursachen sind vielfältig: Behinderung des Zugangs von Analyten zur Tropfenoberfläche (ESI), Störungen bei der Emittierung geladener Analyten aus der Gasphase und Komplexierung von Analyten durch Matrixverbindungen [221]. Nicht flüchtige Kontaminationen führen bei kontinuierlicher Messung zu Ablagerungen an der "Curtain Plate" sowie dem "Orpheus" und können bis zum Skimmer und Quadrupol "Q0" getragen werden. Diese auf anorganische und organische Substanzen zurückzuführenden Verunreinigungen vermindern insgesamt die Empfindlichkeit des Messinstruments und die Reproduzierbarkeit der Messungen.

### Matrixeffekte durch anorganische Salze

Um den Einfluss der Salzkontaminationen auf die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen zu untersuchen, wurde die Standardlösung zur Qualitätskontrolle (siehe Tabelle 15) mit NaCl (0,02; 0,2; 1; 5 mM) und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,02; 0,1; 0,5; 1 mM) angereichert. Die mit der Monitoring-Methode gemessene Detektionsempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der mit Salzen angereicherten Proben sind in Bezug zur "salzfreien" Standardlösung gesetzt und in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt. Die gemittelten Werte zeigen die abnehmende Tendenz der Detektionsintensität bei einem steigenden NaCl-Gehalt.

Am stärksten wirkte sich NaCl auf die Bestimmung des aromatischen Amins NAPB aus, das bereits bei NaCl-Konzentrationen von 0,01 M eine Signalreduktion von >50% bewirkte. Ab einer Konzentration von 1 M NaCl war es mit MS/MS nicht mehr nachweisbar. Den geringsten Einfluss hatte NaCl auf die Detektion der Vinyl-Form (RO107-V) des Farbstoffes Reactive Orange 107 (RO107), das als Nebenkomponente in der Standardlösung vorliegt.

Die Isomere Sulfanil-, Metanil- und Orthanilsäure blieben bis zu einer Konzentration von 0,1 M NaCl unbeeinflusst von einer Ionisierungssuppression durch das anwesende Salz. Ab 1 M NaCl zeigte sich eine deutliche Suppression, die sich auf die polarste und zuerst eluierende Sulfanilsäure am stärksten auswirkte. Die Suppression auf die Isomere nahm im Vergleich ab und war am schwächsten bei Orthanilsäure.

Die nacheinander eluierenden Isomere RB-OH und RB-NH<sub>2</sub> verhielten sich wie die Isomere der Sulfanilsäure. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zeigte einen stärkeren ionisierungssuppressiven Einfluss als NaCl. Abbildung 41 illustriert wie schon ab einem Gehalt von 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> die mittlere Detektionsintensität auf 77% abnimmt und bei 0,5 und 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 32 bzw. 39% absinkt.

Im direkten Vergleich ist der ionisierungssuppressive Einfluss von Na₂SO₄ auf NAPB geringer als der von NaCl. Bei den drei Isomeren der Aminobenzensulfonsäure konnte der

umgekehrte Effekt im Vergleich zur NaCl beobachtet werden.  $Na_2SO_4$ -Gehalte von 0,02 M führten zu einer signalverstärkenden Wirkung bei der Detektion der drei Aminobenzensulfonsäure-Isomere, wobei die Reihenfolge der Intensitäten umgekehrt zur Messreihe mit NaCl ist.

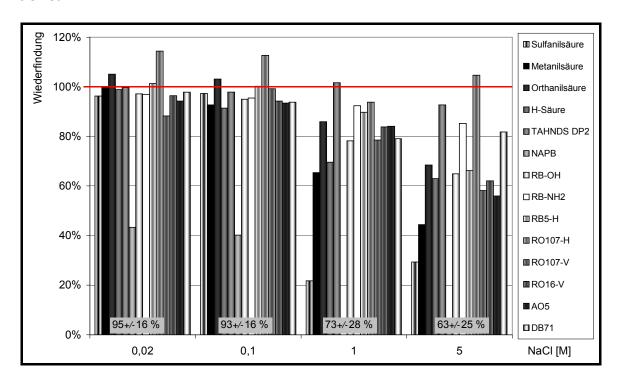


Abbildung 40: Wiederfindungsraten (Peakfläche MRM-Signal) der mit Standard versetzten NaCl-Lösungen

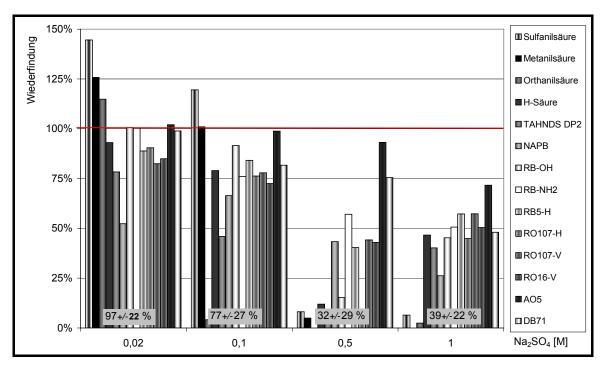


Abbildung 41: Wiederfindungsraten (Peakfläche MRM-Signal) der mit Standard versetzten Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösungen

## Matrixeffekte in Abhängigkeit von den verwendeten Trennsäulen

Zur weiteren Bestimmung der Matrixeinflüsse von Salzen auf die Detektionsempfindlichkeit des Analysenverfahrens wurden die mit Salz versetzten Referenzproben auf anderen Säulen mit und ohne Ionenpaarchromatographie untersucht. Bei der Bestimmung der Intensität der salzfreien Bezugsprobe zur Normierung zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Detektionsempfindlichkeit bei Verwendung der diskutierten Methoden und Säulen (siehe Abbildung 42 ohne AQ-Phasen).

Es ist zu erkennen, dass die niedrigsten Intensitäten auf Säulen mit polarer Selektivität unter Verwendung von Ammoniumacetat bei pH 2,5 gemessen wurden (Methode 6). Unter neutralen Bedingungen (Methode 7, pH 6,5) konnte die Signalfläche zum Teil verdoppelt werden. Intensitäten im mittleren Bereich wurden auf C<sub>8</sub> und C<sub>18</sub>-Phasen mit Ionenpaar-chromatographie erzielt, die zu Beginn kurz isokratisch (10% Acetonitril) und dann mit einem hohem Gradient eluiert wurden (Methode 4). Mit der längsten Methode (Methode 5) wurden die höchsten Intensitäten erzielt. Diese Ergebnisse decken sich mit der Empfehlung, die Retentionszeit der Analyten zu erhöhen und so die Signalintensität zu steigern [221], [225].

Die allgemein bei ESI-MS/MS als empfindlichkeitssteigernd beschriebene Wirkung von Ammoniumacetatkonzentrationen bis zu 50 mM [228] konnte im Vergleich zur lonenpaarchromatographie mit nachgeschalteter lonensuppression nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass der Kationensuppressor durch Adsorption von Matrixionen zu einer Signalerhöhung beiträgt.

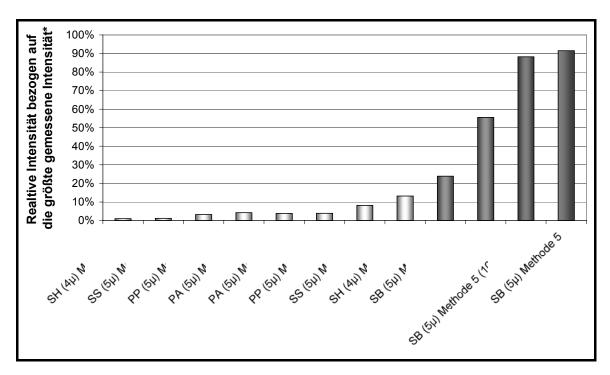


Abbildung 42: Relative Intensitäten (Peakfläche MRM-Signal) gemittelt aus den Intensitäten von acht Referenzsubstanzen der Standardlösung bezogen auf die maximale gemessene Intensität (n=3)

Der Einfluss von Salzen ist in Abbildung 43 und Abbildung 44 an verschiedenen Säulen und Methoden für die Referenzsubstanz TAHNDS $_{DP2}$  illustriert. In der Abbildung sind die Mittelwerte der Wiederfindungen aller bestimmten Referenzsubstanzen angegeben. Die AQ-Säule sowie die SB- und ZE-Säule zeigen insgesamt die besten Ergebnisse unter Zugabe von NaCl, wobei die AQ-Säule als einzige Säule auch bei einem NaCl-Gehalt von 5 M sehr gute Wiederfindungen für TAHNDS $_{DP2}$  demonstriert.

Eine Ionisierungsverbesserung durch Matrixeffekte konnte an der PA (3μ)-Säule beobachtet werden. Trotz der Signalerhöhung sind diese Effekte aufgrund ihrer schlechten Reprodu-

zierbarkeit und Unkenntnis der Mechanismen nicht erwünscht bzw. analytisch nutzbar. Wie schon unter den Bedingungen der Monitoring-Methode hat Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auch auf die anderen Säulen einen stärkeren ionisierungssuppressiven Einfluss als NaCl (siehe Abbildung 44 am Beispiel von TAHNDS<sub>DP2</sub>). Hohe Retentionszeiten unter Methode 4 auf der SB- und ZE-Säule vermindern den negativen Einfluss auf die Detektion.

Bei der Chromatographie auf Säulen mit polarer Selektivität wirkt sich Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> weniger suppressiv aus als NaCl. Die Untersuchung zeigt, dass die einfachste Maßnahme zur Reduzierung der ionisierungssuppressiven Wirkung von anorganischen Salzen aus der Probenmatix die Verlängerung der Retentionszeiten darstellt. Ein Nebeneffekt dieser Maßnahme ist die Erhöhung der Methodendauer und damit eine höheren Belastung des Kationensuppressors.

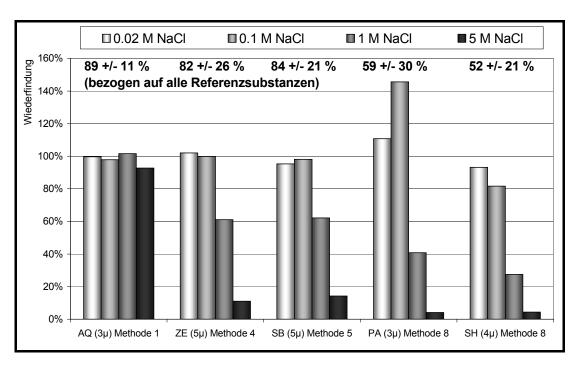


Abbildung 43: Wiederfindungsraten (Peakfläche MRM-Signal) der mit TAHNDS<sub>DP2</sub> versetzten NaCl-Lösungen auf unterschiedlichen Säulen; Mittelwerte der Wiederfindungsraten (+/-relative Standardabweichung) aller bestimmter Referenzsubstanzen, (n=3)

Andere in der Literatur diskutierte Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Minimierung von Matrixeffekten sind offline oder online durchgeführte Festphasenextraktionen (SPE), Immunoassays oder Ionenaustausch zur Matrixaufreinigung und Analytenanreicherung [175]-[176]. Ähnliche Effekte werden durch das Nanosplitten des Eluenten zum ESI [226] sowie verschiedene Techniken der Kalibrierung wie die Standardaddition [224] oder die Echo-Methode erreicht. Bei ihr wird wenige Sekunden zeitversetzt zur Probe ein Standard injiziert wird, der dann den selben Matrixeinflüssen ausgesetzt ist wie die Probe [227]. Der positive Effekt der Matrixaufreinigung wird bei einem Teil diese Methoden von einem Verlust an Analyten bei der Probenvorbereitung begleitet.

Die Bestimmung der Wiederfindungsraten bei Mehrkomponentenanalysen ist analytisch sehr aufwendig und erschwert die Methodenvalidierung. Bei dem Monitoring der untersuchten Modell- und Realabwässer betrug der Salzgehalt etwa 20 - 80 g L $^{-1}$  NaCl (342 – 1,4 mM) und der Gehalt an Na $_2$ SO $_4$  < 50 mM, so dass der durchschnittliche ionisierungssuppressive Einfluss auf die Detektion mit der Monitoring-Methode im Bereich der Messgenauigkeit der Kalibrierung von <15 % bzw. < 25% bei <100 mM Na $_2$ SO $_4$  lag.

Eine Erhöhung der Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit durch eines der beschriebenen Verfahren zur Unterdrückung von Matrixeffekten kam für die Monitoring-Methode nicht in Frage. Die beobachteten salzbedingten ionisierungssuppressiven Effekte konnten durch den Einsatz des Ionen-Suppressors weitestgehend kompensiert werden, so dass die Vorgaben des "Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation" eingehalten wurden.

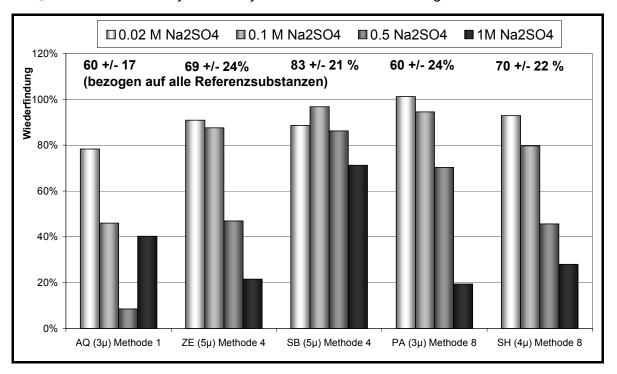


Abbildung 44: Wiederfindungsraten (Peakfläche MRM-Signal) der mit TAHNDS<sub>DP2</sub> versetzten Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösungen auf unterschiedlichen Säulen; Mittelwerte der Wiederfindungsraten (+/-relative Standardabweichung) aller bestimmter Referenzsubstanzen, (n=3)

# 5.5 Verfahrenskonzept zur biologischen Entfärbung von azofarbstoffhaltigen Abwasserkonzentraten

Das Verfahrenskonzept basiert auf dem Entfärbemechanismus, bei dem unter anaeroben Bedingungen eine reduktive Spaltung der Azobindungen, dem chromophoren Teil eines Azofarbstoffes, erfolgt und in Folge aromatische Amine freigesetzt werden. Je nach Grad der Sulfonierung der aromatischen Amine, die sich in den meisten Fällen auf die Diazonium- und Kupplungskomponente zurückführen lassen, können diese wasserlöslichen Verbindungen aus dem anaeroben Bioreaktor abgeführt werden. Nicht sulfonierte und wenig substituierte aromatische Verbindungen mit geringer Wasserlöslichkeit fallen in dieser Stufe aus und werden als Schlamm gesammelt. Bei vollständiger anaeroben Reduktion, d.h. unter optimalen Bedingungen, kann das behandelte Abwasser aus dem anaeroben Reaktor per Überlauf abgezogen werden, um es einer weiteren Behandlung zuzuführen. Die anaerobe Stufe in diesem Verfahren ist als Festbettreaktor ausgeführt.

Als zweite Behandlungsstufe ist eine aerobe Belebtschlammstufe mit Festbett vorgesehen, bei der die gelösten aromatischen Amine und sulfonierten aromatischen Amine unter oxidativen Bedingungen weiter abgebaut werden sollen, bis hin zur Mineralisierung. Bei dem entwickelten Verfahren können beide Bioreaktoren wahlweise mit einer Ultrafiltrationsmembranstufe betrieben werden, die zu einer Erhöhung der hydraulischen Verweilzeit der retenierten Verbindungen führt und so die biologische Abbauleistung zu steigert.

Den Aufbau des Verfahrens zeigt Abbildung 45. Es wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit geplant, aufgebaut und in Betrieb genommen. Die Vorarbeiten zur Entwicklung dieses Verfahrens wurden im Rahmen von Diplomarbeiten an Bioreaktoren im 3 L -Maßstab geleistet [229]-[232].

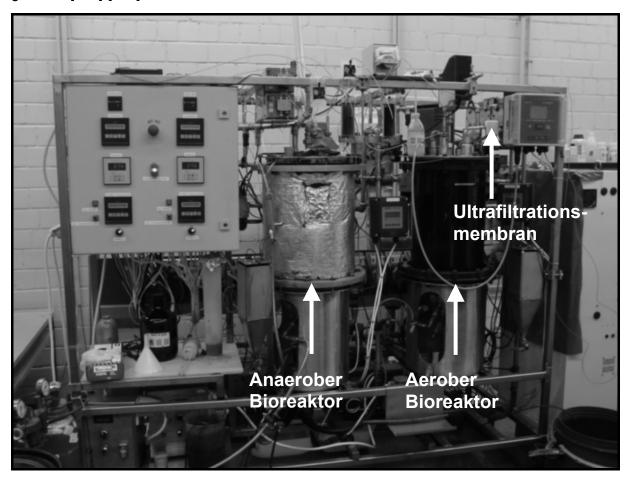


Abbildung 45: Foto des entwickelten und gebauten zweistufigen anaerob-aeroben Bioreaktors mit nachgeschalteter Ultrafiltrationsmembranstufe

#### 5.5.1 Verfahrensbeschreibung

Das entwickelte Verfahren ist in Abbildung 47 als R&I-Verfahrensfliessbild dargestellt. Der Reaktor B100 besitzt einen Käfig, in dem 3-4 L aktivkohlebeschichtete Polyurethan-Schaumwürfel mit einer Kantenlänge von 1 cm eingebracht werden können. Das zu behandelnde Abwasserkonzentrat wird aus einem Vorlagebehälter mittels Dosierpumpe P200 in den anaeroben Bioreaktor B100 eingebracht. Eine elektrische Begleitheizung wird von B115 geregelt und temperiert den Reaktor auf 38,5°C. Die Industrieschlauchpumpe P300 wälzt das Reaktorbetriebsvolumen von 30 - 40 L mit einer Fördermenge von 320 L h-1 maximal 11 mal pro Stunde um, wobei die Pulsation durch den Behälter B150 gedämpft wird. Die Durchflussmessung erfolgt an B117. Über einen Bypass, der von den Ventile V101 und V102 per Hand elektrisch geschaltet werden kann, werden Leitfähigkeit (B118) und Redoxpotential (B112) kontinuierlich gemessen. Der Bioreaktor wird über die Messstelle B111 pH-Wert geregelt (Dosierpumpen P120 Säure und P130 Base). Über eine Gasflasche kann der Reaktor mit Stickstoff gespült werden. Die Füllstandsmessung erfolgt über die Bestimmung der hydrostatischen Druckes am Reaktorboden mit B116.

Über einen Überlauf in Behälter B200 kann das zugeführte Volumen dem Reaktor entnommen werden. Als Überlaufsicherung ist in B200 ein Füllstandswächter B119 installiert, der das Ventil V103 schließt, wenn der Füllstandswächter Kontakt hat. Über die

Dosierpumpe P140 kann überschüssige Flüssigkeit wieder in den Bioreaktor B100 zurückgefördert werden. Der Export erfolgt über die Dosierpumpe P210 in B300. Beide Pumpen haben einen Filter (F110 und F120), die einen Austrag von Mikroorganismen verhindern sollen. Über eine Pendelvorlage B500 ist der Reaktor gegen äußeren Lufteintritt gesichert.

Der aerobe Bioreaktor ist in gleicher Weise wie B100 als Festbettreaktor aufgebaut. Zusätzlich verfügt er über vier Cross-Flow-Membranzellen mit je 80 cm² Fläche (M100-M400). Der Betriebsdruck der Membranen wird über die Einstellung des Ventils V303 erreicht, das von dem Druckaufnehmer B313 überwacht wird. Das in B400 gesammelte Permeat wird von P220 als Ablauf in einen Sammelbehälter exportiert. Überschüssige Flüssigkeit wird von P150 in den Reaktor zurückgeführt. Der Reaktor verfügt über keine Temperierung und wird bei Umgebungstemperatur betrieben. Die Temperaturmessung erfolgt an B315. Über eine Nanofiltrationsmembran M500 kann gefilterte (F10, F20) Luft in die Rücklaufleitung eingebracht werden. Die Bestimmung der Konzentration des gelöste Sauerstoffes erfolgt über die Sauerstoffelektrode B319 am Kopf des Reaktors.

Die Industrieschlauchpumpe P310 wälzt das Reaktorbetriebsvolumen von 30 - 40 L mit einer Fördermenge von 320 L h<sup>-1</sup> maximal 11 mal pro Stunde um, wobei die Pulsation durch den Behälter B350 gedämpft wird. Die Durchflussmessung erfolgt an B317. Über einen Bypass, der von den Ventile V302 und V303 per Hand elektrisch geschaltet werden kann, werden Leitfähigkeit (B318) und Redoxpotential (B312) kontinuierlich gemessen. Der Bioreaktor wird über die Messstelle B311 pH-Wert geregelt (Dosierpumpen P120 Säure und P130 Base). Über eine Gasflasche kann der Reaktor mit Stickstoff gespült werden. Die Füllstandsmessung erfolgt über die Bestimmung der hydrostatischen Druckes am Reaktorboden mit B316.

Über die beiden Mikrofiltrations-Inline-Sonden IL100 und IL300, die von der Schlauchpumpe P320 beprobt werden, wird durch die HPLC-Pumpen P160 und P170 kontinuierlich Probe in zwei Bypass-Kreisläufen gehalten, die über eine 75m-Kapillare zum Online-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS führen (Details siehe Tabelle 17).

#### 5.5.2 Messtechnik und Datenaufnahme

Beide Bioreaktoren sind mit einer temperaturkompensierten potentiometrischen pH-Wert-Messung mit Zweipunktregelung ausgestattet (anaerob: Messtelle B111, aerob Messtelle B311), die den pH-Wert in den Grenzen von 6,85 - 7,1 durch Dosierung von 0,4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,8 M NaOH regelt. Das Redoxpotential wird über potentiometrische Elektroden in beiden Reaktoren kontrolliert (anaerob: Messtelle B112, aerob Messtelle B312), die als Bezugssystem Ag/AgCl haben. Die pH-Elelektrode, Temperaturfühler und die Redoxelektrode befinden sich in der Rohrleitung, die kontinuierlich von den Umwälzpumpen P300 und P310 mit Reaktorinhalt durchströmt wird.

Beide Umwälzpumpen verfügen über einen Trockenlaufschutz, der an die Massendurchflussmessstellen gekoppelt ist (anaerob: Messtelle B117, aerob Messtelle B317). Sinkt der Durchfluss unterhalb des kritischen Wertes von 50 L h<sup>-1</sup>, wird die Umwälzpumpe ausgeschaltet. Eine zweite Absicherung wird durch die interne Schlauchüberwachung der Industrieschlauchpumpen gewährleistet. Dabei wird das Vakuum in einer eigens zur Schlauchüberwachung in den Schlauch eingearbeitet Sehne gemessen. Bei Überschreiten eines Druckes von 40 kPa schaltet die Pumpe aus, weil ein Defekt des Schlauches durch Abnutzung vorliegen kann. Die durchschnittliche Betriebsdauer eines drucklos betriebenen Schlauches liegt bei ca. 3000 h, die eines unter Druck betriebenen Schlauches (Membranbetriebsdruck 3-5 MPa) bei 1000 - 1500 h.

Die an den Membranen anliegenden Betriebsdrücke werden kontinuierlich mit Druckwertaufnehmern kontrolliert (anaerob: Messstelle B113, aerob: Messtelle B313). Die Füllstandsüberwachung ist druckbasiert (anaerob: Messstelle B116, aerob: Messtelle B316). Zur Kontrolle des Salzgehaltes wird die Leitfähigkeit des Reaktorinhaltes in der Umlaufleitung gemessen (anaerob: Messstelle B118, aerob Messstelle B318). Der anaerobe Reaktor ist mit einer Begleitheizung ausgestattet, die temperaturgeregelt ist (anaerob: Messstelle B115). Der aerobe Reaktor verfügt zusätzlich über eine anströmungsfreie Sauerstoffelektrode, die über den Reaktordeckel eingeführt wird (aerob: Messtelle B319).

Die Messstellen B110-113, B116-118, B210, B310-313, B316-319 sind über ein Dateninterface mit der Automatisierungssoftware LabView verbunden. Über ein Netzwerk werden die Daten gesammelt, visualisiert und stündlich automatisch dokumentiert. Die Pumpe P200 und somit der Feedstrom (sowie P210 und P220) werden über LabView (B110, B210, B310) angesteuert. Die Durchflussmenge kann zwischen 50 - 5100 mL h $^{-1}$  eingestellt werden. Die mittleren hydraulischen Verweilzeiten im anaeroben Reaktor liegen bei 0,3 - 29 Tagen. Im aeroben Bioreaktor ist die Durchflussmenge durch den Permeatfluss der Membranen limitiert. Je nach eingesetzter Membran liegt er bei 0,15 – 0,4 L h $^{-1}$  und somit bei mittleren hydraulischen Verweilzeiten von 3,5 - 10 Tagen.

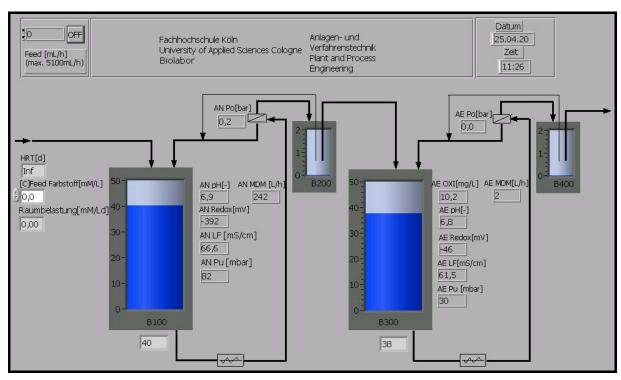


Abbildung 46: Visualisierung des biologischen Verfahrens zur Behandlung von azofarbstoffhaltigen Abwasserkonzentraten

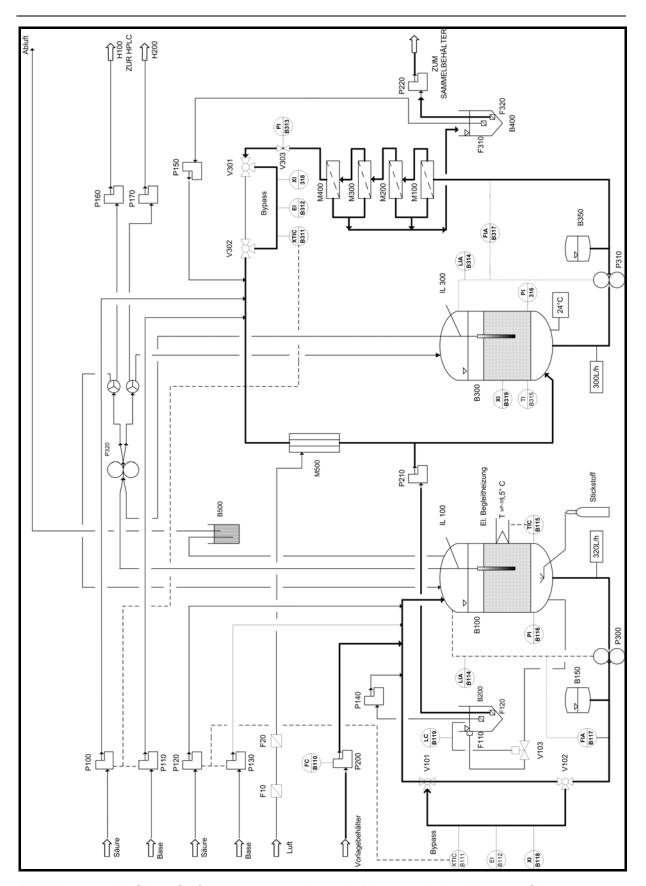


Abbildung 47: Verfahrenfließbild des anaerob-aerob Abwasserbehandlungsverfahrens

#### 5.5.3 Schlammstabilisierung und -immobilisierung

Der anaerobe Schlamm wurde dem Kreislauf des Faulturmes der kommunalen Kläranlage Overath Lehmbach des Aggerverbandes entnommen. Der Belebtschlamm in der aeroben Stufe stammte aus dem Rücklaufschlamm der Turmbiologie der Bayer Kläranlage, Leverkusen.

### Schlammstabilisierung zur schnelleren anaeroben Entfärbung

Beim Entfärben von Azofarbstoffen in Bioreaktoren hatte sich der Einsatz von Membranen zur Rückhaltung von Biomasse und höher molekularen Verbindungen in Versuchsmaßstab bewährt [229]-[232]. Durch die suspendierten Bakterien kam es allerdings zu einem erheblichen Fouling der Membranen und folglich einer Reduktion des Permeatflusses. Die Ursache für das Membranfouling wurde auf die Ansiedlung von Bakterien auf der Membranoberfläche sowie anorganischer Niederschlag zurückgeführt. Der Einsatz aktivkohlebeschichteter PU-Schaumwürfeln (PU-Carrier) sollte mit der Immobilisierung der Bakterien zu einer Reduktion des Foulings beitragen. Zusätzlich sollten die Immobilisierung auf aktivkohlebeschichteten PU-Schaumwürfeln den Schlamm bzw. die Mikroorganismen einerseits vor äußeren Einflüssen (pH-Wert-Schwankungen, Temperaturschwankungen, etc.) schützen [233] und andererseits durch die Beschichtung mit Aktivkohle zu einer Verbesserung der Reduktionsvorgänge beitragen [110], [118].

Vorversuche zur optimalen Bestückung des anaeroben Bioreaktors mit Schlamm und Schaumwürfeln sollten zeigen, ob durch die Immobilisierung mit PU-Schaumwürfeln eine wesentliche schnellerer Abbaurate des Modellfarbstoffes erzielt werden könnte. Durchgeführt wurden Batchversuche zum Abbauverhalten von hydrolysiertem Reactive Black 5 in drei luftdichten 0,5 L Behältern mit PU-Schaumwürfeln (Reihe A-C), drei ohne PU-Schaumwürfeln (Reihe D-F) und einem Kontrollbehälter ohne PU-Schaumwürfeln und ohne Farbstoffzugabe. Der anaerobe Schlamm aus dem Faulturm einer kommunalen Kläranlage mit 33 g L-1 Trockensubstanz wurde gesiebt (2 - 3 mm Maschenweite)und je 0,5 L in Behälter gefüllt, die bei 38,5°C temperiert und geschüttelt wurden. Die Farbstoffzugabe zur Einstellung einer Konzentration von 2,6 mM L-1 hydrolysiertem Reactive Black 5 erfolgte gleichzeitig. Gemessen wurden pH-Wert, Redoxpotential, Leitfähigkeit sowie eine HPLC-Analyse der zuvor zentrifugierten Behälterflüssigkeit.

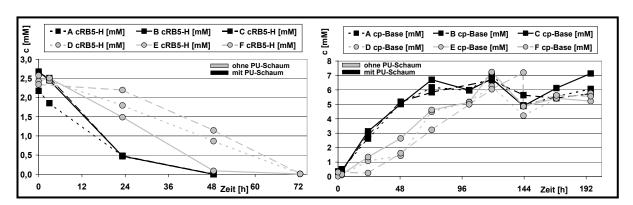


Abbildung 48: Zeitlicher Verlauf des anaeroben Abbaus von Reactive Black 5 und der Bildung von p-Base aus hydrolysiertem Reactive Black 5

Der Abbau von Reactive Black 5 wurde mittels HPLC-DAD (La-Chrom-System, offline) dokumentiert. In Abbildung 48 ist zu erkennen, dass bei den Versuchsreihen mit PU-Schaum-würfeln ein deutlich schnellere Reduktion des Farbstoffes zu verzeichnen war als bei den Versuchsreihen ohne PU-Schaum Zugabe. Die schnellere Bildung von p-Base durch Reduktion des Farbstoffes bestätigt diese Beobachtung. Die kinetische Auswertung des Abbaus von Reactive Black 5 nach formal 1. Ordnung in Bezug auf die Farbstoffkonzen-

tration zeigte, dass der Abbau bei Zugabe von PU-Schaum nahezu doppelt so schnell verläuft wie im Vergleichsversuch ohne PU-Schaum.

Zurückzuführen ist diese Beobachtung auf das schnellere Absinkung des Redoxpotentials nach der Zugabe des Farbstoffes in den Schlammbehältern mit PU-Schaum (siehe Abbildung 49). Bei beiden Versuchsreihen wurde nach 2,5 bis spätestens 9 Tagen ein einheitliches Redoxpotential von etwa –460 mV erreicht.

Bei der ungeimpften Kontrollmessung zeigte sich ein schwankender Verlauf des Redoxpotentials. Vermutlich ist hier der Einfluss von Luftkontakt größer als bei den mit Farbstoff beimpften Proben. Der schnellere Abbau bei den Versuchen mit PU-Schaumwürfeln und das gleichzeitige schnellere Absinken des Redoxpotential lassen den Schluss zu, dass die Entfärbung bzw. Reduktion des Farbstoffes, bei dem die Azoverbindungen zu Aminogruppen reduziert werden, in einem engen Zusammenhang stehen.

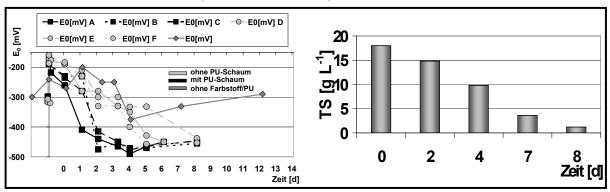


Abbildung 49: Links - Verlauf des Redoxpotentials beim Batch-Versuch mit und ohne Zugabe von aktivkohlebeschichtetem PU-Schaum; Rechts - Immobilisierung anaeroben Faulschlammes auf PU-Trägern (3 g L<sup>-1</sup>)

#### Schlammimmobilisierung

Die anaeroben und aeroben Schlämme wurden in den Bioreaktoren jeweils auf 3 L Polyurethan-Schaumstoffwürfeln des Typs Variopur mit Aktivkohlebeschichtung (das entspricht 100 g PU-Schaumwürfel) immobilisiert , die Dr. Pascik zur Verfügung stellte [233]. Vor der Befüllung des Bioreaktoren wurden die Schlämme mit einem Sieb (Maschenweite 1-2 mm) von groben Feststoffen wie Holz, Steine, etc. abgetrennt. Versuche mit nicht gesiebten Schlamm führten zur Verstopfung der Membrantestzellen und einer deutlichen Herabsetzung der Lebensdauer der eingesetzten Ultrafiltrationsmembranen. Die Schlammbeladung des anaeroben Bioreaktors betrug 33  $g_{\rm BTM}$  L-1 Trockensubstanz mit einem Glühverlust von 50 % [234]-[235]. Der Verlauf der Trockensubstanz bis zur nahezu vollständigen Immobilisierung ist in Abbildung 49 dargestellt. Der Faulschlamm wurde nicht näher mikrobiologisch spezifiziert.

Bei aeroben Schlamm wurde die Immobilisierung in gleicher Weise durchgeführt. Die zu Beginn des Versuche eingesetzte Schlammkonzentration betrug 4,8  $g_{BTM}$  L<sup>-1</sup> bei einem Glühverlust von 50 %.

#### 5.5.4 Aerobes Verfahren mit nicht immobilisierten Mikroorganismen

Das Verfahren mit den nicht auf Trägermaterialien immobilsierten Mikroorganismen wurde in einem nach Projekten von Dr. Impre Pascik aufgebauten 31 L - Bioreaktor durchgeführt. Der Reaktor wird in Abbildung 50 dargestellt.

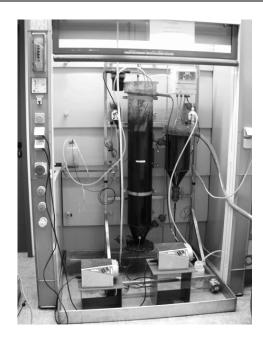


Abbildung 50: Aerober Bioreaktor zum Abwasserbehandlung mit nicht immobilsierten Mikroorganismen

Der Bioreaktor (B4) wird mit einem 11 L - Absatzbecken (B5) ausgestattet, das zur Zellrückführung durch Sedimentation dient. Der aus dem Bioreaktor im Absatzbecken gesammelte Schlamm wird mit einer Schlauchpumpe (P5) zurück in den Reaktor geleitet. Der pH-Wert wird im Bypass in einer mittels einer Schlauchpumpe (P4) gespeisten Durchflusszelle gemessen und über eine Messstelle (B101) durch die Zugabe von 0,02M- $_2$ SO<sub>4</sub>-Lösung und 0,02M-NaOH-Lösung mittels Membrandosierpumpen (P1, P2) gesteuert. In die Rücklaufleitung wird Luft zum Reaktor zugeführt. Das R&I-Fließbild des Verfahrens ist in Abbildung 51 dargestellt.

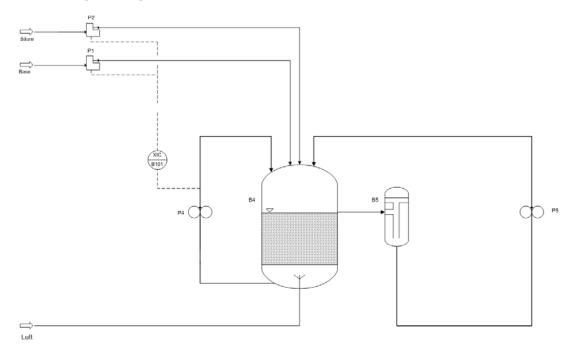


Abbildung 51: R&I-Fließbild des Verfahrens zur aeroben Behandlung des Abwassers mit nicht immobilisierten Mikroorganismen

## 6 Online-Monitoring des biologischen Entfärbungsverfahrens

Das Hydrolysat des Farbstoffes Reactive Black 5 ist der Hauptinhaltsstoff der untersuchten synthetischen und realen Abwasserkonzentrate. Neben diesem konnten verschiedene Nebenkomponenten im Abwasser nachgewiesen werden. Wie bereits unter 5.2 dargestellt, setzt sich die kommerzielle Handelsware mit der Bezeichnung Reaktive Black 5 aus verschiedenen Farbstoffen zusammen. Bei den Versuchsreihen zur Entfärbung von Abwasserkonzentraten wurden beim Monitoring im anaeroben und aeroben Bioreaktor Verbindungen nachgewiesen, die nicht mit dem eigentlichen Abbau durch Reduktion oder Oxidation zugeordnet werden konnten. Nach der Identifizierung durch Strukturanalyse mit Massenspektrometrie ergab eine Überprüfung, dass sich diese Verbindungen bereits im unbehandelten Abwasser nachweisen ließen. Im Folgenden wird neben den Haupt- und Nebenverbindungen auch die Herkunft dieser Verbindungen untersucht, die als Nebenprodukte bei der Farbstoffsynthese und Vorproduktsynthese entstehen.

### 6.1 Untersuchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Black 5

# 6.1.1 Massenspektrometrische Identifizierung von Inhaltsstoffen in Abwasser und Bioreaktoren

Die bei dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Referenzsubstanzen (Farbstoffe und Farbstoffnebenprodukte) sind in Tabelle 15 aufgeführt und "\*" gekennzeichnet. Zur Identifizierung unbekannter Farbstoffnebenverbindungen wurden 20µL Probe des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Black 5 (Hydrolysebedingungen siehe Kapitel 5.3, Seite 41) mit der AQ-Säule und der Monitoring-Methode im Erweiterten Full Scan (EMS) im negativen Ionenmodus gemessen. Vorversuche mit Elektrospray- und Atmospheric Pressure Chemical Ionisation-Interface (ESI und APCI) sowohl im positiven und negativen Ionenmodus zeigten, dass die sulfonierten Verbindungen im negativen Ionenmodus mit Elektrospray-Interface am besten ionisierbar und nachweisbar waren. Nicht sulfonierte Verbindungen wie die p-Base konnten sowohl mit negativer als auch positiver Ionisierung detektiert werden. Aus dem Vergleich von Dioden-Array- und MS-Full-Scan-Spektren wurden Molekülpeaks isoliert, wie das in Abbildung 52 (links) dargestellte Full Scan Massenspektrum des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black 5 zeigt.

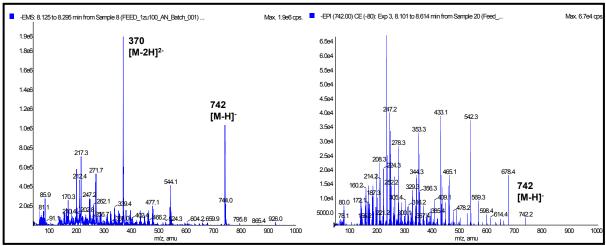


Abbildung 52: Links: Full Scan (EMS) Totalionenmassenspektrum des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black 5, rechts: Produktionenmassenspektrum (EPI) des einfach geladenen Molekülions m/z 742 nach kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) bei -50 V

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Unter den beschriebenen Messbedingungen wurden von den meisten untersuchten Verbindungen ausschließlich [M-H]<sup>-</sup>-lonen detektiert. Die sulfonierten Verbindungen lagen demnach in der Säureform vor. [M-Na]<sup>-</sup>-lonen als auch Addukte wie [M-2H+Na]<sup>-</sup> hatten keinen oder einen zu vernachlässigenden Anteil am Massenspektrum. Bei den mehrfach sulfonierten Verbindungen wie dem disulfonierten Hydrolysat von Reactive Black 5, wurden ein- bis zweifach geladene Molekül-lonen detektiert (Bsp. [M-2H]<sup>2-</sup> von RB5-H mit *m/z* 370, Abbildung 52). Für die Erstellung einer Methode im MRM-Modus mussten die intensivsten Molekülionen einer Verbindung bestimmt werden. Dabei wurden auch mehrfach geladenen lonen mit berücksichtigt.

Die rechte Darstellung in Abbildung 52 zeigt das Produktionenspektrum des einfach geladenen hydrolysierten Farbstoffions, d.h. die durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) des Molekülions entstandenen Fragmentionen. Mit Hilfe der Analyst-Software des LCMS-Geräteherstellers Applied Biosystems wurden die Bedingungen zur Detektion der intensivsten Molekülionen und ihrer Produktionen durch Direktinjektion ins ESI-MS/MS untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden in die Monitoring-Methode implementiert (vollständige Methode siehe Anhang).

Ein Teil der Hauptverbindungen und Farbstoffnebenverbindungen aus Tabelle 40 konnten aus den einfach geladenen Molekülpeaks [M-H] anhand des Molekulargewichts und der Massendifferenz zum originalen Farbstoff abgeleitet werden. Die nicht eindeutig über diese Methode zu bestimmenden Verbindungen wurden durch massenspektrometrische Experimente über kollisionsinduzierter Fragmentierung charakterisiert und strukturell interpretiert. Sie werden in den folgenden Kapiteln 6.1.1.1 - 6.1.3.4 anhand der Interpretation ihrer Fragmen-tierungsmuster gegliedert nach Herkunft diskutiert. Die Produktionen-Spektren der Molekül-anionen von Verbindungen, die über keine der Methoden zu identifizierenden waren, sind im Anhang dargestellt. Für die Interpretation der Fragmentierungsspektren zur Strukturanalyse wurden ausschließlich einfach geladene Molekülionen im Produktionen-Modus gemessen.

Die Suche nach Vergleichsspektren zur Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen, wie sie in der Elektronenstoßionisierung (EI) bei der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) üblich ist, kann bei den mit Elektrospray-Ionisierung gemessenen Verbindungen nicht eingesetzt werden. Einerseits stehen für die im negativen Ionenmodus gemessenen sulfonierten Verbindungen keine Spektrendatenbanken zur Verfügung und andererseits wurden die bislang veröffentlichten Spektren nicht unter standardisierten Bedingungen gemessen. Die Übertragbarkeit von Messbedingungen der unterschiedlicher Elektrospray-Ionenquellen, Ionisierungsparametern, Massenspektrometern und Rahmenbedingungen wie Eluentenzusammensetzung, Eluentenfluss und Zusammensetzung ist zur Zeit nicht gegeben, so dass der Aufbau von Datenbanken im Vergleich zur El-MS problematisch ist. Erschwerend kommt hinzu, dass die Fragmentierungsregeln zur Interpretation der Massenspektren negativer Ionen beim weitem nicht so gut untersucht sind wie die Fragmentierungsmechanismen und Umlagerungen bei der positiv ionisierenden Elektronenstoßionisation [250]-[252].

Zur Interpretation der Fragmentierungsmuster der negativ geladenen unbekannten Molekülionen wurden aus der Fragmentierung bekannter Verbindungen und aus Literaturquellen Regeln abgeleitet, die eine Interpretation unbekannter Verbindungen der untersuchten Stoffklasse ermöglichen. Die vier grundlegenden Fragmentierungsformen bei negativ geladenen Molekülionen mit gerader Elektronenzahl (even-electron) sind [250]-[252]:

- Einfache homolytische Spaltung, bei der unter Abspaltung eines Radikals ein stabiles Radikalanion gebildet wird. Die Spaltung erfolgt in α-Stellung zum ladungstragenden Atom oder zu einem mit dem ladungstragenden Atom konjugierten Atom.
- Reaktionen, ausgelöst durch vorhergehende Bildung von Anion-Komplexen unter anschließender Anionverschiebung, bei der das Anion

oder Neutralteilchen abge-spaltet werden können (Deprotonierung, Eliminierungsprozesse, etc. )

- Reaktion, die nicht am zuerst gebildeten Anion, sondern durch Protonentransfer unter Bildung eines neuen Anions an anderer Stelle stattfinden und in Folge den oben genannten Reaktionen unterliegen können.
- Umlagerungsreaktionen, bei denen interne nukleophile Substitutionsreaktionen und Eliminierungen sowie Umordnungen des Grundgerüstes auftreten können.

Die am häufigsten beobachtete Fragmentierung bei sulfonierten Verbindungen sind die Abspaltung von  $SO_2$  (64 u) und  $SO_3$  (80 u) als Neutralteilchen vom ionisierten Vorläuferion. Unter bestimmten Bedingungen lassen sich geladene Radikalionen wie  $SO_3^{\bullet-}$  (m/z 81) nachweisen [239], [250]. Diese Fragmentierungen decken sich mit den Beobachtungen von Richardson et al., bei der acht mono- und disulfonierte Azofarbstoffe (Acid und Direct Dyes) mit LC-MS/MS untersuchte [243]. Das typische Fragmentierungsverhalten von Azoverbindungen wird in vier verschiedene Mechanismen unterteilt, deren Vorkommen von der chemischen Umgebung der Azobindung abhängt und bei positiver sowie negativer Ionisierung beobachtet wird.

- α-Diazoketone wie das diazotierte ortho-Aminophenol spalten unter massenspektrometrischen Bedingungen mit Elektronenstossionisierung N<sub>2</sub> (28 u) ab. Es folgt eine Wolff-Umlagerung zu einem Keten, das in ein Carben und unter erneuter Abspaltung von 28 u (CO) zerfällt [244]-[245].
- Azo-Typ-Spaltung: Spaltung -C-N-Bindung, bei der Elektronenstossionisation bevorzugt auf der Kupplungsseite des Azofarbstoffes auftritt. wobei die positive Ladung Kupplungskomponente verbleibt [246]-[247]. Bei negativer Ionisierung mit Sekundär-Elektron-Ionisierung spaltet die C-N-Bindung bevorzugt auf der Seite, die eine Sulfonsäuregruppe trägt [248]. Bei vielen Azo-Typ-Spaltungen wird ein Transfer von einem Wasserstoffion abgespaltenen Neutralteilchen als auch zum Fragmention beobachtet [239], [248]-[250]. Der Transfer von zwei Wasserstoffionen zum negativen Fragmention wurde bei Fast Atom Bombardement Massen-spektrometrie (FAB-MS) als auch bei Atmosphärendruck chemischer Ionisation (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation - APCI) beschrieben [250]-[254].
- Keto-Typ-Spaltung: Spaltung der -N=N-Bindung bei Azofarbstoffen, die in ortho- oder para-Stellung eine Hydroxygruppe besitzen und in wässriger Lösung einer Tautomerisierung zum Ketohydrazon unterliegen. Die Spaltung der Keto-Tautomere findet an -N=N- bzw. =N-NH- statt [241], [248]-[249]. Sie ist bei den meisten untersuchten Azofarbstoffen von Wasserstoff-Übertragungsreaktionen begleitet, die auf die gebildeten Neutralteilchen als auch die Ionen übertragen werden.
- N<sub>2</sub>-Abspaltung unter Biphenylbildung: Die Abspaltung von 28 u wurde bei vier Azofarbstoffen (Acid Black 1, Direct Yellow 28, Acid Blue 113 und Direct Violet 9) beschrieben [243]. Bei Acid Black 1 konnte die Abspaltung von 28 (m/z 529 zu 501) verlässlich als CO identifiziert werden. Es wird angenommen, dass es sich bei den anderen Farbstoffen um eine N<sub>2</sub>-Abspaltung unter Ausbildung einer –C-C-Bindung zwischen den Aromaten handelt, da nur bei Diazofarbstoffen eine zweifache N<sub>2</sub>-Abspaltung beobachtet wurde. Ein mögliches Abspalten von C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (28 u) wurde bislang bei Azofarbstoffen nicht beschrieben und ist daher unwahrscheinlich. FAB-

MS von sulfonierten Azofarbstoffen bestätigten die Abspaltung von 28 u als  $N_2$  unter Ausbildung einer –C-C-Bindung der Kupplungs- und Diazoniumkomponente [255]. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass sich aus Azobenzen unter Abspaltung von  $N_2$  Biphenyl bildet [247]. Messungen mit hochauflösender Massenspektrometrie zur Absicherung des Abspaltens von  $N_2$  stehen noch aus.

Die Anwendung der aufgeführten Mechanismen ist für den Fragmentierungsmechanismus des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Black 5 bei negativer Ionisierung in Abbildung 53 dargestellt und bezieht sich auf die intensivsten Ionen des Produktionenspektrum rechts in Abbildung 52. Der Farbstoff besitzt eine ortho-ständige Hydroxygruppe zu einer Azobindung, wodurch er in wässriger Lösung in der tautomeren Form als Ketohydrazon vorliegt [3]. Das Fragmentierungsmuster zeigt die Neutralteilchenabspaltung von SO<sub>2</sub> (m/z 742  $\rightarrow$  678) und  $SO_3$  (m/z 678  $\rightarrow$  598, m/z 434  $\rightarrow$  354). Die Spaltung der zur Hydroxygruppe ortho-ständigen Ketohydrazonbindung ist an der Keto-Typ-Spaltung (m/z 742  $\rightarrow$  542) zu beobachten, die der zur Aminogruppe ortho-ständigen Azobindung an der Azo-Typ-Spaltung (m/z 678  $\rightarrow$  465). Bei unterschiedlichen Kollisionsenergien (alle negativ: 20, 50, 80 V) zeigte das Fragmention der Keto-Typ-Spaltung (m/z 542) immer die größere Intensität als das Fragment der Azo-Typ-Spaltung (m/z 465). Die direkte Azo-Typ-Spaltung am Molekül-lon (m/z 742  $\rightarrow$  529) zeigte eine noch geringere Intensität. Eine nachfolgende Spaltung der zweiten Azobindung konnte nach der Azo-Typ-Spaltung des Farbstoffs beobachtet werden (m/z 542  $\rightarrow$  329). die nach Abspaltung eines Neutralteilchens mit 213 u als Keto-Typ-Spaltung interpretiert wurde. Das potentielle Ion m/z 265 einer weitere Fragmentierung unter Azo-Typ-Spaltung des Ions m/z 465 wurde nicht beobachtet.

Eine für vinylsulfonylbasierten Reaktivfarbstoffe spezifische Abspaltung eines Neutralteilchen stellt die Fragmentierung von m/z 542  $\rightarrow$  -109 u  $\rightarrow$  433 dar, bei der Sulfonylethanol abgespalten und ein Wasserstoffatom vom Fragmention ans Neutralteilchen übertragen wird. Die Interpretation der Fragmentionen, die unterhalb m/z 329 auftraten, wurde aufgrund der Komplexizität der möglichen Fragmentierungs- und Umlagerungsreaktionen nicht weiter vorgenommen.

Abbildung 53: Interpretation des Fragmentierungsmusters von RB5-Hydrolysiert (Produktionenspektrum siehe Abbildung 52 rechts)

Die Diazoniumkomponente des Farbstoffs ist die diazotierte p-Base, welche in der Sulfonsäureesterform die eigentliche Reaktivgruppe trägt (siehe auch Kapitel 3.2, Seite 18). In der hydrolysierten Form zeigt die p-Base ein typisches Fragmentierungsverhalten, dass in Abbildung 54 dargestellt ist. In der linken Abbildung ist das Fragmentierungsmuster des im negativem Modus mit Elektrospray ionisierten Moleküls zu sehen. Bei der homolytischen Spaltung der S-C-Bindung wird das Radikal  $HO-C(H_2)-C(H_2)-O_2S^{\bullet}$  (109 u) abgespalten und das Fragmentradikalanion m/z 91 gebildet. Der weiteren Fragmentierung unter Bildung des intensivsten Fragmentions mit phenolischer Funktion m/z 107 geht die Umlagerung der Sulfonylgruppe voraus ( $R=C_6H_5NH^-$ ):

$$HO-C(H_2)-C(H_2)-S(O_2)-R \rightarrow HO-C(H_2)-C(H_2)-(O)S-O-R.$$

Analog wird die homolytische Abspaltung von \*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (45 u) mit dem Fragmention *m/z* 155 beobachtet. In Folge wird SO (48 u) als Neutralteilchen unter Bildung des phenolischen Radikalanions m/z 107 abgespalten.

Zum Vergleich zeigt die rechte Abbildung 54 die Interpretation des mit Elektronenstoßionisation (70 eV) aufgenommenen Fragmentierungsmusters. Die dominierende Fragmentierung ist hier die Neutralteilchenabspaltung von  $H_2O$  am Ethanolrest des Radikalkations zu m/z 183. Analog findet eine Abspaltung des Ethanolradikals ( $HOCH_2CH_2^{\bullet}$ ) zu m/z 156 statt. Der weiteren Fragmentierung gehen wie beim negativen Molekülion Umlagerungen der Sulfonylgruppe voraus wie ( $R = C_6H_5NH_2$ , weitere siehe Abbildung 54):

$$HO-C(H_2)-C(H_2)-S(O_2)-R^{\bullet+} \longrightarrow HO-C(H_2)-C(H_2)-(O)S-O-R^{\bullet+}$$

In deren Folge kann  $SO_2$  (64 u) als Neutralteilchen abgespalten werden (m/z 119). Unter einer Abspaltung von  $C_3H_3$  und Umlagerung von  $NH_2$  fragmentiert es wahrscheinlich zum Pyridin-Kation mit m/z 80. In einem weiteren Fragmentierungsweg wird nach vorhergehender elektrofuger Umlagerung der Sulfonylgruppe  $HOCH_2CH_2O^{\bullet}$  (61 u) zu m/z 140 abgespalten. Nach Verlust des Sulfonylethanols und der Fragmentierung mit Verlust von HCN (27 u) bildet sich als Endfragment ein Ion mit m/z 65.

Der Vergleich der Fragmentierungswege des Kations (EI-Fragmentierung) und des Anions (ESI-Fragmentierung) zeigt, dass bei der Interpretation der Fragmentierungsmuster negativer Ionen andere Mechanismen und Umlagerungen zu beobachten sind als bei den positiven Ionen. Eine Abspaltung von SO konnte bei der mit Elektronenstoss ionisierten p-Base nicht beobachtet werden.

Abbildung 54: Vergleich der Fragmentierungsmechanismen der p-Base als negativ geladenes Molekülion mit ESI-MS/MS (CID-Spektrum bei CE = -20V, links) und des Fragmentierungsmechanismus des Radikalkations bei Elektronenstossionisation mit 70eV (GC-MS, rechts)

### 6.1.1.1 Reactive Black 5 und Synthesenebenprodukte

In Tabelle 40 sind Haupt- und Nebenverbindungen des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Black 5 aufgelistet. Ein Teil der aufgelisteten Verbindungen ist aus der Literatur bekannt. Strukturvorschläge für die bislang unbekannten Verbindungen, die im Hydrolysat des Farbstoffs Reactive Black 5 nachgewiesen wurden, werden anhand ihrer Fragmentierungsmuster diskutiert und dargestellt. Die identifizierten Strukturen werden den Reaktionsstufen, bei denen sie bei der Synthese oder Hydrolyse entstehen, zugeordnet. Der Nachweis der tautomeren Form des Farbstoffs Reactive Black 5 in wässriger Lösung konnte über spektroskopische Untersuchung mit  $^1$ H-,  $^{13}$ C- und 2D-NMR-Messungen nachgewiesen werden [3]. Die Handelsform des Farbstoffs Reactive Black 5 setzt sich wie folgt zusammen (Abkürzungen siehe Tabelle 40): ca. 65 % RB5-O, 1 – 2 % RB-OH, 1 – 2 % RB-NH<sub>2</sub>, 1 - 2 % weitere Farbstoffnebenprodukte, sowie Entstäubungsmittel (1%) und 30 % Salze (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NaOAc) [3].

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Der Handelsware werden neben Stellmitteln wie Li- statt Na-Salzen zur Verbesserung der Löslichkeit und des Rührverhaltens Naphtalinsulfonate in Form von Kondensationsprodukten mit Formaldehyd zugesetzt (siehe Abbildung 55) [256]. Sie verbessern das Fließverhalten der Handelsware und unterstützen die Endassoziierung des Farbstoffs beim Färbeprozess. Weitere Anwendung finden sie als synthetische Gerbstoffe in der Lederindustrie, wo sie mit den Gerbereiabwässern in biologischen Abwasserbehandlunsgverfahren nur schwer oder gar nicht abgebaut werden [257]. Teilstrukturen dieser Formaldehyd-Naphtalinsulfonate, die im wässrigen als dissozierte Sulfonsäuren vorliegen, konnten im Abwasser als Naphthalinsulfonsäure (NSA) und Naphthalindisulfonsäure (NDSA, mehrere nicht spezifizierte Isomere) nachgewiesen werden.

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Tabelle 40: Nachgewiesene Inhaltsstoffe des Hydrolysats von Reactive Black 5, \*als Referenzsubstanz verfügbare Verbindungen

Verbindung	Abkürzung	RT [min]	Vorläufer -ion	MRM-Transient Q1/Q3 m/z		
Hauptverbindungen aus RB5-O						
Reactive Black 5 Orginal*[3], [259]	RB5-O	-	[M-3H] <sup>3-</sup>	300	$\rightarrow$	96
Reactive Black 5 Teilvinylform [259]	RB5-OV	-	-	-	-	-
Reactive Black 5 Vinylform [259]	RB5-V	10	[M-H] <sup>-</sup>	705	$\rightarrow$	642
Reactive Black 5 Teilorginal- Teilhydrolysat [259]	RB5-HO	-	-	-	-	-
Reactive Black 5 Teilvinyl- Teilhydrolysat	RB5-HV	9,2	[M-H] <sup>-</sup>	723	$\rightarrow$	660
RB5-Hydrolysat*[3], [259]	RB5-H	8,8	[M-2H] <sup>2-</sup>	370	$\rightarrow$	370
Farbstoffnebenverbindungen						
Reactive Black 5 mit p-Base Ether	RB5-H+DPBE	8,9	[M-H] <sup>-</sup>	925	$\rightarrow$	861
Dimer RB5-Hydrolysat	Di-RB5-H	9,9	[M-H] <sup>-</sup>	1467 733	$\begin{array}{c} \rightarrow \\ \rightarrow \end{array}$	927 236
H-Säure sauer mit diazotierter p- Base gekuppelt *[3]	RB-NH <sub>2</sub>	9,2	[M-H] <sup>-</sup>	530	$\rightarrow$	316
H-Säure basisch mit diazotierter	DD OU	0.5	FN 4 1 13-	004		70
p-Base gekuppelt *[3]	RB-OH	8,5	[M-H] <sup>-</sup>	264	$\rightarrow$	79
Reactive Black 5 mit	RB5-H+SO <sub>2</sub>	9,4	[M-H] <sup>-</sup>	806	$\rightarrow$	236
Ethylsulfonsäuregruppe	_	•				
Synthesenebenprodukte N-acteyl-p-Base*	NAPB	4,0	[M-H] <sup>-</sup>	241		132
Sulfanilsäure	SS	<del>4</del> ,0 5,2	[M-H] <sup>-</sup>	171	$\rightarrow$ $\rightarrow$	79
2-{4-[4-(2-Hydroxy-ethansulfonyl)-		-,			ŕ	-
phenylamino]-benzensulfonyl}- ethanol	DPBA	5,5	[M-H] <sup>-</sup>	384	$\rightarrow$	275
p-Base Sulfonester	PBSA	6,1	[M-H] <sup>-</sup>	280	$\rightarrow$	171
2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)- ethoxy]-ethansulfonsäure	ABSEESA	6,4	[M-H] <sup>-</sup>	307	$\rightarrow$	124
2-(4-Amino-benzensulfonyl)- ethansulfonsäure	ABSESA	6,6	[M-H] <sup>-</sup>	264	$\rightarrow$	81
Unbekannte Verbindungen						
UNK343	UNK343	8,8	[M-H] <sup>-</sup>	343	$\rightarrow$	263
Verbindungen aus der Farbstoffformulierung						
Naphthalinsulfonsäure	NSA	7,1	[M-H] <sup>-</sup>	207	$\rightarrow$	143
Naphthalindisulfonsäure	NSDA	7,6	[M-H] <sup>-</sup>	287	$\rightarrow$	143

Abbildung 55: Stellmittel auf Basis von Formaldehyd-Naphthalensulfonaten

Bei der Farbstoffsynthese, d.h. der Diazotierung und Kupplungsreaktion, fallen durch Nebenreaktionen in geringen Mengen Nebenprodukte an, die sich auch später in der Handelsware nachweisen lassen. Gemäß der eingangs angegebenen Zusammensetzung der Handelsware sind dieses gezielt zugesetzte Reaktionsprodukte der H-Säure, die einmal unter sauren Bedingungen (RB-NH<sub>2</sub>) und einmal unter neutralen bis leicht basischen Bedingungen (RB-OH, siehe 2. Schritt in Abbildung 56). Der andere Teil der Reaktionsprodukte setzt sich aus Nebenprodukten der einzelnen Syntheseschritte zusammen, die in Abbildung 56 dargestellt sind.

Abbildung 56: Farbstoffsynthese Reactive Black 5s

Bereits bei der Diazotierung der p-Base im ersten Schritt kann es zur Bildung von Nebenprodukten kommen. Eine ist die Triazenbildung, bei der die primären oder sekundären Stickstoffatome aromatischer Amine mit Diazoniumionen unter Bildung von Triazenen reagieren. Die Triazenbildung ist schneller als die parallel ablaufende Diazotierung der Aromaten unter Bildung der Azoverbindung [258]. Unter sauren Bedingungen ist die Triazenbildung reversibel, die Azokupplung nicht. Je nach Reaktionsbedingungen reichert sich so langsam die Azobindung an. Das Triazen der p-Base lag als Referenzsubstanz vor und konnte im Abwasser bzw. Hydrolysat nicht nachgewiesen werden. Die linke Darstellung in Abbildung 57 zeigt das Produktionenspektrum dieser Verbindung. Bei der Fragmentierung findet wahrscheinlich nach einer vorhergehenden Umlagerungsreaktion die Abspaltung von Stickstoff  $N_2$  statt, bei der sich ein Diphenylamin bildet. Nachfolgend konnte auch bei höheren Kollisionsenergien (-35 und –50 V) keine weitere Fragmentierung beobachtet werden.

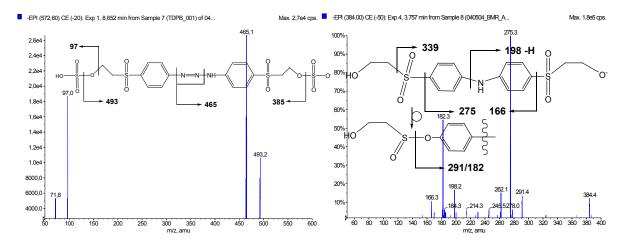


Abbildung 57: Produktionenspektrum und Fragmentierungsmuster von: Links - Molekülanion der Triazin-p-Base bei einer Kollisionsenergie von –20 V; Rechts - 2-{4-[4-(2-Hydroxyethansulfonyl)-phenylamino]-benzensulfonyl}-ethanols (DPBA)

Eine Verbindung, die sich formal aus der Struktur der Triazin-p-Base nach Abspaltung von Stickstoff ableitet, ist das Di-p-Base-Amin (2-{4-[4-(2-Hydroxy-ethansulfonyl)-phenylamino]-benzensulfonyl}-ethanol – DPBA, siehe Abbildung 57, rechts). Es konnte im Hydrolysat nachgewiesen werden. Nach der chromatographischen Trennung wurde es vom Kationentauscher nicht suppressiert, was darauf schließen lässt, dass es keine primäre Aminogruppe besitzt bzw. nicht in der kationischen Form vorliegt. Die kurze Retentionszeit und die nicht nachgewiesene Abspaltungen von  $SO_3$  oder  $SO_2$  legen nahe, dass die Verbindung nicht sulfoniert ist. Wie bei der p-Base wird eine Abspaltung von 109 u beobachtet (m/z 384  $\rightarrow$  m/z 275), die typisch für die Sulfonylethanolgruppe ist. Die zweifache Abspaltung von 93 Da (nach vorhergehender Umlagerung) und 109 Da deutet auf eine Symmetrie des Moleküls hin. Nach der Stickstoffregel sollte eine ungerade Anzahl an N-Atomen vorliegen, was für die vorliegende Strukturannahme spricht.

Eine weitere in der Farbstofflösung nachgewiesene Nebenverbindungen aus der Synthese ist eine Nebenverbindung von Reactive Black 5, bei welcher der Ethanolrest gegen eine Ethansulfonsäuregruppe ausgetauscht ist (siehe Abbildung 58, links) und die als RB5-H+SO<sub>2</sub> bezeichnet wird. Aus der Abspaltung des  $SO_2$  vom Molekülion m/z 806 entsteht das Fragmentanion m/z 742, das dem Molekülanion des hydrolysierten Farbstoffes in Abbildung 53 entspricht. Weitere intensive Fragmentionen wie m/z 542, 465, 278 und 236 konnten in den Massenspektren der Produktionenscans beider Verbindungen nachgewiesen werden.

Die in Abbildung 58 (rechts) dargestellte Azoverbindung RB5-H+SO<sub>2</sub> zeigt, dass neben der p-Base auch Nebenprodukte bei der Diazotierungs- und Kupplungsreaktion miteinander reagieren. Die Verbindung 2-(4-Amino-benzenesulfonyl)-ethansulfonsäure (ABSESA), die zur Synthese von RB5-H+SO<sub>2</sub> im ersten Schritt der Farbstoffsynthese diazotiert und mit H-Säure gekuppelt wurde, muss bereits als Nebenverbindung in dieser Reaktionsstufe vorgelegen haben. Die Herkunft dieser Verbindung wird auf eine Nebenreaktion einer der Synthesestufen der p-Base aus N-Phenylacetamid zurückgeführt, bei der sie als Nebenprodukt anfällt.

## Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

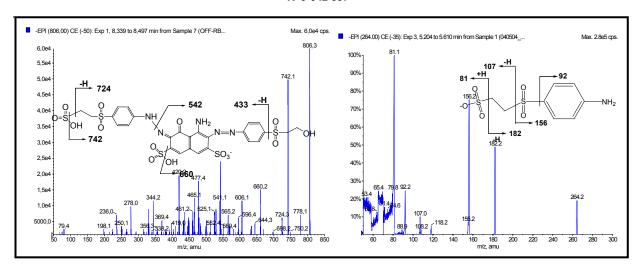


Abbildung 58: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Rechts - RB5-H+SO $_2$ ; Links - 2-(4-Amino-benzenesulfonyl)-ethansulfonsäure (ABSESA)

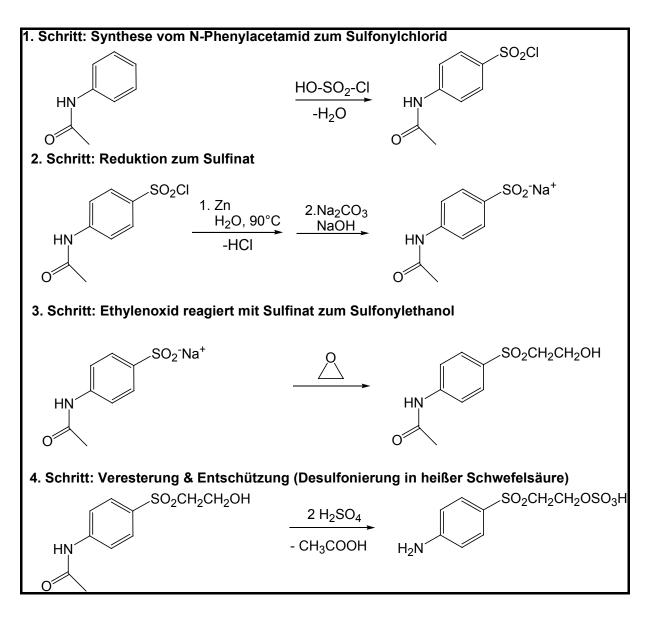


Abbildung 59: Synthese von Acetamidbenzen zum Sulfonsäureester der p-Base

Das Syntheseschema für p-Base ist in Abbildung 59 dargestellt. Im ersten Schritt reagiert N-Phenylacetamid mit Chlorsulfonsäure zu 4-Acetylaminobenzolsulfonylchlorid. In Schritt zwei erfolgt in Gegenwart von Zn die Reduktion des Sulfonylchlorids unter Abspaltung von HCl zur Sulfinsäure. Die Sulfinsäure wird mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> im Basischen ins Na-Sulfinat überführt. Mit Ethylenoxid reagiert das Sulfinat als S-Nucleophil zum Sulfonylethanol (N-Acetyl-p-Base). Im Anschluss wird die N-Acetyl-p-Base in konzentrierter Schwefelsäure verestert und entschützt. Die Desulfonierung des aromatischen Rings geschieht durch Nachbehandlung in heißer Schwefelsäure. Es wäre denkbar, dass die Bildung von ABSESA auf eine Nebenreaktion im dritten Syntheseschritt zurückgeht, bei dem statt des Ethanolrests ein Ethanrest an der Sulfonylgruppe vorliegt, der bei der Veresterung mit Schwefelsäure im vierten Schritt sulfoniert wird.

Die in RB5-H+SO $_2$  nachgewiesene Diazoniumkomponente 2-(4-Amino-benzenesulfonyl)-ethansulfonsäure (ABSESA) konnte auch als Einzelsubstanz im unbehandelten Abwasser nachgewiesen werden. Das Molekülion dieser Verbindung mit m/z 264 spaltet H $_2$ SO $_4$  als Neutralteilchen (82 u) und als Anion HSO $_4$  $^-$  (81 u) ab (siehe Abbildung 58 rechts). Bei der Neutralteilchenabspaltung entsteht das Vinyl-p-Base-lon mit m/z 182. Die weitere Fragmentierung erfolgt analog zur p-Base. Mit der Sulfonsäuregruppe als wahrscheinlicher Trägerin der Ladung des Molekülions könnte bei der Abspaltung von Aminobenzenesulfonyl mit m/z 107 ein Fragmention als Ethensulfonsäure-lon gebildet werden. Ein Fragmention mit m/z 107 entsteht auch bei der Fragmentierung der p-Base nach Umlagerung der Sulfonylgruppe. Das Ethensulfonsäure-lon ist damit nicht eindeutig nachgewiesen.

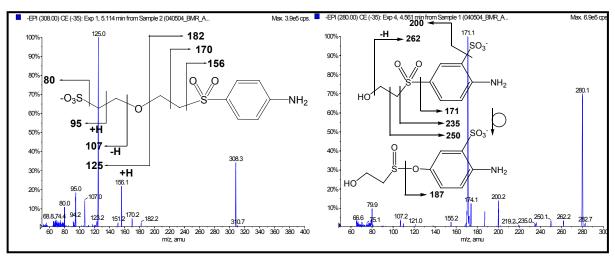


Abbildung 60: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Links - 2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethoxy]-ethansulfonsäure (ABSEESA); Rechts - Amino-(2-hydroxy-ethansulfonyl)-benzenesulfonsäure (PBSA)

Abbildung 60 (links) zeigt ein weiteres in der Farbstofflösung nachgewiesenes Derivat der p-Base, das als 2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethoxy]-ethansulfonsäure (ABSEESA) identifiziert wurde. Aus dem Molekülion m/z 308 könnte formal p-Base mit einer zweiten Sulfonylethanolgruppe abgeleitet werden. Die Fragmentierung sollte dann analog zu der Fragmentierung der p-Base verlaufen, wodurch zwischen m/z 308 und dem nächst größeren Fragmention m/z 182 weitere Fragmentionen nachweisbar sein müssten. Diese Annahme wird durch die beobachtete Fragmentierung nicht gestützt. Als intensivstes Ion zeigt das Fragmentierungsmuster m/z 125, bei dem es sich um das Anion der 2-Hydroxyethansulfonsäure handeln könnte. Aus den weniger intensiven Ionen (m/z 182, 170, 156) lassen sich für die Fragmentation der p-Base typische Ionen ableiten (Vgl. Abbildung 54). Die negative Ladung ist bevorzugt an den intensiven Fragmentionen m/z 125, 107 und 95 lokalisiert, wodurch das Vorhandensein einer  $SO_3H$ -Gruppe nahe liegt. Ein Bestätigung dafür liefert der Nachweis des  $SO_3^{\bullet-1}$ Ions mit m/z 80. Die Entstehung dieses Nebenproduktes könnte auf die dritte Synthesestufe zurückzuführen sein, bei der das Sulfinat mit Ethylenoxid zu N-Acetyl-p-Base reagiert. Unter Wasserabspaltung könnte sich bei höheren

Temperaturen die Vinylkomponente ausbilden, die in einer weiteren Reaktion mit dem Ethylenoxid das 4-(2-Ethoxy-ethansulfonyl)-phenylamin bildet. In der Veresterungsstufe wird das endständige Kohlenstoffatom der Ethangruppe sulfoniert.

Bei der Veresterung und Entschützung der N-Acteyl-p-Base im vierten Schritt tritt als Nebenreaktion zur Sulfonsäuresterbildung eine Mono- bis Disulfonierung des Benzenrings der p-Base auf. Diese wird bei Erhitzen in wässriger Schwefelsäure wieder umgekehrt [255]. Der Nachweis von Amino-(2-hydroxy-ethansulfonyl)-benzenesulfonsäure zeigt, dass die Desulfonierung nicht vollständig erfolgte. Aus dem in Abbildung 60 (rechts) gezeigten Fragmentierungsmuster lässt sich als Grundstruktur p-Base ableiten: m/z 280  $\rightarrow$  -SO<sub>3</sub>  $\rightarrow$  m/z 200. Aus dem Molekülion ist nicht ersichtlich, ob die SO<sub>3</sub>-Gruppe als Ester am Ethanolrest sitzt oder direkt am Benzen substituiert ist. Durch die Bildung des Fragmentions m/z 171 (bei p-Base m/z 170), ist davon auszugehen, dass sich die SO<sub>3</sub>-Gruppe direkt am Benzen befindet. Die beobachtete Wasserabspaltung von m/z 280  $\rightarrow$  m/z 264 wäre bei der Sulfonsäureesterform nicht möglich.

#### 6.1.1.2 Haupt- und Nebenverbindungen aus der Hydrolyse

Wie in Kapitel 3.2 (Seite 18, Gleichung 2 und 3) beschrieben, entsteht beim Reaktivfärbeprozess das Hydrolysat des eingesetzten Reaktivfarbstoffes. Der Nachweis eines Teiles, der bei der Hydrolysereaktion entstehenden Intermediate, wurde erstmalig von Chromá-Keull et al. mittels MALDI-TOFMS aufgezeigt [259]. Die dabei identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 40 mit der Quellenangabe gekennzeichnet. Bei der Untersuchung des Hydrolysates konnten mit der MS-Monitoring-Methode weitere Zwischenprodukte der Hydrolyse von Reactive Black 5 nachgewiesen werden. In Abbildung 61 ist der Verlauf der Hydrolyse dieses Farbstoffs dargestellt, wie sie von Zollinger allgemein beschrieben wurde [4]. Im ersten Schritt unterliegt der Farbstoff in der Sulfonsäureesterform (RB5-O) der basenkatalysierten Eliminierung der Sulfonsäuregruppe, nach deren Abspaltung die reaktive Vinylform entsteht (RB5-V). Durch die zwei vorhandenen Reaktivgruppen ergeben sich zwei Intermediate (RB5-OV), bei denen eine Reaktivgruppe in der Sulfonsäuresterform und eine andere bereits in der Vinylform vorliegt. Parallel läuft die basenkatalysierte Hydroylse der Vinylform ab, in deren Folge der hydrolysierte Reactive Black 5 Farbstoff entsteht (RB5-H). Die jeweiligen Intermediate verfügen über eine Sulfonsäuresterform und eine Hydrolyseform (RB5-HO) oder eine Vinylform und eine Hydrolyseform (RB5-HV).

Die mit der Monitoring-Methode nachweisbaren Verbindungen aus den zweistufigen Hydrolyse sind in Tabelle 40 (Seite 110) aufgeführt. In den unter Färbebedingungen hergestellten Modellabwässern konnte neben dem finalen Hydrolysat RB5-H die Zwischenverbindung RB5-HV in quantitativen Mengen nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 5.3, Seite 41), die einen Farbigkeitsanteil von 12,1% im Modellabwasser besaß. Ein Anteil von 10% hatte das Dimer des hydrolysierten Farbstoffes (Etherbindunger über p-Base wie beim Di-p-Base-Ether), das als zweifach geladenes Ion mit m/z 733 detektiert wurde. Im Hydrolysat konnte der Farbstoff in der Sulfonsäureesterform als RB5-O nicht mehr nachgewiesen werden.

Bereits in den 60iger Jahren beschrieben Rys und Stamm eine bei der Färbung mit vinylsulfonbasierten Reaktivfarbstoffen auftretende Nebenreaktion, bei der es zu einer reversiblen Etherbildung zwischen der Vinyl- und der Hydrolysatform kommt, die als p-Base-Ether bezeichnet wird (siehe 3. Schritt in Abbildung 61) [28]. Hinweise auf ein Vorliegen dieser Ether gab der Nachweis von Verbindungen im Hydrolysat des Reaktivfarbstoffs, deren Molekulargewicht deutlich über dem des hydrolysierten Farbstoffes lagen und die ein nahezu identisches Spektrum im UVVIS-Chromatogramm zeigten.

Zwei dieser Verbindungen sind in Tabelle 40 neben den Zwischenstufen der Hydrolyse aufgeführt. Es sind RB5-H +DPBE und das Dimer des hydrolysierten Farbstoffes, Di-RB5-H. In Abbildung 62 sind die Massenspektren und die Strukturen von RB5-H +DPBE und Di-

RB5-H dargestellt. Der Fragmentierungsmechanismus zeigt unter Abspalten der Vinyl-p-Base die Auflösung des Ethers, bei dem wieder RB5-H entsteht. Aufgrund des weiteren Fragmentierungsmusters kann angenommen werden, dass der Di-p-Base-Ester an der unter sauren Bedingungen gekuppelten Azobindung angebunden ist. Eine interne Etherbildung des Farbstoffmoleküls konnte nicht nachgewiesen werden.

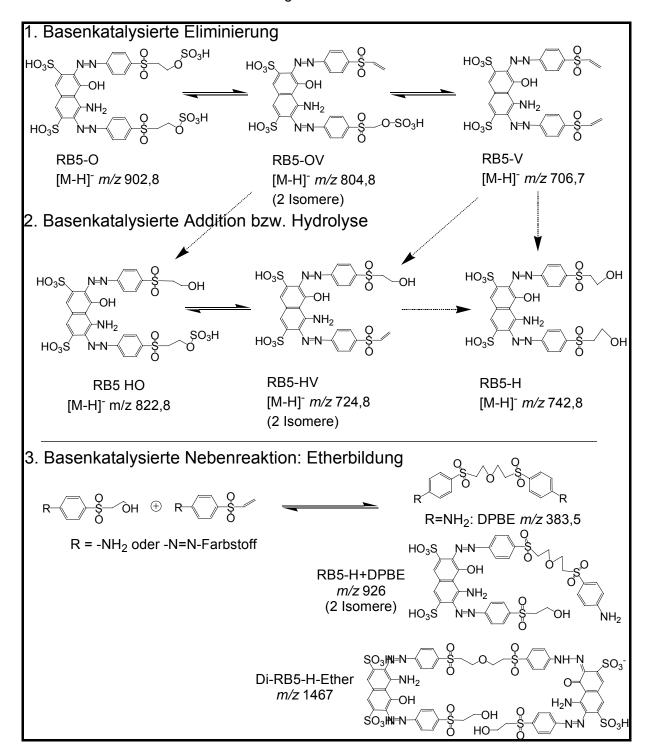


Abbildung 61: Hydrolyse des Farbstoffs Reactive Black 5 unter basischen Bedingungen im Färbebad

Das über eine Etherbindung verbundene Dimer des hydrolysierten Reactive Black 5 zeigt die Abbildung 62 (rechts). Aufgrund der geringen Intensität des [M-H]-lons war eine eindeutige

Bestimmung über die Fragmentierungsmechanismen nicht möglich. Ein mögliches Fragmention könnte bei der Spaltung der tautomerisierten Azobindung unter Abspaltung von 925 u (entspricht formal dem RB5-H+DPBE, siehe Abbildung 62 links) mit m/z 542 entstanden sein.

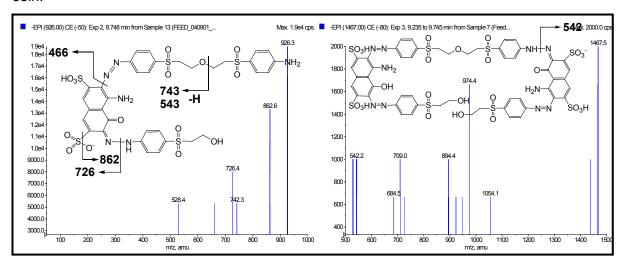


Abbildung 62: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Links - RB5-H+DPBE; Rechts - Di-RB5-H

#### 6.1.1.3 Anaerobe Abbauprodukte und Intermediate von Reactive Black 5

Die Reaktionsprodukte des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black 5 im anaeroben Bioreaktoren wurden wie beim Abwasser mit der Prontosil AQ-Säule  $(3\mu)$  und der Monitoring-Methode gemessen. Die Probenahme erfolgte online mit dem in Abbildung 8 (Seite 44) dargestellten Verfahren. Um auch die kationischen Metabolite (p-Base, DPBE) des Farbstoffes massenspektrometrisch zu erfassen, wurden Proben auf der Prontosil Ace-Säule  $(3\mu)$  mit der Methode 6 online gemessen. Die Hauptabbauverbindungen der anaeroben Behandlung sind in Tabelle 41 aufgelistet. Neben diesen waren auch Ausgangsverbindungen des Abwassers im anaeroben Bioreaktor nachzuweisen, die bereits unter Kapitel 6.1.1.1 und 6.1.1.2 diskutiert wurden. Das stoffspezifische Abbauverhalten wird in Kapitel 6.1.2 (Seite 126) und die daraus abgeleitenden Mechanismen in Kapitel 6.1.4 (Seite 143) betrachtet.

Ein Chromatogramm der online gemessenen Reaktorflüssigkeit, das mit dem Dioden-Array-Detektor in der Monitoring-Methode aufgenommen wurde, ist in Abbildung 63 dargestellt. Die zuvor im Abwasser nicht nachweisbaren Verbindungen wurden nach der Identifizierung durch Interpretation der Massenspektren in die MRM-Monitoring-Methode aufgenommen. In der Abbildung 63 und der Tabelle 40 sind neben den massenspektrometrisch identifizierten Verbindungen auch noch unbekannte Verbindungen aufgeführt. Die entsprechenden Produktionenspektren dieser Verbindungen sind im Anhang dargestellt und werden an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

Tabelle 41: Reaktionsprodukte des hydrolysierten Farbstoffs Reactive Black 5 im anaeroben Bioreaktor

Identifizierte Verbindungen	Abkürzung	RT [min]	Vorläufer -ion	MRM-Transient Q1/Q3 m/z	
Hauptabbauverbindungen					
6-Amino-5-hydroxy-3,4-diimino-	TAHNDS <sub>DP1</sub>	8,1	[M-H] <sup>-</sup>	345	→ 186
3,4-dihydro-naphthalin-2,7-					
disulfonsäure	TALINIDO	7.0	FA 4 1 13-	0.40	407
4,6-Dihydroxy-3,5-diimino-3,5- dihydro-naphthalin-2,7-	TAHNDS <sub>DP2</sub>	7,9	[M-H] <sup>-</sup>	346	→ 187
disulfonsäure					
5,6-Dihydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-	TAHNDS <sub>DP3a</sub>	8,3	[M-H] <sup>-</sup>	347	→ 188
dihydro-naphthalin-2,7-	TAHNDS <sub>DP3b</sub>	0,0	[]	•	,
disulfonsäure	2.00				
4,6-Dihydroxy-3,5-dioxo-3,5-	$TAHNDS_{DP4a}$	8,7	[M-H] <sup>-</sup>	348	→ 189
dihydro-naphthalin-2,7-	$TAHNDS_{DP4b}$	10,4			
disulfonsäure bzw. 5,6-Dihydroxy-					
3,4-dioxo-3,4-dihydro-naphthalin- 2,7-disulfonsäure					
p-Base	РВ	2,7	[2M-H] <sup>-</sup>	399	→ 201
Di-p-Base-Ether	DPBE	5,9	[M-H]	383	$\rightarrow$ 383
Vinyl-p-Base	VPB	5,2	[M-H] <sup>-</sup>	183	→ 183
Reactive Black 5 teilreduziert	RB5-H-PB	8,3	[M-H] <sup>-</sup>	545	→ 264
Reactive Black 5 teilreduziert –2H	RB5-H-PB-2H	8,4	[M-H] <sup>-</sup>	543	→ 463
Unbekannte Verbindungen					
UNK188	-	6,4	[M-H] <sup>-</sup>	188	→ 96
UNK386	-	7,3	[M-H] <sup>-</sup>	386	→ 306
UNK358/278	-	7,8	[M-H] <sup>-</sup>	358	→ 278
UNK371	-	7,9	[M-H] <sup>-</sup>	371	→ 183
UNK584	-	9,1	[M-H] <sup>-</sup>	584	→ 424
UNK661	-	9,4	[M-H] <sup>-</sup>	661	→ 501
UNK373	-	10,1	[M-H] <sup>-</sup>	373	→ 293

Unter den reduktiven Bedingungen im anaeroben Bioreaktor sollen die Azobindungen der Farbstoffe unter Bildung von aromatischen Aminen reduziert werden. Das Produktionenspektrum und das zugehörige Intermediat des Farbstoffes, bei dem die Reduktion einer Azobindung stattgefunden hat, ist in Abbildung 64 (links) dargestellt. Das Molekülion m/z 545 mit einer Azobindung bildet ein intensives Fragmention mit m/z 345, das auf eine Keto-Typ Spaltung der Azobindung hinweist. Sehr schwach ist auch die Azo-Typ Spaltung mit m/z 332 zu erkennen. Etwas intensiver ist die Azo-Typ Spaltung an der N-C-Bindung der p-Base nach Verlust von  $SO_3$  mit dem Ion m/z 280. Insgesamt überwiegt aber der Fragmentierungsweg der Keto-Typ Spaltung mit m/z 345 und nach Abspaltung von  $HSO_3$  m/z 264 und  $SO_3$  zu m/z 184. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich hauptsächlich um die ortho-Hydroxyazobindung des teilreduzierten Azofarbstoffes Reactive Black 5 in der hydrolysierten Form handelt. Die geringe Intensität der Azo-Typ-Spaltung kann auf das koeluierende Isomer mit der ortho-Aminoazobindung zurückgeführt werden.

Die in Abbildung 64 (rechts) vorgeschlagene Struktur könnte einem Folgeprodukte der teilreduzierten Form RB5-H -PB entsprechen, bei der sich unter Autooxidation (-2H) die Ketoiminform ausbildet. Die Bezeichnung hierfür ist RB5-H -PB-2Ha. Das Vorhandensein einer intakten Azobindung in der ortho-Stellung zur Aminogruppe belegt die beobachtete Azo-Typ-Spaltung von m/z 543  $\rightarrow m/z$  170. Im Vergleich zum Produktionenspektrum von RB5-H -PB ist die Intensität des Fragmentions m/z 170 nach Abspaltung von 213 u gering. Sehr viel intensiver sind die Abspaltung der SO<sub>3</sub>-Gruppe, die an beiden Sulfonsäuregruppen

auftreten. Daneben ist die Sulfonylethanolabspaltung nach homolytischer Spaltung der S-C-Bindung sehr deutlich im Produktionenmassenspektrum zu beobachten (*m/z* 434, 354, 274). Eine Keto-Typ-Spaltung konnte bei der Fragmentierung nicht nachgewiesen werden, so dass das Vorliegen der ortho-Aminoazobindung wahrscheinlicher ist.

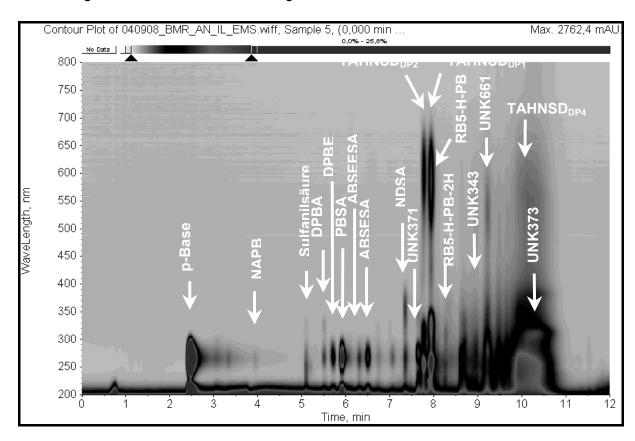


Abbildung 63: Dioden-Array-Detektor-Chromatogramm der online gemessenen Probe des anaeroben Bioreaktors (AQ-Säule, Monitoring-Methode im Full Scan Modus)

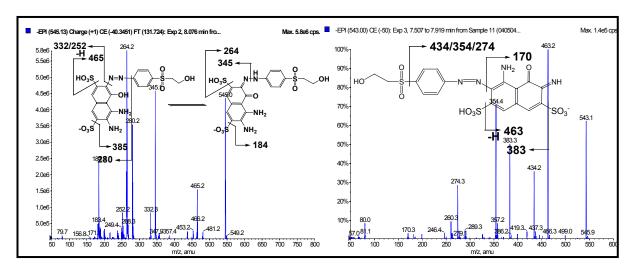


Abbildung 64: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Rechts - teilreduziertes RB5-Hydrolysat (RB5-H -PB); Links - teilreduziertes RB5-Hydrolysat in der Chinoniminform (RB5-H -PB-2Ha)

Kudlich berichtet bei der Reduktion an Azofarbstoffen mit ortho-ständigen Hydroxygruppen zur Azobindung erstmals über die Bildung von Autooxidationsprodukten, die sich bei der Hydrolyse eines Diimins zum Ketoimin bilden [201], [260]. In seiner Arbeit untersuchte er die Reaktionsprodukte der reduktiven Spaltung von Naphtholblauschwarz, einem Diazofarbstoff, der als Kupplungspomponente die H-Säure und als Diazoniumkomponenten Anilin und 1,4-Benzendiamin besitzt. Als Reaktionsprodukte der reduktiven Behandlung beschreibt er unter der Annahme, dass beide Azobindungen reduziert werden, die beiden Diazoniumkomponenten und 3,5,6-Triamino-4-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure (Diamino-H-Säure). Analog dazu postuliert er bei der Reduktion von Reactive Black 5 die Freisetzung von Diamino-H-Säure sowie zweier Moleküle p-Base. Bei chromatographischen Untersuchungen in Kopplung mit UVVIS und massenspektrometrischer Detektion konnte er im UVVIS neben p-Base zwei weitere Verbindungen nachweisen, von denen nur eine mit ESI-MS zu detektieren war. Abbildung 65 zeigt den von Kudlich postulierten Autooxidations- und Hydrolysemechanismus, bei dem das Molekulargewicht von TAHNDS<sub>DP2</sub> vom Molekülion abgeleitet wurde und nicht durch Fragmentierungsmuster genauer charakterisiert wurde.

Abbildung 65: Autooxidations- und Hyrdrolysemechanismus von 3,5,6-Triamino-4-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure [201], [260]

Bei der massenspektrometrisch nachweisbaren Substanz handelte es sich um 4,6-Dihydroxy-3,5-diimino-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS $_{DP2}$ ) mit m/z 347, deren Produktionenspektrum in Abbildung 66 dargestellt und interpretiert ist. Die Abkürzung für diese Verbindung geht auf das formale Reduktionsprodukt zurück, das sich aus der Di-Amino-H-Säure ergibt, d.h. die 3,5,6-Triamino-4-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS). Kudlich geht davon aus, dass das primäre Reduktionsprodukt TAHNDS instabil ist und sofort zu TAHNDS $_{DP1}$  (6-Amino-5-hydroxy-3,4-diimino-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure) autooxidiert. TAHNDS $_{DP1}$  ließ sich aufgrund der nicht sauerstofffreien Beprobung massenspektrometrisch in Kudlichs Arbeit nicht nachweisen, so dass er die Struktur nur postulierte. Der Mechanismus der Hydrolyse vom Imin zum Keton ist abgeleitet vom allgemein akzeptierten Reaktionsmechanismus von Aminosäure-Dehydrogenasen wie beispielsweise der Glutamat- Dehydrogenasen [261].

Bei der Fragmentierung des Metaboliten TAHNDS<sub>DP2</sub> in Abbildung 66 (links) findet hauptsächlich eine Abspaltung der SO<sub>3</sub>-Gruppen als Neutralteilchen (m/z 267, 187) oder Ion (m/z 80) statt. Die Fragmentierung von m/z 267 geschieht unter Abspaltung von SO<sub>2</sub> zu m/z 202. Ein Hinweis auf die vorhandenen Imin-Gruppen liefert die Spaltung von HCN mit 27 u, die bei der Fragmentierung von m/z 187  $\rightarrow m/z$  160 beobachtet werden kann. Bei der Überprüfung des Fragmentierungsmechanismus mit MS³ wurden auch die Neutralteilchenabspaltung von CO (28 u) beobachtet, die die Ionen m/z 175 und 239 ergab. Bei der MS³ Messung von m/z 348 $\rightarrow m/z$  267 und m/z 348 $\rightarrow m/z$  187 wurde beide Male das Ion m/z 147 detektiert. Die dieser Fragmentierung zu Grunde liegenden Mechanismen konnten nicht plausibel nachvollzogen werden. Wahrscheinlich vollzieht sich die Bildung des Fragmentions m/z 147 unter Öffnung eines Rings des Naphthalingrundgerüsts und unter Abspaltung von Kohlenstoffatomen aus dem Ring. Die vorgeschlagene Struktur konnte durch einen Teil der beobachteten Fragmentierungen bestätigt werden. Einen Hinweis auf die Position der einzelnen Substituenden liefert das Fragmentierungsmuster nicht.

Durch den Einsatz der Inline-Sonde war es möglich, unter sauerstofffreien Probenahmebedingung die von Kudlich postulierte, aber massenspektrometrisch nicht nachzuweisende Substanz TAHNDS<sub>DP1</sub>, erstmalig massenspektrometrisch zu detektieren und durch

kollisionsinduzierte Fragmentierung zu charakterisieren. Das Produktionenspektrum von TAHNDS $_{\rm DP1}$  ist in Abbildung 66 (rechts) dargestellt. Die von Kudlich postulierte Molekülionenmasse von m/z 347 konnte hierbei bestätigt werden. Das Fragmentierungsmuster dieser Verbindung zeigt, dass der Fragmentierungsweg wie bei TAHNDS $_{\rm DP2}$  von der Abspaltung der SO $_3$ - und SO $_2$ -Teilchen dominiert ist (m/z 282, 202, 266, 186). Viele der Fragmentionen sind um eine Masseneinheit kleiner als bei TAHNDS $_{\rm DP2}$ , was auf die strukturelle Ähnlichkeit hindeutet.

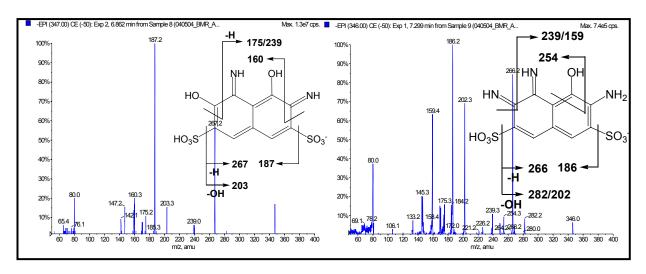


Abbildung 66: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Links - TAHNDS<sub>DP2</sub>; Rechts - TAHNDS<sub>DP1</sub>

Sehr viel intensiver als bei TAHNDS<sub>DP2</sub> ist das Fragmention m/z 159 (analog m/z 160), das bei der selben Kollisionsenergie von -50 V annähernd so intensiv ist wie m/z 202 aus der Spaltung von SO<sub>2</sub>. Im Vergleich zu TAHNDS<sub>DP2</sub> lässt sich bei TAHNDS<sub>DP1</sub> nur ein Fragmention nachweisen, das unter Abspaltung von CO entsteht (m/z 282  $\rightarrow$  m/z 254). Das Verhältnis von CO-Abspaltung TAHNDS<sub>DP1</sub>/TAHNDS<sub>DP2</sub> = 1/2 kehrt sich bei der Abspaltung von HCN (27 u) um. TAHNDS<sub>DP1</sub> bildet bei der Fragmentierung unter Abgabe von HCN die Ionen m/z 239 und m/z 159. Bei TAHNDS<sub>DP2</sub> beschränkt sich diese Fragmentierung auf m/z 187  $\rightarrow$  m/z 160. Die Annahme, dass sich aus TAHNDS<sub>DP1</sub> über Hydrolyse TAHNDS<sub>DP2</sub> bildet, wird durch das sich ändernde Verhältnis der Abspaltungen von HCN zu CO bei diesen Verbindungen unterstützt.

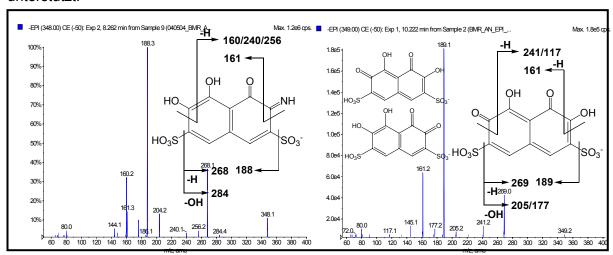


Abbildung 67: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Links - TAHNDS $_{DP3}$ ; Rechts - TAHNDS $_{DP4}$ 

In den Versuchsreihen zur anaeroben Reduktion von Reactive Black 5 wurde weitere Verbindungen nachgewiesen, die ähnliche Fragmentierungsmuster wie TAHNDS<sub>DP1</sub> und TAHNDS<sub>DP2</sub> aufwiesen und im Molekulargewicht um ein bzw. zwei Masseneinheiten größer waren als TAHNDS<sub>DP2</sub>. Abbildung 67 (links) zeigt das Produktionenspektrum der mit TAHNDS<sub>DP3</sub> bezeichneten Substanz (5,6-Dihydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure) mit m/z 348. Neben den sulfonsäuregruppen-typischen Abspaltungen von 80 u und 64 u, ist hier im Vergleich zu TAHNDS<sub>DP1</sub> und TAHNDS<sub>DP2</sub> eine Steigerung der Intensität von CO-Abspaltungen (m/z 188  $\rightarrow m/z$  160) gegenüber HCN-Abspaltungen (m/z 188  $\rightarrow m/z$  161) zu verzeichnen. TAHNDS<sub>DP3</sub> ist wahrscheinlich eine weiteres Produkte der Hydrolyse, bei dem formal NH gegen eine Sauerstoffatom ausgetauscht wird.

Den Nachweis eines weiteren potentiellen Folgeproduktes der Hydrolyse mit der Bezeichnung TAHNDS<sub>DP4</sub>, zeigt die Abbildung 67 (rechts). Bei der Fragmentierung dieser Verbindung wurden neben den üblichen  $SO_3$ - und  $SO_2$ -Abspaltungen ausschließlich die Abspaltung von CO mit m/z 241, 160 und 117 beobachtet. Diese Verbindung konnte mit unterschiedlichen Retentionszeiten nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen von zwei möglichen Isomeren hindeutet, die für die Strukturvorschläge in der Abbildung dargestellt sind: 4,6-Dihydroxy-3,5-dioxo-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure und 5,6-Dihydroxy-3,4-dioxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure. Eine eindeutige strukturelle Zuordnung möglicher Isomere war mit Hilfe der Interpretation der Fragmentierungsmuster nicht möglich.

Die beobachteten Mechanismen der Autooxidation und Hydrolyse der vier Verbindungen TAHNDS<sub>DP1-4</sub>, die mit massenspektrometrischen Interpretation abgesichert werden konnten, ähneln den von Reemtsma und Stüber beobachteten Mechanismen, die in Abbildung 68 links dargestellt sind [257], [262],. An der Modellsubstanz 2-Amino-3-hydroxy-naphthalinsulfonsäure untersuchten sie den Mechanismus der Rückverfärbung, der bei Reduktion von Azobindungen mit ortho-ständiger Hydroxygruppe beobachtet wurde [15], [110], [260]. Dabei zeigte sich, dass schon nach kurzer Zeit in wässriger Lösung eine Veränderung der Struktur und Farbigkeit dieser Verbindung zu beobachten war. Nach etwa zwei Tagen wurden massenspektrometrisch chinoide Strukturen am Naphthalin nachgewiesen, die für die Verfärbung der im Ausgangszustand farblosen Verbindung verantwortlich waren. Neben einer vierstufigen Reaktion vom 2-Amino-3-hydroxy-naphthalinsulfonsäure zur 3,4-Dioxo-naphthalinsulfonsäure wurde eine Dimerisierung der Substanz beobachtet.

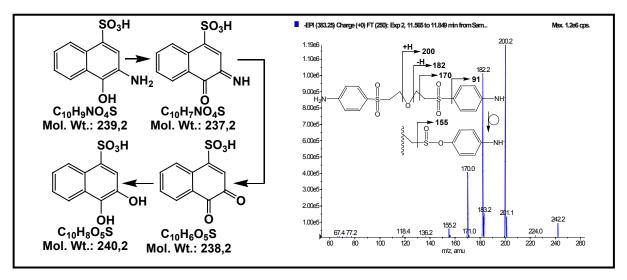


Abbildung 68: Links - Verfärbungsmechanismus von 2-Amino-3-hydroxy-naphthalinsulfonsäure in wässriger Lösung [262]; Produktionenspektrum von DPBE und Fragmentierungsschema

Hinweise auf einer Dimerisierung von TAHNDS-Derivaten wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Der Austausch von Amino- gegen Hydroxygruppen bzw. von

Imin- gegen Oxo-gruppen führt insgesamt zu einer hypsochromen Verschiebung der spektralen Absorption, d.h. die bei TAHNDS<sub>DP2</sub> beobachtete blaue Färbung verschiebt sich bei TAHNDS<sub>DP3</sub> in den roten bis grünen Bereich bei TAHNDS<sub>DP4</sub> (siehe auch Kapitel 0, Seite 146).

Bei der anaeroben Reduktion der Verbindungen RB5-H +DPBE (siehe Abbildung 62, Seite 117) kann Di-p-Base-Ether (DPBE) abgespalten werden, die wie p-Base vom Kationensuppressor adsorbiert wird. Durch Verwendung der Prontosil Ace (3 $\mu$ )-Säule unter Methode 6 ohne Kationensuppressor konnte diese Substanz massenspektrometrisch nachgewiesen und durch die Fragmentierung im Produktionenscan charakterisiert werden. Abbildung 68 (rechts) zeigt das Produktionenspektrum von Di-p-Base-Ether, das in Analogie zu p-Base fragmentiert. Der Nachweis der Etherbindung ergibt sich aus dem Molekülion m/z 383, das mit nahezu gleicher Intensität die Fragmentionen m/z 200 und m/z 182 bildet. Wie bei den anderen Derivaten der p-Base ist auch bei DPBE die Umlagerung der Sulfonylgruppe zu beobachten, aus der sich nachfolgend die Spaltung der C-S-Bindung unter Bildung des Fragmentions m/z 155 ergibt.

#### 6.1.1.4 Reaktionsprodukte im aeroben Bioreaktor

Zur Veranschaulichung der Leistungsfähigkeit der aeroben Behandlungsstufe aromatische Verbindungen abzubauen ist in Abbildung 69 ein Dioden-Array-Detektor-Chromatogramm einer online gemessenen Probe der aeroben Bioreaktors dargestellt. Das Chromatogramm illustriert, dass ein Großteil der im anaeroben Bioreaktor gefunden Verbindungen (Vergleiche Abbildung 63, Seite 119) im aeroben Bioreaktor nicht mehr nachweisbar war. Die genaue Bestimmung der Zusammensetzung und Bewertung der Abbaubarkeit folgt in den Kapiteln 6.1.3 bis 6.1.7.

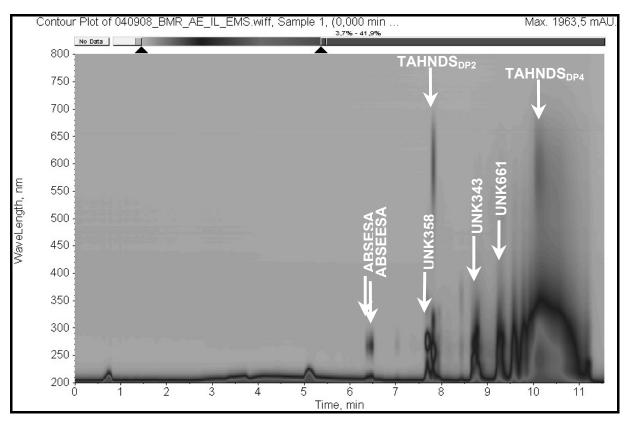


Abbildung 69: Dioden-Array-Detektor-Chromatogramm der online gemessenen Probe des aeroben Bioreaktors während des kontinuierlichen Betriebes (AQ-Säule, Monitoring-Methode im Full Scan Modus)

Das im aeroben Bioreaktor zu behandelnde Abwasser stammte aus dem Ablauf der anaeroben Farbstoffbehandlung. Im aeroben Bioreaktor wurden verschiedene schon im anaeroben Bioreaktor nachgewiesenen Intermediate gefunden. Oxidationsprodukte des aeroben Abbaus von anaeroben Reduktionsprodukten konnten nicht nachgewiesen werden. Daraus ist nicht abzuleiten, dass im aeroben Bioreaktor keine nachweisbaren oxidativen Abbauprodukte entstanden. In Kapitel 6.1.3 kann gezeigt werden, dass ein Teil der bereits identifizierten Verbindungen im aeroben Bioreaktor mit deutlich höherer Intensität als im anaeroben Bioreaktor nachgewiesen werden konnte. Die partielle Bildung dieser Oxidationsprodukte im anaeroben Bioreaktor stand wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem im kontinuierlichen Betrieb sukzessive zugeführten Sauerstoff, der im Abwasser gelöst war. Die völlige Sauerstofffreiheit des anaeroben Betriebes konnte auch durch Stickstoffspülung des Bioreaktors nicht gewährleistet werden, wie die Entwicklung des Redoxpotentials bei den durchgeführten Versuchsreihen zeigte.

#### 6.1.1.5 Nicht vollständig identifizierte Intermediate

Neben den bereits identifizierten Verbindungen im Abwasser und den Bioreaktoren konnten verschiedene unbekannte Intermediate mit dem Diodenarray-Detektor und Massenspektrometer erfasst werden. Die Interpretation der Produktionenspektren dieser Verbindungen ergab keine sinnvollen Zuordnungen zu möglichen Molekülstrukturen. Neben dem hier diskutierten Beispiel sind weitere gemessene Spektren unbekannter Verbindungen im Anhang dargestellt.

Bei dreien der im anaeroben und aeroben Bioreaktor erfassten Massenspektren von unbekannten Verbindungen, ergaben sich deutliche Übereinstimmungen der Fragmentierungswege (Vergleiche Abbildung 70 und Abbildung 71). Für die Verbindung mit m/z 343 wurde in Abbildung 70 (links) als mögliche Struktur die 5-Ethensulfonyl-2-hydroxy-benzendisulfonsäure (ESHBDSA) diskutiert. Pham et al. beschreiben in ihrer Untersuchung zur Zusammensetzung der Handelsware Reactive Black 5 das phenolische Analogon zur p-Base, bei der die Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe substituiert ist [3].

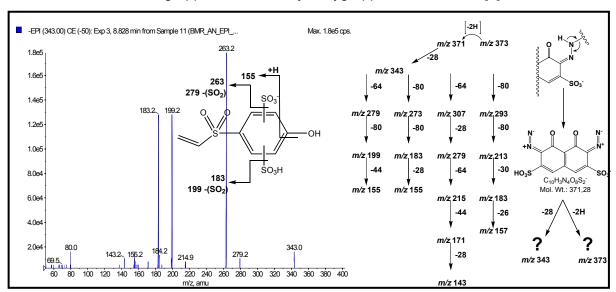


Abbildung 70: Links: Produktionenspektrum einer unbekannten Verbindung mit m/z 371; Rechts: Vergleich der Fragmentierungswege von UNK343, 371 und 373 sowie Darstellung des möglichen Bildungsmechanismus eines  $\alpha$ -Diazoketons aus der Reduktion einer Hydrazoverbindung (4,5-Dihydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure gekuppelt mit p-Base)

Ein Derivat dieser Verbindung ist möglicherweise die Verbindung UNK343 als 5-Ethensulfonyl-2-hydroxy-benzen-disulfonsäure (ESHBDSA), die bereits im Hydrolysat des

Farbstoffes nachweisbar ist. Der Fragmentierungsweg dokumentiert die Abspaltung der beiden Sulfonsäuregruppen einmal als SO<sub>3</sub> bzw. SO<sub>3</sub> und als Neutralteilchen SO<sub>2</sub>. Das Phenol zeigt eine Abspaltung CO (28 u) wie sie auch bei negativer Elektronenstossionisation an Phenoxyl-Ionen beobachtet wird [251]. In Gegenwart eines ortho-ständigen Wasserstoffatoms kann auch CHO als Fragment abgespalten werden, was bei ESHBDSA nicht beobachtet wurde. Zur Absicherung der vorgeschlagenen Struktur, müsste die Fragmentierung der Sulfonylethen-Gruppe zu beobachten sein. Die Sulfonylgruppen-typische Umlagerung und Abspaltung wurde jedoch nicht nachgewiesen. Daher ist der Strukturvorschlag 5-Ethensulfonyl-2-hydroxy-benzen-disulfonsäure als unwahrscheinlich zu betrachten.

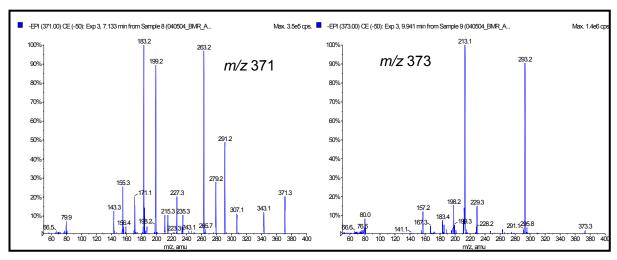


Abbildung 71: Links: Produktionenspektrum einer unbekannten Verbindung mit m/z 371; rechts: Produktionenspektrum einer unbekannten Verbindung mit m/z 371 (beide gemessen bei einer Kollisionsenergie von –50 V)

Bei der Fragmentierung der beiden anderen unbekannten Verbindungen fällt die Analogie zum Fragmentierungsmechanismus von UNK343 auf (rechte Darstellung in Abbildung 70). Auch bei diesen Verbindungen wurde keine Sulfonylgruppen-typische Umlagerung und Abspaltung analog zur p-Base beobachtet.

Es handelt sich bei den beiden unbekannten Verbindungen in Abbildung 71 mit m/z 371 (UNK371) und m/z 373 (UNK373) um eine zweifach sulfonierte aromatische Verbindung. Beide Spektren weisen mehrfach Differenzen von 80 u zwischen den Fragmentionen auf. UNK371, das sich von UNK343 durch 28 u unterscheidet, fragmentiert nach Verlust von 28 u unter zweifacher Abspaltung von SO<sub>3</sub> mit m/z 371  $\rightarrow$  m/z 343  $\rightarrow$  m/z 263  $\rightarrow$  m/z 183. UNK373, das sich von UNK343 durch 30 u und von UNK371 durch 2 u unterscheidet, fragmentiert direkt unter zweifacher Abspaltung von SO<sub>3</sub>: m/z 373  $\rightarrow$  m/z 293  $\rightarrow$  m/z 213. Das Fragmention m/z 183 ist bei allen drei Verbindungen mit unterschiedlicher Intensität nachweisbar. Die Analogie in den Fragmentierungsmustern legt nahe, dass die drei Ionen m/z 343, 371 und 373 über die gleiche Grundstruktur verfügen.

Aus der Synthese von H-Säure ist bekannt, dass 4,5-Dihydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure als Nebenprodukt entsteht, das bei der Synthese von Azofarbstoffen als mögliche Kupplungskomponente neben der H-Säure vorliegen kann. Unter basischer Kupplung mit diazotierter p-Base entsteht ein Diazofarbstoff, der von Pham et al. in der Handelsware des Farbstoffes Reactive Black 5 nachgewiesen wurde [3]. Bei diesem Farbstoff liegen beide ortho-Hydroxyazobindungen in wässriger Lösung in der tautomeren Form vor. Unter bestimmten Bedingungen wäre es im anaeroben Bioreaktor denkbar, dass sich partiell durch die Bildung der Keto-Hydrazonform unter Spaltung der C-N-Bindung zur p-Base und Wanderung eines Protons die Diazoketonform ausbildet (vorgeschlagener Mechanismus siehe Abbildung 70 rechts). Der Ringschluss in Form einer Oxadiazolbindung ist sehr

unwahrscheinlich, da diese meistens als Valenzisomere in der  $\alpha$ -Diazoketonform vorliegen und nicht sehr stabil sind.

Die gemeinsame Grundstruktur der drei unbekannten Verbindungen ist mit großer Wahrscheinlichkeit die 4,5-Dihydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure. Der Verlust von 28 u bei der Fragmentierung der vorgeschlagenen Struktur für UNK371 spricht für die Abspaltung von  $N_2$  oder CO. Bei  $\alpha$ -Diazoketonen wird häufig eine  $N_2$ -Abspaltung gefolgt von einer Wolff-Umlagerung unter Ringverkleinerung beobachtet, in deren Folge CO freigesetzt wird. Der Verlust von 44 u legt eine Abspaltung von  $CO_2$  nahe. Für die beiden Verbindungen UNK343 und 371 könnten aufgrund der Massendifferenz von 28 u  $(N_2)$  bzw. 2 u (2H) mögliche Strukturen ableitet werden. Das stoffspezifische Verhalten dieser Verbindungen wird in Kapitel 6.1.3.4 (Seite 141) betrachtet.

#### 6.1.2 Bestimmung der Farbstoffabbaukinetik im Step-Feed-Batch-Verfahren

Um das stoffspezifische Abbauverhalten der Abwasserinhaltsstoffe und der beim Abbau gebildeten Intermediate beurteilen zu können, wurden beide Bioreaktoren mit Hilfe der Online-Monitoring-Methode überwacht. In so genannten Step-Feed-Batch-Versuchen wurden der anaerobe mit einer Stosszugabe von Modellabwasser (RB5-Hydrolysat) belastet. Die jeweiligen Raumbelastungen sind in Tabelle 42 angegeben. Mit Hilfe des bereits beschriebenen Online-HPLC-DAD-Verfahrens (Merck La Chrom System siehe Kapitel 5.4, Seite 46) wurde der Abbau des Farbstoffes, seiner Hauptnebenverbindungen und der Hauptabbauprodukte TAHNDS $_{\rm DP1-2}$  und p-Base halbquantitativ überwacht, dokumentiert und bewertet. Dabei wurden die Kinetik des Abbaus einzelner Substanzen mit berücksichtigt.

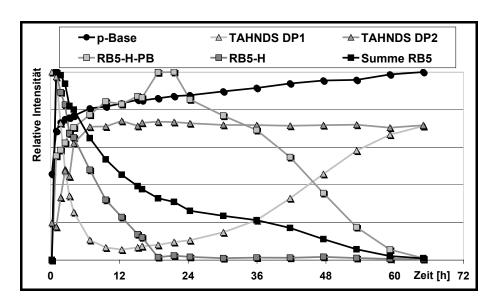


Abbildung 72: Verlauf der relativen Intensität des RB5-Hydrolysates und seiner Metabolite nach einer Step-Feed-Batch-Zugabe von 1,37 mM L<sup>-1</sup> RB5-H

Abbildung 72 zeigt die Abnahme der Konzentration des Hydrolysats (Startkonzentration 1,36 m $M_{RB5-H}$  L<sup>-1</sup>) und der anderen Hauptkomponenten über einem Zeitraum von 72 Stunden im anaeroben Bioreaktor. Nach 20 Stunden war das Farbstoffhydrolysat nicht mehr im Bioreaktor nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt erreichte das teilreduzierte Hydrolysat RB5-H-PB seine maximale Konzentration, die nach etwa 60 Stunden auf null absank. Mit der Zugabe an Hydrolysat (0 h) fiel die Konzentration von TAHNDS<sub>DP1</sub> auf fast null. Unter Absinken der Konzentration des teilreduzierte Hydrolysat RB5-H-PB begann TAHNDS<sub>DP1</sub> bis zu einem Endwert von 70% der Ausgangskonzentration anzusteigen. Die Konzentration des Folgeproduktes TAHNDS<sub>DP2</sub> stieg mit dem Absinken von TAHNDS<sub>DP1</sub> in den ersten 12 Stunden und blieb dann konstant.

Die durch Reduktion der Azobindungen freigesetzte p-Base korreliert mit der starken Abnahme von RB5-H zu Beginn des Versuchs und der im Anschluss langsameren Verringerung von RB5-H-PB. Die Messgröße "ΣRB5" erfasst alle farbigen Verbindungen (eingeschlossen RB5-H und RB5-H-PB), die ein ähnliches UVVIS-Absorptionsspektrum wie Reactive Black 5 aufwiesen und zum Zeitpunkt der Versuchsreihe nicht genauer spezifiziert werden konnten.

Die meisten grundlegenden aktuellen kinetischen Untersuchungen zum Abbau von Azofarbstoffen beschreiben den Abbau bzw. die Entfärbung nach formal 1. Ordnung in Bezug auf die Farbstoffkonzentration und das Reduktionsmittel [126]. Frühere Publikationen aus den 70iger Jahren, bei denen Azofarbstoffe in Reinkulturen behandelt wurden, machen auch Ansätze, bei denen der Abbau formal einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt [263].

Als kinetisches Model zur Beschreibung des anaerob reduktiven Abbaus von Azofarbstoffen wurde eine Kinetik 1. Ordnung in Bezug auf die Farbstoffkonzentration gewählt:

$$-d_{cFS}/dt = k c_{FS}$$

k = Reaktionskonstante [h<sup>-1</sup>]

c<sub>FS</sub> = Farbstoffkonzentration zum Zeitpunkt t [mML<sup>-1</sup>]

Für  $c_{FS} = c_{FS,0}$  bei t = 0 folgt aus der Integration der obigen Gleichung:

$$\ln (c_{FS}/c_{FS,0}) = -k't + c$$

Trägt man In  $(c_{FS}/c_{FS,0})$  graphisch gegen die Zeit auf, dann entspricht k' im Fall eines linearen Verlaufs der Steigung der Geraden.

Die kinetischen Auswertungen der Step-Feed-Batch Abbauversuche im anaeroben Bioreaktor sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Kinetische Betrachtung zu Step-Feed-Batch-Versuchen im anaeroben BMR in Bezug auf die Abnahme des hydrolysierten Reactive Black 5

Nr.	C <sub>RB5-H</sub> [mM]	DFZ <sub>585</sub> [m <sup>-1</sup> ]	$k_{\Sigma RB5}^{1}$ [h <sup>-1</sup> ]; R <sup>2</sup>	K′ <sub>RB5-H</sub> [h <sup>-1</sup> ]; R <sup>2</sup>	$f(k'_{RB5-H}/k)_{\Sigma RB5}$
1	0,1	530	-0,1215; 0,978	-0,1662; 0,991	1,37
2	0,1	530	-0,1633; 0,973	-0,1402; 0,983	0,86
3	0,1	530	-0,1443; 0,992	-0,1427; 0,990	0,99
4	2,75	14575	-0,0414; 0,962	-0,1286; 0,950	4,75
5	1,37	7261	-0,0271; 0,936	-0,1301; 0,998	4,80
6	1,37	7261	-0,0406; 0,929	-0,2542; 0,992	6,26
7	1,37	7261	-0,0424; 0,954	-0,4626; 0,966	10,91

Es zeigt sich, dass bei geringen Konzentrationen von 0,1 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> vergleichbare Reaktionskonstanten des Abbaus von hydrolysiertem Reactive Black 5 und der Summe aller Farbstoffe gemessen wurden. Innerhalb der Versuche Nr. 5 bis 7 konnte eine kontinuierliche Steigerung der Reaktionskonstanten bei gleicher Farbstoffkonzentration beobachtet werden. Dem gegenüber steht der vergleichsweise langsame Gesamtabbau, in dem die Reduktion des Farbstoffhydrolysats und des teilreduzierten Hydrolysats zusammengefasst sind (ΣRB5) Die Reaktionskonstanten für das Hydrolysat mit Nebenverbindungen sowie das teilhydrolysierte Hydrolysat sind bei kleinen Konzentrationen nahezu identisch. Bei hohen Konzentrationen beträgt die Reaktionskonstante des Abbaus des hydrolysierten Farbstoffes ein Vielfaches der Gesamtreaktionskonstante. Daraus lässt sich schließen, dass der geschwindigkeits-limitierende Schritt bei der Reduktion und der möglichen Entfärbung wesentlich von der Reduktion der Nebenverbindungen und des teilreduzierten Metaboliten RB5-H-PB abhängt. Die online durchgeführten Messungen zeigen, dass der Abbau sequentiell verläuft. Die Mechanismen, die dem jeweiligen Abbau zugrunde liegen, konnten bei unseren

Messungen nicht definitiv aufgeschlüsselt werden. Aufgrund dessen wurden weitere Untersuchungen bei kontinuierlichem Betrieb des Bioreaktors durchgeführt, die in Kapitel 6.1.3 (ab Seite 128) dargestellt sind.

Die in der Literatur beschriebenen Zeitkonstanten zur anaeroben Reduktion von Reactive Black 5 decken sich mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten. Bei einer ähnlichen Konzentration von 100 g L $^{-1}$  Farbstoff bestimmten Supaka et al. für die Reduktion von RB5-H ein Zeitkonstante von - 0,154 h $^{-1}$  [264]. Für die Reduktion der teilreduzierten Form sank sie auf - 0,083 h $^{-1}$ . Die von Chen bestimmte Zeitkonstante von – 0,413 h $^{-1}$  für RB5-H deckt sich gut mit der in dieser Arbeit gemessenen für sehr hohe Konzentrationen (Tabelle 42 Nr. 7) [265]. Auch hier sank die Zeitkonstante der teilreduzierten Form auf 0,0129 h $^{-1}$ .

# 6.1.3 Monitoring und Korrelation von Einzelstoffkonzentrationen mit Summenparametern bei kontinuierlichem Betrieb

Zur Überwachung des Farbstoffe, seiner Nebenverbindungen und der Abbauprodukte wurde die Online-MF-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS-Analysenmethode bei kontinuierlichem Betrieb des Entfärbeverfahrens eingesetzt. Die Abfolge der Messreihen mit der Online-Analysenmethode waren:

	Anaerob	Aerob
1.	Blank	Blank
2.	MRM-Messung	MRM-Messung
3.	Full Scan Messung	Full Scan Messung
4.	Kontrollmessung mit Standard-Lösung (Zusammensetzung STDL siehe Tabelle 15, Seite 41)	Kontrollmessung mit Standard-Lösung

5. Spülschritt mit Acetonitril

Spülschritt mit Acetonitril

Die Wiederholung einer Messreihe erfolgte je nach Versuchsdauer im zwei bis zwölf stündigem Abstand.

Die Ergebnisse aus mehreren Messreihen mit wechselnden Raumbelastungen von 0,5 bis 4 mM<sub>RB5-H</sub>L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> werden im Folgenden für die Hauptinhaltsstoffe des untersuchten Abwassers und relevante Nebenverbindungen sowie die Hauptmetabolite der anaeroben Behandlung dargestellt. Die Angaben zu den gemessenen Einzelsubstanzen wurden halbquantitativ ausgewertet und sind als relative oder absolute Intensität in Bezug auf integrierte Peakfläche von Dioden-Array- oder MS/MS-Detektor angegeben. Durch das parallele Monitoring von Einzelsubstanzen war es möglich, das Abbauverhalten im anaeroben und aeroben Bioreaktor zu vergleichen. Die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit im anaeroben und aeroben Bioreaktor sowie im Ablauf des Verfahrens erfolgt im Kapitel 0 (ab Seite 146).

#### 6.1.3.1 Reactive Black 5 und Nebenfarbstoffe

Die Untersuchung zur Abbaukinetik des hydrolysierten Diazofarbstoffes Reactive Black 5 zeigten, dass die Reduktion der beiden Azobindung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen. Geschwindigkeitsbestimmend für die Totalreduktion des Diazobarstoffes war dabei die Reduktion der zweiten Azobindung, die am Abbau der Verbindung RB5-H –PB unter Bildung von TAHNDS<sub>DP1</sub> beobachtet werden konnte. Um das Abbauverhalten des Farbstoffes bei kontinuierlichem Betrieb zu beurteilen, wurde der anaerobe Bioreaktor mit einer Raumbelastung Y von 0,5 – 1,5 mM<sub>RB5-H</sub>L $^{-1}$ d $^{-1}$  über 16 Tage betrieben und mittels Online-MF-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS-Analysenmethode überwacht. Die Abbildung 73 (links) zeigt die Betriebsparameter des anaeroben Bioreaktors. Vom 16. bis zum 22. Tag wurden anaerober und aerober Bioreaktor ohne Abwasserzugabe im Kreislauf betrieben.

Die rechte Darstellung in Abbildung 73 zeigt das stoffspezifische Monitoring des hydrolysierten Farbstoffes und seiner Reduktionsprodukte TAHNDS $_{DP2}$  sowie p-Bases, die in diesem Fall quantitativ ausgewertet wurden. Am 14. Tag des kontinuierlichen Betriebes ist ein Anstieg der Farbstoffkonzentration auf etwa 400  $\mu$ M zu beobachten, mit der eine Verdopplung der TAHNDS $_{DP2}$ -Konzentration von 450  $\mu$ M auf 1150  $\mu$ M einhergeht. Im gleichen Zeitraum sinkt p-base von 7500  $\mu$ M auf 4000  $\mu$ M und bleibt während des anschließenden Kreislaufbetriebes bei etwa 5000  $\mu$ M konstant.

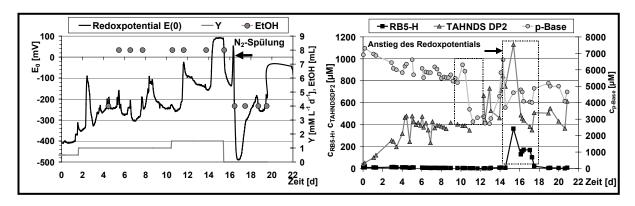


Abbildung 73: (links) Betriebsparameter des anaeroben-aeroben Bioreaktors (Y = Raumbelastung, EtOH = Co-Substratzugabe Ethanol  $mL_{abs}$ ); (rechts) Stoffspezifisches quantitatives Monitoring des anaeroben Bioreaktors

Die Störung der Reduktion des Farbstoffes und das in Folge auftretende Ansteigen bzw. Absinken sind eindeutig auf die Schwankungen des Redoxpotentials zurückzuführen, die durch weitere Redoxpotentialstörungen mit ähnlichem Einfluss am 16. Tag (N<sub>2</sub>-Spülung) und 19. Tag bestätigt werden. Eine genauere Betrachtung der stoffspezifischen Abläufe im anaeroben Bioreaktor zwischen dem 13. und 19. Tag zeigen die halbquantitativen Darstellungen in Abbildung 74 unter Einbeziehung des Reduktionsproduktes TAHNDS<sub>DP1</sub>. Aus der linken Darstellung geht hervor, dass auf den Anstieg des Redoxpotentials von –140 mV auf +100 mV zuerst ein Anstieg der Konzentration des teilreduzierten Farbstoffes (RB5-H –PB) erfolgt. Dazu zeitverzögert ist, wie oben beschrieben, der hydrolysierte Farbstoff nachweisbar, bis das Redoxpotential den Wert von –250 mV am 19. Tag unterschreitet.

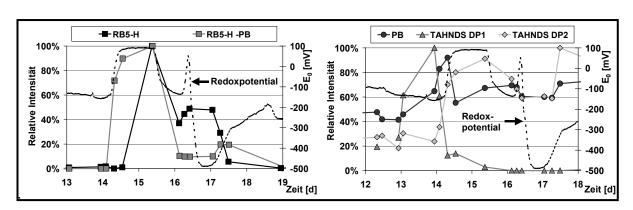


Abbildung 74: Stoffspezifisches halbquantitatives Monitoring des anaeroben Bioreaktors bei einer Raumbelastung von  $0.5-1.5~\text{mM}_{\text{RB5-H}}\,\text{L}^{-1}\,\text{d}^{-1}$ : (links) RB5-H und RB5-H –PB, (rechts) p-Base (PB), TAHNDS<sub>DP1</sub> und TAHNDS<sub>DP2</sub>

Bei der Betrachtung der Produkte der vollständigen Reduktion in der rechten Darstellung, kann der Anstieg von TAHNDS<sub>DP2</sub> eindeutig auf das Absinken von TAHNDS<sub>DP1</sub> am 14. Tag zurückgeführt werden. Der Anstieg der p-Base vom 13. bis 14. Tag korreliert mit dem Anstieg von TAHNDS<sub>DP1</sub>, bei dessen Bildung aus RB5-H -PB p-Base abgespalten wird. Der

anschließende Konzentrationsabfall steht auch im Zusammenhang mit dem Anstieg des Redoxpotentials bis in den oxidativen Bereich von +100mV. Das kurzzeitige Absinken der p-Base-Konzentration ist wahrscheinlich auf den biologischen Abbau p-Bases zurückzuführen, der bei positivem Redoxpotential auch im anaeroben Bioreaktor eintritt. Bei den so genannten Sequenced-Batch-Verfahren folgt auf die Phase der anaeroben Reduktion eine Belüftung des Bioreaktors, durch das oxidative Abbauprozesse initiiert werden [132]-[133], [264].

#### **Korrelation mit Summenparametern**

Aus dem stoffspezifischen Monitoring wird abgeleitet, dass die Höhe des Redoxpotential als die bestimmende Prozessgröße zur anaeroben Entfärbung von Azofarbstoffen durch Reduktion der Azobindung zu betrachten ist. In den bekannten Untersuchungen zum Redoxpotential werden verschiedene Angaben zur erforderlichen Höhe gemacht, die zwischen -200 und -670 mV variieren bzw. als "Redox-Fenster" für Redoxmediatoren definiert sind (siehe Tabelle 10, Seite 30). Aus diesem Grund wurden die mit LC-DAD-MS/MS gemessenen stoffspezifischen Detektionsintensitäten mit dem Redoxpotential aus einer mehrwöchigen Versuchsreihe mit wechselnder Raumbelastung zwischen 0.8-1.6 m $M_{RB5-H}$  L $^{-1}$ d $^{-1}$ korreliert.

Die linke Darstellung in Abbildung 75 zeigt die Korrelation von Redoxpotential und der relativen Detektionsintensität der untersuchten Farbstoffe mit Diazobindung. Unterhalb eines Schwellenwertes von –250 mV lässt sich kein im Abwasser enthaltener Diazofarbstoffe im anaeroben Bioreaktor nachweisen, was auf die Reduktion mindestens einer Azobindung hinweist. An dem Absinken der relativen Detektionsintensität von RB5-H bereits unterhalb von –100 mV ist abzulesen, dass die anaerobe Reduktion bereits oberhalb des Schwellenwertes einsetzt. Die anderen dargestellten Diazofarbstoffe (RB5-HV, RB5-H+DPBE, RB5-H+SO<sub>2</sub>, Di-RB5-H) bestätigen diese Beobachtung. Das Farbstoffdimer Di-RB5-H (*m/z* 733 [M-2H]<sup>2-</sup>) ist durch die kovalente Bindung zweier Farbstoffmoleküle als Verbindung mit Tetraazobindung zu betrachten. Es verhält sich unter den gegebenen reduktiven Bedingungen wie die anderen Diazofarbstoffe. Im Vergleich zu den anderen strukturähnlichen Farbstoffen haben die Farbstoffmolekülgröße und die Anzahl der Azobindungen keinen Einfluss auf den reduktiven Abbau.

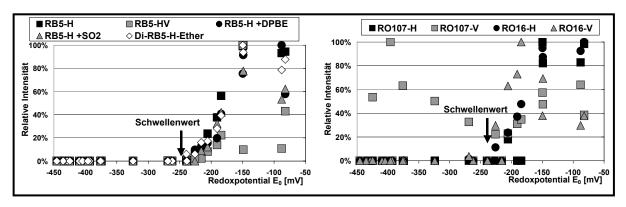


Abbildung 75: Korrelation von Redoxpotential und der relativen MS-Detektionsintensität von Einzelstoffen (Raumbelastung  $0.8-1.6~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$ ) im anaeroben Bioreaktor. Links: RB5-Hydrolysiert und Nebenfarbstoffe (Diazofarbstoffe), rechts: Hydrolysat- (H) und Vinylform (V) der Monoazofarbstoffe Reactive Orange 16 (RO16) und Reactive Orange 107 (RO107)

Im Vergleich hierzu sind in der rechten Abbildung die Korrelationen der relativen Intensitäten von zwei anderen Reaktivfarbstoffen mit dem Redoxpotential dargestellt (Strukturformeln siehe Abbildung 6, Seite 40). Die beiden Farbstoffe sind Monoazofarbstoffe und wurden in der Versuchsreihe ab dem 15. Betriebstag in geringen Mengen mit zugeführt (zur Darstellung von Summenparametern dieser Versuchsreihe siehe Abbildung 79). Mit

Ausnahme der Vinylform von Reactive Orange 107 korrelieren die Farbstoffe wie Reactive Black 5 mit dem Redoxpotential. Der Schwellenwert von –250 mV, unterhalb dessen die Monoazofarbstoffe aufgrund der vollständigen Reduktion nicht mehr nachweisbar waren, deckt sich mit dem für Reactive Black 5 gemessenen Wert für die Reduktion einer Azobindung

Weniger eindeutig korrelieren das Redoxpotential und die relativen Detektionsintensitäten der Monoazofarbstoffbeimischungen RB-OH und RB-NH<sub>2</sub> aus dem Modellabwasser sowie der teilreduzierte Diazofarbstoff (RB5-H –PB), die links in Abbildung 76 dargestellt sind. Der Farbstoff RB-NH<sub>2</sub> verhält sich wie die bereits beschriebenen Diazofarbstoffe und Monoazofarbstoffe. Das Isomer RB-OH tendiert zu einer über den gesamten Redoxbereich verteilten Intensität. Im Vergleich zu RB-NH<sub>2</sub> ist RB-OH damit sehr viel schlechter reduzierbar. Die Position der Azobindung in ortho-Stellung zur Hydroxygruppe erfordert demnach ein niedrigeres Redoxpotential zur Reduktion als das Isomer mit ortho-ständiger Aminogruppe.

Bei dem Teilreduktionsprodukt RB5-H –PB handelt es sich um ein Isomerengemisch mit ortho-Hydroxy- und Aminoazobindung, bei dem der Anteil mit ortho-Aminoazobindung überwiegt. Die Korrelation mit dem Redoxpotential in Abbildung 76 zeigt, es zwei Schwellenwerte gibt, die etwa bei –250 mV und –400 mV liegen. Demnach erfolgt die Reduktion einer der Azobindungen bei einem sehr viel niedrigeren Wert.

Die im Vergleich zu RB5-H - PB oxidierte Form des teilreduzierten Farbstoffes Reactive Black mit der Bezeichnung RB5-H -PB-2H wurde mit zwei Isomeren (a und b) nachgewiesen. Dem in Abbildung 64 (siehe Seite 119) diskutierten Fragmentierungsmuster von RB5-H –PB-2Ha konnte die intakte ortho-Aminoazobindung zugeordnet werden. Aus der rechten Darstellung in Abbildung 76 ist abzulesen, dass die beiden Verbindungen in Bezug auf das Redoxpotential negativ zueinander korreliert sind. Die Intensität der chromatographisch später eluierende Verbindung RB5-H -PB-2Hb sinkt mit dem Redoxpotential und erreicht wie RB5-H -PB den Schwellenwert von etwa -400 mV, bei dem die Intensität das Minimum erreicht. Die Intensität sinkt hier nicht auf null, sondern verweilt bei einem Sockelwert von etwa 20%. RB5-H-PB-2Ha verhält sich umgekehrt und erreicht unterhalb von -350 mV die höchsten Intensitäten. Es hat eine etwa 10fach höhere Intensität als RB5-H -PB-2Hb.

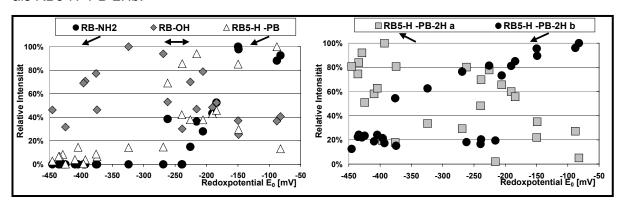


Abbildung 76: Korrelation von Redoxpotential und der relativen MS-Detektionsintensität von Einzelstoffen (Raumbelastung  $0.8-1.6~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$ ) im anaeroben Bioreaktor. Links: Nebenfarbstoffe und teilreduzierte Farbstoffe (Monoazofarbstoffe); rechts: teilreduzierte Farbstoffe (Monoazofarbstoffe)

Aus der zeitlichen Entwicklungen der Intensitäten von RB5-H -PB-2Ha und RB5-H -PB (Isomerengemisch des ortho-Hydroxy- und ortho-Aminoazobindung) lässt sich ableiten, dass RB5-H -PB möglicherweise ein Folgeprodukt von RB5-H -PB-2Ha ist, da es zeitlich vor RB5-H -PB gebildet wurde (siehe Abbildung 77 links). Durch Schwankungen im Redoxpotential setzte unterhalb des oberen Schwellenwertes die Reduktion von RB5-H -PB-2H zu RB5-H -

PB ein, dessen Intensität in Bezug auf das Redoxpotential negativ zu RB5-H –PB korreliert war.

In Abbildung 77 ist ein möglicher Mechanismus zur Bildung von RB5-H -PB durch Reduktion von RB5-H -PB-2H dargestellt. Die Bildung von RB5-H -PB-2H aus hydrolysiertem Reactive Black 5 kann durch die Übertragung eines Wasserstoffäquivalents auf den Azofarbstoff unter Bildung einer Hydrazoverbindung erfolgen [102], [113]. Durch eine Disproportionierungsreaktion würde Reactive Black 5 anschließend in p-Base und RB5-H -PB-2H gespalten werden. Darauf folgt bei weiterem Absinken des Redoxpotentials die Reduktion von RB5-H -PB-2H zu RB5-H -PB. Bedingt durch elektronenliefernde Substituenden wie Hydroxy- und Aminogruppen in ortho- oder para-Stellung zur Azobindung, läuft die Disproportionierungsreaktion der instabilen Hydrazinform relativ zügig ab [102]. Bei stabilen Hydrazinformen wäre unter oxidativen Bedingungen eine Rückbildung der Azobindung zu beobachten, die zu einer nachweisbaren Rückverfärbung führen müsste.

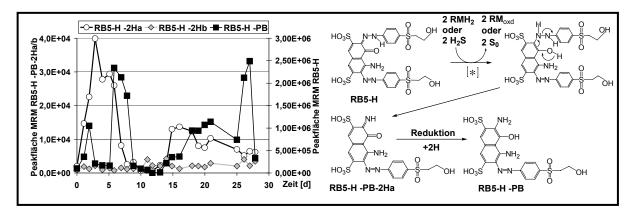


Abbildung 77: Links - Stoffspezifisches Monitoring von RB5-H –PB-2Ha/b und RB5-H –PB im anaeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von  $0.5-1.5~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$ ; Rechts – [\*] möglicher Reduktionsmechanismus mit zwei-Elektronenübertragung nach [102], [113] und anschließend stattfindende Reduktion von RB5-H –PB-2Ha zu RB5-H –PB

Die Korrelation in Abbildung 76 (rechts) zeigt, dass beim Diazofarbstoff Reactive Black 5 zur vollständigen Reduktion der zweiten Azobindung ein deutlich niedrigeres Redoxpotential erforderlich ist als zur Reduktion der ersten Azobindung. Aus dem Vergleich der Reduktion der Isomere RB-OH und RB-NH<sub>2</sub> lässt sich ableiten, dass die Reduktion der ortho-Aminoazobindung unter gleichen Bedingungen bevorzugt abläuft. Im Vergleich hierzu laufen die Reduktionen der teilhydrolysierten Verbindungen sowie der Monoazofarbstoffe Reactive Orange 16 und 107 unter gleichen Bedingungen ab. Beide Formen des Farbstoffes Reactive Orange 16 mit ortho-Hydroxyazobindung korrelieren analog zu der Reduktion des Diazofarbstoffes Reactive Black 5 zum teilreduzierten RB5-H -PB mit dem Redoxpotential.

Es ist davon auszugehen, das es bei der Behandlung von Farbstoffkonzentraten, die den Modelldiazofarbstoff Reactive Black 5 enthalten, zu einer sequentiellen Reduktion der beiden Azobindungen kommt, die redoxpotentialabhängig ist. Die kinetischen Untersuchungen mit großen Stossbelastungen bestätigten diese Beobachtung. Hingegen wurden bei geringen Stossbelastungen keine bevorzugte Reduktion einer Azobindung registriert.

Ob in der ersten Reduktionsstufe mit dem Schwellenwert von –250 mV bevorzugt die Reduktion der ortho-Aminoazo- oder ortho-Hydroxyazobindung einstellt, lässt sich nur bedingt bestimmen. Unter Berücksichtigung der relativen Intensitäten, die aus den Peakflächen der MRM-Signale ermittelt wurden, liegt die Konzentration des Isomerengemisches RB5-H – PB um das 10fache höher als RB5-H – PB-2Ha. Die massenspektrometrische Charakterisierung von RB5-H –PB ergab, dass sich die gemessene Verbindung zum überwiegenden Teil aus dem Isomer mit ortho-Hydroxyazobindung zusammensetzte. Demnach bevorzugt die erste Reduktionsstufe die ortho-Aminoazobindung. Der in Abbildung

77 vorgeschlagene Mechanismus könnte den Anteil an ortho-Aminoazobindung im Isomerengemisch RB5-H –PB erklären, der sich aus der Reduktion der ortho-Aminoazobindung von Reactive Black 5 ergibt, die weniger bevorzugt parallel abläuft.

Die bei dem oberhalb des Schwellenwertes von – 250 mV stattgefundene Reduktion des Monofarbstoffes Reactive Orange 16 mit ortho-Hydroxyazobindung deutet darauf hin, dass diese Azobindung nicht notwendigerweise reduktionsstabiler ist. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass der Farbstoff etwa um den Faktor 100 unterhalb der Konzentration vom hydrolysierten Reactive Black 5 lag. Einen Aufschluss über die Stabilität könnte mit der Reduktion eines auf Reactive Orange 16 basierten Azofarbstoffes mit ortho-Aminoazobindung erbringen.

Eine Darstellung der möglichen Mechanismen, unter denen die Reduktion der ortho-Aminoazo- und ortho-Hydroxyazobindung abläuft, wird in Kapitel 6.1.4.1 (Seite 143) diskutiert.

#### 6.1.3.2 Abbauprodukte der anaeroben Reduktion

Aus den Ergebnissen früherer Arbeiten ist bekannt, dass p-Base als Reduktionsprodukt der anaeroben Behandlung von vinylsulfonbasierten Reaktivfarbstoffen unter aeroben Bedingungen in der Regel gut abzubauen ist [11], [15], [126], [127]. Das zweite Reaktionsprodukt, TAHNDS $_{\rm DP2}$ , das aus der vollständigen Reduktion des hydrolysierten Farbstoff Reactive Black 5 und anschließender Hydrolyse gebildet wird, konnte im Kolbenversuch mit Belebtschlamm innerhalb von 25 Tagen abgebaut werden [201]. Beim Abbau wurde ein weiteres farbiges Zwischenprodukt nachgewiesen, wobei sich am Ende des Versuches ein UV-absorbierendes Endprodukt bildete, dessen Abbaubarkeit nicht weiter dokumentiert wurde. In anderen Untersuchungen zur anaerob-aeroben Entfärbung von Reaktivfarbstoffen mit kontinuierlich arbeitenden Bioreaktoren wird TAHNDS $_{\rm DP2}$  als schwer bzw. nicht biologisch abbaubar eingestuft [14], [15]. Untersuchungen über die Nachweisbarkeit dieser Verbindung im Ablauf von kommunalen oder industriellen Kläranlagen, in die Textilfärbereien Abwasser einleiten, sind nicht bekannt.

#### Monitoring von Einzelsubstanzen und Korrelation mit Summenparametern

In der vorliegenden Arbeit konnte die gute Abbaubarkeit der p-Base bestätigt werden. Die linke Darstellung in Abbildung 78 dokumentiert den Konzentrationsverlauf von p-Base in den Stufen des Bioreaktors bei einer Versuchsreihe mit einer Raumbelastung von 0,8 – 1,6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Der Verlauf der p-Base in der anaeroben Stufe zeigt eine leicht abnehmende Tendenz, die ab dem 12. Betriebstag einsetzte. Dieses war auf einen sukzessiven Anstieg des Redoxpotentials und die damit einhergehende Reduktion zurückzuführen (siehe Abbildung 79, links). Der Abbau der p-Base im aeroben Bioreaktor vollzog sich nach einer Anpassungsphase, die etwa vier Tage dauerte. Nach zwei bis drei weiteren Tagen war p-Base im aeroben Bioreaktor nicht mehr nachzuweisen. Im Ablauf des aeroben Bioreaktors ist der vollständige Abbau nach drei weiteren Tagen zu sehen, was auf einen möglichen Puffereffekt des Permeatsammelbehälters B400 in Abbildung 47 (Seite 100) zurückzuführen ist.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der quantitative Verlauf der p-Base im anaeroben und aeroben Bioreaktor bestimmt (rechte Abbildung). Hierbei konnte in den ersten vier Tagen des kontinuierlichen Betriebes p-Base im aeroben Bioreaktor nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde beim aeroben Bioreaktor mehrfach beobachtet, wenn auf eine Phase des Kreislaufbetriebes ohne Zulauf aus dem anaeroben Bioreaktor die Wiederaufnahme des kontinuierlichen Betriebes folgte.

Das Abbauverhalten der Ausgangsverbindung TAHNDS $_{DP1}$  für die möglichen Autooxidationsund Hydrolyseprodukte TAHNDS $_{DP2-4}$  wird hier nicht weiter diskutiert. Ihr Nachweis ist im anaeroben Bioreaktor nur bei einem entsprechenden Redoxpotential und mit Online-Analytik

möglich. Bei der Korrelation von relativer Detektionsintensität und Redoxpotential zeigte sich eine Bestätigung für den Schwellenwert von – 200 bis -250 mV, unterhalb dessen die vollständige Reduktion von Reactive Black zu TAHNDS<sub>DP1</sub> beobachtet wurde (siehe Abbildung 80 links). Im oxidativen Bereich war TAHNDS<sub>DP1</sub> nicht mehr nachzuweisen.

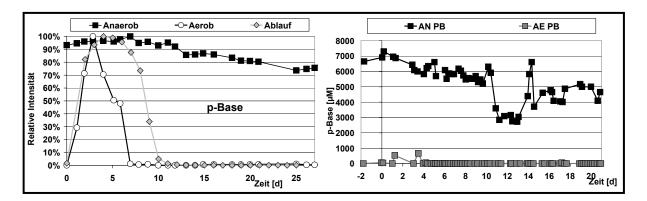


Abbildung 78: Stoffspezifisches halbquantitatives Monitoring des anaeroben Bioreaktors: (links) Offline bestimmte Peakfläche p-Base bei einer Raumbelastung von 0.8-1.6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; (rechts) Online bestimmter Konzentrationsverlauf von p-Base (PB) bei einer Raumbelastung von 0.5-1.5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> im anaeroben (AN) und aeroben (AE) Bioreaktor

Der relative Konzentrationsverlauf des ersten Folgeproduktes TAHNDS $_{DP2}$  ist in Abbildung 79 (rechts) für die beiden Bioreaktoren und den Ablauf in einer Versuchsreihe mit einer Raumbelastung von  $0.38-1.78~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$  dargestellt. Nach einer Betriebsdauer von 12 Tagen trat im anaeroben Bioreaktor ein deutlicher Konzentrationssprung auf, der in Folge auch im aeroben Bioreaktor und zeitversetzt im Ablauf nachzuweisen war. Durch das Verhältnis der detektierten Peakflächen im anaeroben und aeroben Bioreaktor ist eine Abbaubarkeit von TAHNDS $_{DP2}$  nachvollziehbar, wobei die mögliche Bildung von Folgeprodukten zu berücksichtigen ist.

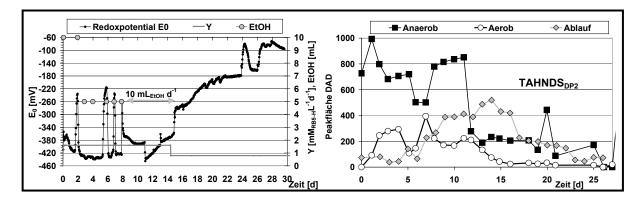


Abbildung 79: Stoffspezifisches Monitoring des anaeroben und aeroben Bioreaktors bei einer Raumbelastung von  $0.8-1.6~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$  sowie des Ablaufes (offline): (links) Summenparameter; (rechts) Verlauf der relativen Intensität von TAHNDS<sub>DP2</sub> im anaeroben und aeroben Bioreaktor sowie im Ablauf (DAD Messung)

Die relative Konzentration von TAHNDS $_{DP2}$  korreliert im anaeroben Bioreaktor positiv mit dem Redoxpotential, d.h sie steigt mit dem Redoxpotential. Bei der Betrachtung der Korrelation (siehe Abbildung 80 links) ist zu berücksichtigen, dass es das Folgeprodukt der Hydrolyse von TAHNDS $_{DP1}$  ist. Folgt auf eine Phase mit niedrigem Redoxpotential eine mit hohem Redoxpotential, dann findet unter Hydrolyse die Umwandlung von TAHNDS $_{DP1}$  in

 $\mathsf{TAHNDS}_{\mathsf{DP2}}$  statt, die irreversibel ist. Neben dem Bereich des Schwellenwertes von –250 mV ist eine Clusterbildung zu beobachten, die auf darauf hindeutet, dass  $\mathsf{TAHNDS}_{\mathsf{DP2}}$  bei kontinuierlichem Zulauf von Farbstoff in diesem Bereich eine konstante Konzentration erreicht.

Im aeroben Bioreaktor sank mit dem Redoxpotential die relative Intensität (rechte Darstellung), die aber immer einen Restwert von 10% behielt. Die Korrelation der relativen Intensität mit dem Sauerstoffgehalt des aeroben Bioreaktors ist in Abbildung 81 dargestellt. Sie zeigt, dass die niedrigsten Werte bei einer Sauerstoffkonzentration von 10-11 g L<sup>-1</sup> nachgewiesen werden konnten. Die Überprüfung der Korrelation von Redoxpotential und Sauerstoffkonzentration ergab keinen Zusammenhang. Eine hohe Sauerstoffsättigung sowie ein Redoxpotential von >100 mV scheint den Abbau von TAHNDS<sub>DP2</sub> zu begünstigen. Das Monitoring der beiden weiteren potentiellen Folgeprodukte durch Hydrolyse der Imingruppen sollte zeigen, ob diese mit dem Abbau von TAHNDS<sub>DP2</sub> im Zusammenhang stehen.

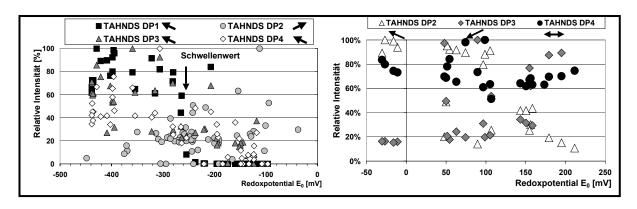
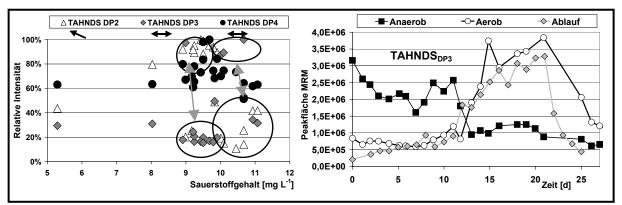


Abbildung 80: Korrelation von Redoxpotential und der relativen MS-Detektionsintensität von TAHNDS<sub>DP1-4</sub>: (links) Raumbelastung 0.38 - 1.78 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> im anaeroben Bioreaktor; (rechts) Raumbelastung 0.8 - 1.6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> im aeroben Bioreaktor

Beim direkten Vergleich des Verlaufs von TAHNDS<sub>DP3</sub> (Abbildung 81 rechts) und TAHNDS<sub>DP2</sub> (Abbildung 79 rechts) zeigten beide Verbindungen im anaeroben Bioreaktor einen ähnlichen Verlauf. Im aeroben Reaktor war nach dem Absinken der Intensität im anaeroben Bioreaktor (10.-11. Tag) eine Zunahme der Intensität bis zum 21. Tag zu beobachten, die am 25. Tag wieder auf das Ausgangsniveau absank. Eine völlig Abnahme der Intensität war an keiner der drei Messstellen zu beobachten. Die Korrelation der Konzentration mit dem Redoxpotential im anaeroben Bioreaktor (Abbildung 80 links) zeigt bei TAHNDS<sub>DP3</sub> ähnlich wie bei TAHNDS<sub>DP1</sub> eine Zunahme der Konzentration unterhalb des Schwellenwertes. Daher muss TAHNDS<sub>DP3</sub> nicht notwendigerweise ein Folgeprodukt der Hydrolyse von TAHNDS<sub>DP2</sub> im anaeroben Bioreaktor sein, sondern könnte wie TAHNDS<sub>DP1</sub> ein Folgeprodukt einer Azoreduktion darstellen. Im Vergleich zu TAHNDS<sub>DP1</sub> ist es stabiler und lässt sich auch bei höheren Redoxpotentialen nachweisen, wie die Darstellung der Korrelation von Redoxpotential und Intensität in Abbildung 81 (rechts) des aeroben Bioreaktors belegt. Hier verhielt sich die Intensität von TAHNDS<sub>DP3</sub> oberhalb von 100 mV proportional zum Redoxpotential, wohingegen TAHNDS<sub>DP2</sub> mit steigendem Redoxpotential abnahm.

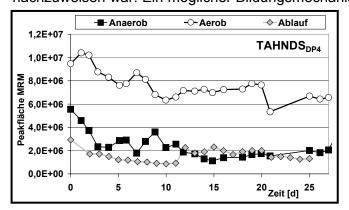
Der Vergleich der Peakflächen während der Versuchsreihe zeigt, dass TAHNDS $_{DP3}$  im aeroben Bioreaktor ab dem 11. Tag zunahm, am 21. Tag ein Maximum erreichte und wieder auf das Niveau des 11. Tages abfiel. Analog sank im aeroben Bioreaktor die Intensität von TAHNDS $_{DP2}$  zwischen dem 11. und 21. Tag. Die Annahme, dass TAHNDS $_{DP2}$  als Folgeprodukt der weiteren Hydrolyse TAHNDS $_{DP3}$  bildet, wird gestützt durch das Verhalten beider Verbindungen im aeroben Reaktor und durch die entgegengesetzte Korrelation mit dem Redoxpotential. Einen weiteren Hinweis liefert die Betrachtung der Korrelation mit dem Sauerstoffgehalt in Abbildung 81 (links). Hier bilden sich zwischen 9-10 mg $_{O2}$  L $^{-1}$  zwei

gegenüberliegende Cluster mit TAHNDS $_{DP2}$  und TAHNDS $_{DP3}$  aus (siehe Markierungen), die sich zwischen 10-11 mg $_{O2}$  L $^{-1}$  umkehren. Der zweite Cluster ist bedingt durch die Anzahl der Datenpunkte weniger stark ausgebildet. Vor diesem Hintergrund ist die tendenzielle Abnahme von TAHNDS $_{DP3}$  im anaeroben Bioreaktor bei steigendem Redoxpotential im negativen Bereich anderen Effekten zu zuordnen.



Sauerstoffgehalt Abbilduna 81: (links) Korrelation des mit der relativen Detektionsintensität von TAHNDS<sub>DP2-4</sub> im aeroben Bioreaktor; (rechts) Stoffspezifisches Monitoring von TAHNDS<sub>DP3</sub> im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von 0,8 – 1,6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sowie des Ablaufes (offline)Abbildung 82 beschreibt die Verläufe der Intensität von TAHNDS<sub>DP4</sub> im anaeroben und aeroben Bioreaktor sowie dem Ablauf, wobei im aeroben Bioreaktor die höchsten Intensitäten nachgewiesen werden konnten. Aus dem Verhältnis der Konzentration im aeroben Bioreaktor zu der im Ablauf errechnet sich für die eingesetzte Ultrafiltrationsmembran eine mittlere Rückhaltung von 80 % für TAHNDS<sub>DP4</sub>. Demnach ist die Ursache für die erhöhte Konzentration im aeroben Bioreaktor auf die membranverursachte Akkumulierung von TAHNDS<sub>DP4</sub> zurückzuführen.

Aus mechanistischer Sicht lässt sich dieser Anstieg nicht aus der zu erwartenden Hydrolyse von beispielsweise TAHNDS<sub>DP3</sub> ableiten. Aus der Verteilung der höchsten Intensitäten von TAHNDS<sub>DP4</sub> in der Korrelation mit dem Redoxpotential in Abbildung 80 (links) geht hervor, dass es im anaeroben Bioreaktor unterhalb von -300 mV mit erhöhter Intensität nachzuweisen war. Ein möglicher Bildungsmechanismus in Analogie zu TAHNDS<sub>DP1</sub> schließt



sich aufgrund der nicht vorhandenen Aminobzw. Imingruppen Strukturvorschlag für TAHNDS<sub>DP4</sub> aus. Die Korrelation mit dem Redoxpotential auch dem Sauerstoffgehalt im aeroben Bioreaktor ergab keinen signifikanten Zusammenhang (siehe Abbildung 80 und Abbildung 81). Der Bildungsmechanismus von TAHNDS<sub>DP4</sub> kann daher nicht genau aufgezeigt werden.

Abbildung 82: Stoffspezifisches Monitoring von TAHNDS<sub>DP4</sub> im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von  $0.8 - 1.6 \text{ mM}_{RB5-H} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$  sowie des Ablaufes (offline)

#### 6.1.3.3 Nicht farbige Farbstoffnebenkomponenten

Für die Synthesenebenprodukte der p-Base, die im Abwasser nachgewiesen wurden, sind bislang keine Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit bekannt. Durch die Strukturunterschiede der p-Base-Derivate lassen sich Rückschlüsse auf die Vorraussetzungen für eine aerobe Abbaubarkeit machen.

N-Acetyl-p-Base (NAPB) erwies sich im Vergleich zu p-Base als noch schneller abbaubar (siehe Abbildung 83 links), wobei die Zulaufkonzentration zum aeroben Bioreaktor maximal 250  $\mu$ M betrug (im Vergleich p-Base 7000  $\mu$ M). Der in Abbildung 74 (siehe Seite 129) dokumentierte Effekt des oxidativen Abbaus von p-Base im anaeroben Bioreaktor, der aus den Anstieg des Redoxpotentials in den positiven Bereich resultierte, war auch für N-Acetyl-p-Base nachweisbar. Mit dem Abfallen des Redoxpotentials in den negativen Bereich ab dem 17. Tag stieg die Konzentration von N-Acetyl-p-Base wieder auf eine Konzentration von 50  $\mu$ M an.

Die Korrelation verschiedener p-Base-Derivate mit dem Redoxpotential ist in Abbildung 84 dargestellt. Hier ergibt sich wie im anaeroben Bioreaktor eine Schwellenwert, oberhalb dessen die untersuchten Verbindungen nicht oder nur mit geringer Intensität nachzuweisen waren. Dieser Wert liegt bei +100 mV und wurde auch bei TAHNDS $_{DP2}$  als ein Schwellenwert beobachtet, oberhalb dessen die Intensität im aeroben Bioreaktor sank (Vergleiche Abbildung 80, Seite 135). Zwei der beobachteten Verbindungen sind am aromatischen Ring mit einer Sulfonsäuregruppe substituiert (Sulfanilsäure, p-Base-Sulfonsäure — PBSA), wodurch belegt wird, dass ein Abbau sulfonierter aromatischer Verbindungen mit einer Belebtschlamm-Mischkultur möglich war. Die Korrelation mit dem Sauerstoffgehalt zeigt wie bei den TAHNDS-Verbindungen einen "Cluster-Bereich" bei 9 -10 mg $_{O2}$  L $^{-1}$  auf, unterhalb und oberhalb dessen keine der Verbindungen mit höheren Intensitäten nachweisbar war.

Eine der sulfonierten Verbindungen ist Amino-(2-hydroxy-ethansulfonyl)-benzenesulfonsäure (p-Base-Sulfonsäure – PBSA). Das stoffspezifische Monitoring dieser Verbindung belegt, dass p-Base-Sulfonsäure wie p-Base und N-Acetyl-p-Base nach einer kurzen Adaptionsphase im aeroben Bioreaktor nicht mehr nachzuweisen war (siehe Abbildung 83 rechts).

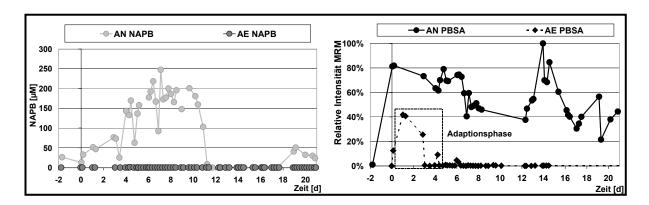


Abbildung 83: Online bestimmter Konzentrationsverlauf bei einer Raumbelastung von  $0.5 - 1.5 \text{ mM}_{RB5-H} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$  im anaeroben (AN) und aeroben (AE) Bioreaktor: (links) absoluter Konzentrationsverlauf von N-Acetyl-p-Base (NAPB); (rechts) Relativer Konzentrationsverlauf von p-Base-sulfonsäure (PBSA)

Im Vergleich zu p-Base-Sulfonsäure ist die Sulfonsäuregruppe bei 2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethansulfonsäure (ABSESA, siehe Abbildung 85) am Alkylrest substituiert. Die Position der Sulfonsäuregruppe war beim Abbau dieser Verbindung nicht entscheidend, wie der Verlauf der relativen Intensität im aeroben Bioreaktor belegt. ABSESA wurde insgesamt im Vergleich zu den anderen sulfonierten p-Base-Derivaten etwas langsamer abgebaut.

### Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

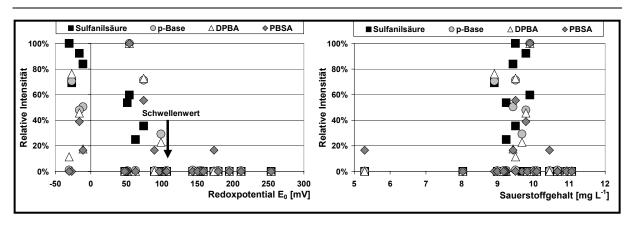


Abbildung 84: Korrelation der relativen MS-Detektionsintensität von Sulfanilsäure, p-Base, Di-p-Base-Amin (DPBA) und p-Base-Sulfonsäure (PBSA) im aeroben Bioreaktor mit (links) dem Redoxpotential und (rechts) dem Sauerstoffgehalt

Die Verbindung 2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethoxy]-ethansulfonsäure (ABSEESA), bei der die Sulfonsäuregruppe am verlängerten Alkylrest lokalisiert ist, reichert sich wie TAHNDS<sub>DP4</sub> durch Retention an der Ultrafiltrationsmembran im aeroben Bioreaktor an (siehe Abbildung 85, rechts). Ab dem 16. Betriebstag war eine abnehmende Tendenz der relativen Konzentration zu beobachten, die auf eine langsame Adaption der aeroben Mischkultur hindeutet. Der Abbau von ABSEESA konnte nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu ABSESA hat die Alkylkettenlänge durch die Etherbindung einen hemmenden Einfluss auf die Abbaubarkeit. Der Verlauf der relativen Intensität im anaeroben Bioreaktor zeigt für beide Verbindungen eine abnehmende Tendenz, die bei ABSESA auf die geringere Freisetzung durch unvollständige Reduktion und bei ABSEESA auf einen Verdünnungseffekt durch eine geringer Zulaufkonzentration zurückzuführen war. Bei ABSEESA stellte sich nach der Anfahrphase eine relativ konstante Konzentration ein, die unabhängig vom steigenden Redoxpotential ab dem 12. Betriebstag war.

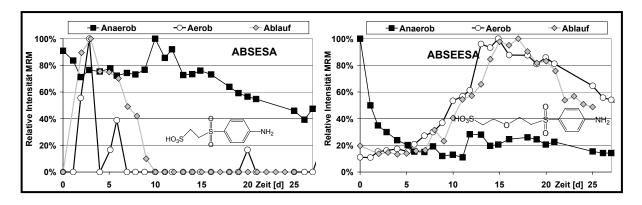


Abbildung 85: Stoffspezifisches Monitoring im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von  $0.8-1.6~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$  sowie des Ablaufes (offline) (links) ABSESA (rechts) ABSESA

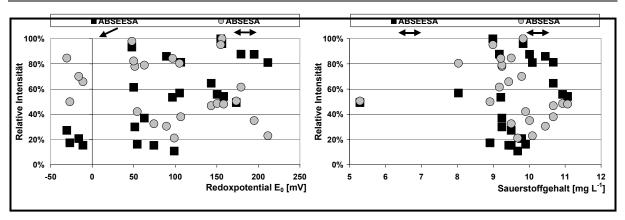
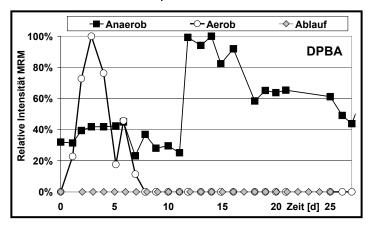


Abbildung 86: Korrelation der relativen MS-Detektionsintensität von Sulfanilsäure, p-Base, Di-p-Base-Amin (DPBA) und p-Base-Sulfonsäure (PBSA) im aeroben Bioreaktor mit (links) dem Redoxpotential und (rechts) dem Sauerstoffgehalt

Die Korrelation von ABSESA mit dem Redoxpotential im aeroben Bioreaktor in Abbildung 86 (links) deckt sich nicht mit der bei abbaubaren p-Base-Derivaten beobachteten typischen Verteilung. Die Messpunkte sind über den gesamten Redoxpotentialbereich relativ gleich verteilt, so dass keine Schwellenwert abgeleitet werden kann. Auch bei der Korrelation gegen den Sauerstoffgehalt ist keine signifikanten Verteilung zu erkennen. Der Abbaumechanismus wird folglich nicht von einem der beiden Summenparameter wesentlich beeinflusst, wie es bei p-Base-Sulfonsäure zu beobachten war.



Aus der Korrelation von ABSEESA mit dem Redoxpotential erkennen, dass die hohen Intensitätswerte mit einem hohen Redoxpotential korrelieren. Durch Akkumulierung dieser Verbindungen das leichte Absinken relativen Konzentration ab dem 16. Betriebstag ist die Ableitung von Mechanismen aus dieser Korrelation schwieriger als bei den wenig bzw. nicht retenierten p-Base-Derivaten.

Abbildung 87: Stoffspezifisches Monitoring von DPBA im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von 0,8 – 1,6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sowie des Ablaufes (offline)

Auch ABSEESA zeigt in Bezug auf die Sauerstoffkonzentration keine auffällige Verteilung der Intensitätswerte. Insgesamt sind sie bei Sauerstoffgehalten von über 10  $mg_{O2}$  L<sup>-1</sup> höher als bei niedrigeren Werten.

Der Abbau von Di-p-Base-Amin (DPBA) entwickelte sich im aeroben Bioreaktor mit einer Adaptionszeit von ca. 3 Tagen vergleichbar mit dem der Mono-p-Base-Derivate (siehe Abbildung 87), was durch die bereits beschrieben Korrelation mit dem Redoxpotential und Sauerstoffgehalt gut abbaubarer p-Base-Derivate bestätigt wurde. Im anaeroben Reaktor ist am 11. Betriebstag eine Verdopplung der DPBA-Konzentration zu beobachten, die auf einen Wechsel der Abwassercharge zurückzuführen ist.

Durch die Verwendung von Stellmitteln im Farbstoff konnten sulfonierte Naphthalinverbindungen im Hydrolysat nachgewiesen werden. Bei der Abwasserbehandlung wurden sie mit den hydrolysierten Farbstoffen den Bioreaktoren zugeführt. Diese vielfach im Ablauf von Kläranlagen nachgewiesen Substanzen gelten je nach Isomer als schwer abbaubar [214]. Neben der Mono-Naphthalinsulfonsäure (NSA) wurden mehrere Isomere der

Naphthalindisulfonsäure (NDSA) nachgewiesen, wobei bei keiner dieser Verbindung eine genaueren Analyse zur Bestimmung Stellung der Sulfonsäuregruppen durchgeführt wurde.

In Abbildung 88 ist der Verlauf der intensivsten Isomere von Mono-Naphthalinsulfonsäure und Naphthalindisulfonsäure in den Stufen des Behandlungsverfahrens dargestellt. Die linke Darstellung zeigt die Entwicklung der Mono-Naphthalinsulfonsäure im anaeroben Bioreaktor. Die lineare Zunahme ergibt sich aus der kontinuierlichen Zugabe des Abwassers in den anaeroben Bioreaktor. Im aeroben Reaktor ist Mono-Naphthalinsulfonsäure in den ersten zehn Tagen nur partiell in geringen Konzentration nachweisbar, woraus sich eine gute Abbaubarkeit unter oxidativen Bedingungen ableiten lässt, die auch in anderen Untersuchungen von Naphthalinsulfonsäure-Isomeren in kommunalen Kläranlagen beobachtet wurden [257]. Nach dem 17. Betriebstag sinkt ihr Gehalt im Ablauf auf null.

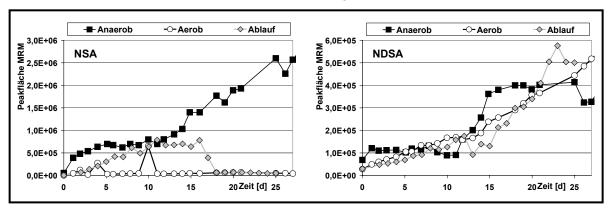


Abbildung 88: Stoffspezifisches Monitoring im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von  $0.8 - 1.6 \text{ mM}_{RB5-H} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  sowie des Ablaufes (offline) (links) von Mono-Naphthalinsulfonsäure (NSA); (rechts) von Naphthalindisulfonsäure (NDSA)

Die Ursache für die verzögerte Nachweisbarkeit einzelner Verbindungen im Ablauf, die im aeroben Bioreaktor nicht mehr nachzuweisen sind, ist nicht genau aufgeklärt und wird auf den Puffereffekt des Behälters B400 zurückgeführt.

In der Korrelation mit dem Redoxpotential ist eine leichte Tendenz zu höheren Intensitäten bei höheren Redoxpotentialen im aeroben Bioreaktor zu erkennen (Abbildung 89 links). Sie wird ergänzt durch die positive Korrelation der Intensitäten zum Sauerstoffgehalt in der rechten Darstellung in Abbildung 89. Die Betriebsparameter der oxidativen Stufe, unter denen eine optimaler Abbau der Mono-Naphthalinsulfonsäure beobachtet wurde, decken sich mit denen für gut abbaubare p-Base-Derivate.

Die rechte Darstellung in Abbildung 88 zeigt, dass die Substitution mit einer zweiten Sulfonsäuregruppe die Nichtabbaubarkeit dieser Naphthalindisulfonsäure bewirkte. In allen drei untersuchten Messstellen war bis zum 15. Betriebstag ein kontinuierlicher Anstieg der detektierten Intensität zu verzeichnen, der im anaeroben Bioreaktor nachfolgend etwas abflachte. Es wird angenommen, dass sich im anaeroben Bioreaktor die Zulaufkonzentration der Naphthalindisulfonsäure eingestellt hatte. Die Entwicklung der Intensität im aeroben Bioreaktor und die Korrelation mit dem Redoxpotential belegen, dass die Naphthalindisulfonsäure nicht abgebaut wurde. Wie die Mono-Naphthalinsulfonsäure gibt es eine positive Korrelation mit dem Sauerstoffgehalt, die aber in Zusammenhang mit den anderen Beobachtungen keinen positiven Schluss bezüglich einer Abbaubarkeit zulässt. Untersuchungen an Naphthalindisulfonsäure-Isomeren (NDSA) zeigten, dass die 1,5-NDSA und 2,7-NDSA Stellungsisomere eine mittlere Elimination von 9 bzw. 31 % aufwiesen [257].

Da die Bestimmung der Position der Sulfonsäuregruppen nicht durchgeführt werden konnte, ist eine verallgemeinernde Ableitung der Abbaubarkeit von Naphthalinmono- und disulfonsäuren nicht möglich. Untersuchungen von Stüber zeigte, dass bevorzugt die 1,6- und 2,6-Naphthalinsulfonsäuren in aeroben Behandlungsstufen abgebaut werden [257].

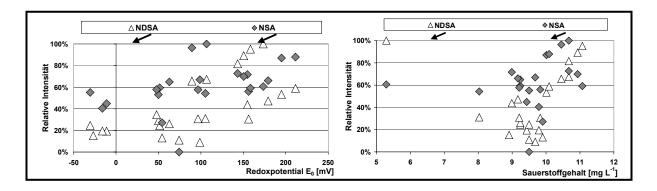


Abbildung 89: Korrelation der relativen MS-Detektionsintensität von Mono-Naphthalinsulfonsäure (NSA) und Naphthalindisulfonsäure (NDSA) im aeroben Bioreaktor mit dem Redoxpotential (links) und dem Sauerstoffgehalt (rechts)

#### 6.1.3.4 Unbekannte Verbindungen

Die beiden unbekannten Verbindungen UNK371 und UNK373 wurden in Kapitel 6.1.1.5 (Seite 124) als mögliche Reduktionsprodukte des auf 4,5-Dihydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure basierten Diazofarbstoffes diskutiert. Dem liegt die Annahme zu Grunde, dass es unter bestimmten Bedingungen im anaeroben Bioreaktor zu einer Spaltung der C-N-Bindung an der Azogruppe in ortho-Position zur Hydroxygruppe kommen kann. Als Reaktionsprodukt entständen  $\alpha$ -Diazoketone, die im weiteren unter Wolff-Umlagerung die Diazogruppe als  $N_2$  abgeben könnten oder durch Protonierung zu den reaktiven Diazoniumkomponenten reagieren.

#### Stoffspezifisches Monitoring und Korrelation mit Summenparametern

Das stoffspezifische Monitoring der Verbindungen UNK371 und UNK373 ist für eine Versuchsreihe in Abbildung 90 dargestellt. Die Intensitäten im anaeroben Bioreaktor überstiegen die im aeroben Bioreaktor gemessenen jeweils um den Faktor 10 - 30. Auffällig ist beim Monitoring von UNK371 und UNK373, dass ihre Intensitäten mit Anstieg des Redoxpotentials zunahmen. Im aeroben war UNK371 nur partiell nachweisbar, wobei die gemessenen Intensitäten im Bereich der Nachweisgrenze lagen. Der Nachweis von UNK371 im Ablauf lag im gleichen niedrigen Bereich, war aber über den Verlauf der gesamten Messreihe möglich. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur der aus dem Verlauf im anaeroben und aerobe Bioreaktor abgeleiteten Annahme, dass UNK371 im positiven Bereich des Redoxpotentials instabil ist.

Als Schwellenwert für die Bildung von UNK371 kann in der linken Darstellung in Abbildung 91 ein Wert von –220 bis -200 mV ermittelt werden, oberhalb dessen die Bildung von UNK371 einsetzt. Im aeroben Bioreaktor war UNK371 oberhalb von 100 mV nur mit sehr geringer Intensität nachzuweisen. Die Bildung der Verbindung UNK373 ließ sich keinem Schwellenwert zuordnen. Die Intensität korrelierte im anaeroben Bioreaktor wie bei UNK371 mit dem Redoxpotential.

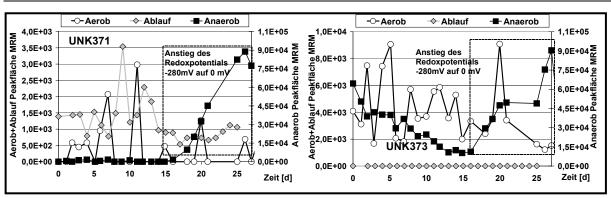


Abbildung 90: Stoffspezifisches Monitoring im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei einer Raumbelastung von  $0.8-1.6~\text{mM}_{\text{RB5-H}}~\text{L}^{-1}~\text{d}^{-1}$  sowie des Ablaufes (offline): (links) von UNK371; (rechts) von UNK373

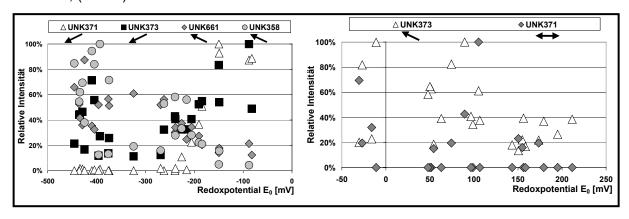


Abbildung 91: Korrelation von Redoxpotential und der relativen MS-Detektionsintensität von unbekannten Verbindungen. Links: UNK371, UNK373, UNK661 und UNK358 im anaeroben Bioreaktor; rechts: UNK371, UNK373 im aeroben Bioreaktor

Auch im aeroben Bioreaktor waren unterhalb von +100 mV die höchsten Intensitäten zu beobachten. Beide unbekannte Verbindungen wiesen tendenziell eine höhere Intensität im Bereich von 9 –  $10 \text{ mg}_{O2} \text{ L}^{-1}$  im aeroben Bioreaktor auf (siehe Abbildung 92). Das Monitoring und die Korrelationen zeigen, dass die Bildung von UNK371 mit dem Ansteigen des Redoxpotentials oberhalb des Schwellenwertes von -250 mV einsetzte. Damit einher geht der Anstieg der Konzentration von TAHNDS<sub>DP2</sub> gebildet aus TAHNDS<sub>DP1</sub>. Der mögliche Bildungsmechanismus und mögliche Strukturen der beiden Verbindungen werden in Kapitel 6.1.4.1 (Seite 143) fortgeführt.

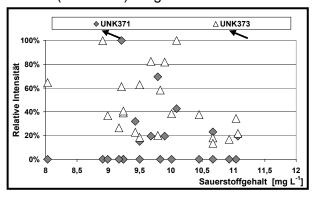


Abbildung 92: Korrelation der relativen MS-Detektionsintensität UNK371 und UNK373 im aeroben Bioreaktor mit dem Sauerstoffgehalt

#### 6.1.4 Entfärbungsmechanismus und Abbauwege von Reactive Black 5

Die in früheren Arbeiten vorgeschlagenen Mechanismen zur anaeroben Behandlung von Reactive Black 5 gehen davon aus, dass der Azofarbstoff als terminaler Elektronenakzeptor durch Reduktion der chromophoren Azobindungen entfärbt wird. Die von Libra et al. und Kudlich beschrieben Hauptreduktionsprodukte wie p-Base und TAHDND<sub>DP2</sub> stimmen mit den in dieser Arbeit identfizierten Verbindungen überein [15], [201].

#### 6.1.4.1 Entfärbungsmechanismen der anaeroben Reduktion

In der vorliegenden Arbeit konnten die der Entfärbung zu Grunde liegenden Mechanismen während des kontinuierlichen Abwasserbehandlungsprozesses mittels Online-Monitoring beobachtet werden. Unter der Annahme, dass die Stoffkonzentration proportional zur integrierten Peakfläche des Dioden-Array- oder Massenspektrometersignals war, wurden die stoffspezifischen Konzentrationsverläufe von Farbstoffen und Nebenverbindungen mit Prozesssummenparametern korreliert. Aus diesen Beobachtung lassen sich Bedingungen ableiten, unter denen bestimmte Verbindungen entstehen oder abgebaut werden. Die möglichen Mechanismen, die zu einer Entfärbung des Diazofarbstoffes Reactive Black 5 führen sind in Abbildung 93 dargestellt.

Als Hauptabbaumechanismus kann die zweistufige Reduktion der Azobindungen des Farbstoffes beschrieben werden, bei der die Spaltung der ortho-Aminoazobindung bevorzugt wird. Die vorliegende Untersuchung bestätigt analytisch erstmalig den vorgeschlagenen Abbaumechanismus, nach dem Reactive Black 5 in einer zweistufigen Reduktion entfärbt wird [264]-[266]. Es handelt sich hierbei um eine zwei-Elektronen-Reduktion, die bei einem Redoxpotential im Bereich -100 bis -250 mV zu beobachten war. Geht man davon aus, dass die erste Stufe der Reduktion durch die Übertragung der Reduktionsäguivalenten von Chinon-Hydrochinon-basierten Redoxmediatoren erfolgt, dann läuft sie in dem von Rau angeführten optimalen Redoxpotential-Fenster von -50 bis -250 mV ab [102]. Die obere Grenze wird hierbei durch die Geschwindigkeit der abiotischen Azofarbstoffreduktion durch das Hydrochinon, die untere Grenze durch die enzymatische Reduktion des Chinons begrenzt [102]. Als Voraussetzung für die Reduktion der Azobindung des teilreduzierten Farbstoffes wurde ein deutlich niedriges Redoxpotential von -250 bis 400 mV beobachtet, das nachweislich zu einer Verringerung der Zeitkonstante des Abbaus führt. Diese ist auf die höhere Stabilität der teilreduzierten Form RB5-H -PB zurückzuführen bzw. ein niedrigeres Normalpotenial dieser Verbindungen im Vergleich zu dem nicht reduzierten Farbstoff [267].

Unter zwei-Elektronen-Reduktion erfolgt die Bildung der instabilen Form des TAHNDS, das unmittelbar zu TAHNDS<sub>DP1</sub> reagiert. TAHNDS konnte analytisch nicht nachgewiesen werden. Einen Hinweis auf die instabile Übergangsform gibt der farbliche Umschlag der Flüssigkeit im Bioreaktor, die bei Redoxpotential im Bereich von –400 mV von blau zu gelb wechselte. Bei den Online-HPLC-DAD-Messungen ließ sich jedoch keine Verbindungen identifizieren, die eine intensive gelbe Farbigkeit verursachte.

Die der Bildung von TAHNDS<sub>DP1</sub> vorausgehende Autooxidation könnte zu der so genannten "Autokatalyse" gerechnet werden, die von Van der Zee an 1-Imino-1,2-naphthochinon beschrieben wurde [110]. Bei der Reduktion einer ortho-Hydroxyazobindung wird ein ortho-Aminohydroxynaphthalin gebildeten, dem die Funktion eines Redoxmediators zugeschrieben wird. Der Mechanismus der Autooxidation von TAHNDS würde keine der von Rau in diesem Zusammenhang beschriebenen Aktivierung von ortho-Ketoiminen durch Reaktion mit z.B. Sulfid erfordern, da bei Autooxidation der beiden Amine zu Iminen keine Aktivierung durch eine vorhergehende Reduktion notwendig wäre [102]. Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis der Verbindung RB5-H –PB-2Hb, bei der die Autooxidation bereits am teilreduzierten Farbstoff beobachtet werden konnte. Diese ist in einem Nebenmechanismus in Abbildung 93 beschrieben.

In einem dritten Mechanismus wird angenommen, dass sich bei einer zwei-Elektronen-Übertragung an den tautomeren Azofarbstoffform aus der ortho-Hydroxyazobindung die Hydrazoform ausbildet, die in einer Disproportionierungsreaktion zu RB5-H -PB-2Ha reagiert. Diese wird weiter reduziert zu RB5-H-PB und in Folge zu TAHNDS bzw. TAHNDS<sub>DP1</sub>. Ein Nachweis für die potentielle Reduktion von RB5-H –PB-2Ha zu 3,4,6-Triimino-5-oxo-3,4,5,6-tetrahydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure konnte nicht beobachtet werden. Hierbei müsste sich ein Molekül mit m/z 344 nachweisen lassen. Bei den beschrieben Reduktionsstufen der Mechanismen werden Endprodukte als Diazofarbstoffmolekül jeweils ein Molekül TAHNDS<sub>DP1</sub> und zwei Moleküle p-Base freigesetzt.

Abbildung 93: Identifizierte Mechanismen zur zweistufigen anaerobe Reduktion des hydrolysierten Reactive Black 5 Diazofarbstoffes (RM = Redoxmediator)

Analog zu den hier beschriebenen Mechanismen der Reduktion des hydrolysierten Diazofarbstoffes wurden die verschiedenen Nebenfarbstoffe reduziert. Als Derivate der p-Base konnten im anaeroben Bioreaktor Vinyl-p-Base, Di-p-Base-Ether und p-Base-Sulfonsäure als Reduktionsprodukte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 94). Die unterschiedlichen p-Base-Derivate hatten keinen Einfluss auf den Mechanismus der Reduktion, was die sich untereinander deckenden Korrelationen mit dem Redoxpotential belegen.

Abbildung 94: Freisetzung von p-Base-Derivaten durch Reduktion von Nebenfarbstoffen

In Kapitel 6.1.1.5 (Seite 124) und 6.1.3.4 (Seite 141) wurden mögliche Strukturen und Mechanismen zur Bildung unbekannter Abbauprodukte mit der Bezeichnung UNK343, UNK371 und UNK373 diskutiert, die einen möglichen vierten Mechanismus zur Entfärbung des Diazofarbstoffes beschreiben. Hierbei erfolgt die Spaltung des Farbstoffes nicht an der N=N-Bindung, sondern wie bei der massenspektrometrischen Fragmentierung unter Azo-Typ-Spaltung der N-C-Bindung (siehe Abbildung 95).

Abbildung 95: Vorgeschlagener Bildungsmechanismus eines  $\alpha$ -Diazoketons aus der Spaltung der C-N-Bindung eines ortho-Hydroxyazofarbstoffes

Der Bildungsmechanismus steht nachweislich in Zusammenhang mit der Höhe des Redoxpotentials, wobei bei UNK371 erst ab einem Redoxpotenialschwellenwert von größer -250 mV (absolut) im anaeroben Bioreaktor nachweisbar war. Möglicherweise geht er wie im dritten beschriebenen Mechanismus auf eine Disproportionierungsreaktion zurück, bei der die tautomere Hydrazogruppe unter Protonenwanderung zur p-Base als Diazogruppe an der Kupplungskomponente verbleibt. In der Literatur fanden sich keine Hinweise auf einen derartigen Mechanismus zur Spaltung von Azoverbindungen. Bei der Übertragung von Protonen bei der Zwei-Elektronen Reduktion von UNK371 könnte als Folgeprodukt formal UNK373 entstanden sein. Als Strukturvorschlag ergäbe sich die in 3,6-Position zweifach diazotierte 4,5-Dihydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure mit m/z 373, die sich aus dem  $\alpha$ -Diazoketon Valenzisomer des [1,2,3]Oxadiazols ableitet, wobei durch die um zwei Atomeinheiten größere Masse formal die reduzierte Form als [1,2,3]Oxadiazolidin vorliegen müsste. Untersuchungen mit anderen Analysentechniken müssen zeigen, ob sich die vorgeschlagenen Strukturen bestätigen lassen können.

Im Oxidativen konnten beide Verbindungen nur mit sehr geringen Detektionsintensitäten bestimmt werden. Oberhalb eines Redoxpotentials von > +100 mV waren beide nur noch an der Nachweisgrenze detektierbar. Weitere Hinweise auf die Struktur UNK343 finden sich im Anhang. Die Verbindung UNK585 fragmentiert hier nach dreifacher Abspaltung von SO<sub>3</sub> zum Ion m/z 343.

### 6.1.4.2 Rückverfärbungsmechanismus durch Oxidation anaerober Reduktions-produkte

Der von Kudlich an ortho-Hydroxyazofarbstoffen beschriebene Mechanismus der Rückverfärbung nach Reduktion und anschließender Autooxidation konnte in dieser Arbeit durch den Nachweis des autooxidationsempfindlichen Reduktionsproduktes TAHNDS $_{\rm DP1}$  bestätigt werden [201], [260]. Durch den Einsatz des online-analytischen Verfahrens war es erstmalig möglich, TAHNDS $_{\rm DP1}$  massenspektrometrisch zu erfassen und durch kollisionsinduzierte Fragmentierung zu charakterisieren. Mit Hilfe der Fragmentierungsmuster der hochsubstituierten TAHNDS $_{\rm DP1-4}$ -Verbindungen konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von N-

haltigen Substituenden (HCN mit 27 u) zu Gunsten von O-haltigen Verbindungen (CO mit 28 u) abnimmt. Damit wird der vorgeschlagene Hydrolysemechanismus von 6-Amino-5-hydroxy-3,4-diimino-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS<sub>DP1</sub>) zu 4,6-Dihydroxy-3,5-dioxo-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure bzw. 5,6-Dihydroxy-3,4-dioxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS<sub>DP4</sub>) begründet.

Im kontinuierlichen Betrieb des anaerob-aeroben Verfahrens wurde in Folge auch das Hydrolyseprodukt TAHNDS $_{DP2}$  nachgewiesen. Aus der stoffspezifischen Überwachung des aeroben Bioreaktors wurde die Bildung eines weiteren Hydrolyseproduktes, TAHNDS $_{DP3}$ , nachgewiesen, das sich wahrscheinlich aus TAHNDS $_{DP2}$  unter oxidativen Bedingungen bildet. Abbildung 96 zeigt noch ein weiteres Intermediat, das sich formal aus der Hydrolyse der letzten verbleibenden Imin-Gruppe ergibt. Für TAHNDS $_{DP4}$  konnte kein Zusammenhang mit dem Steigen oder Absinken der Intensität von TAHNDS $_{DP3}$  gefunden werden. Der Bildungsmechanismus kann daher auf einem anderen als dem Vorgeschlagenen ablaufen. Es wird angenommen, dass es sich bei den Verbindungen TAHNDS $_{DP3a}$  und TAHNDS $_{DP3b}$  sowie TAHNDS $_{DP4a}$  und TAHNDS $_{DP4b}$  jeweils um Positionsisomere handelt, deren Unterschiede im weiteren nicht diskutiert werden.

Abbildung 96: Vorgeschlagener Autooxidations- und Hydrolysebildungsmechansimus für TAHNDS $_{DP1-4}$  aus TAHNDS.

Die für ortho-Hydroxyazofarbstoffe beschriebene Rückverfärbung nach Kontakt mit Luftsauerstoff wird auch in anderen Untersuchungen bei verschiedenen Azofarbstoffen beobachtet [15], [110]-[112], [264]. Die Ergebnisse aus dieser Arbeiten unterstützten weitestgehend die Vermutung von Kudlich, worin die Rückverfärbung auf die Autooxidation und Hydrolyse von ortho-Aminohydroxynaphthalinderivate zurückzuführen ist [201], [260].

Eine andere Annahme geht von der Re-Oxidation von teilreduzierten Azoverbindungen aus. Hinweise auf eine Re-Oxidation einer unter reduktiven Bedingungen gebildeten Hydrazinform von Reactive Black 5, wie sie beim Azogruppen-haltigen Polymer PEA40 von Rau beobachtet wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden [102]. Der Nachweis von Ketoiminonaphthalin-Verbindungen bei einer Untersuchung zu aromatischen Sulfonaten in Abwässern und an Abläufen von Kläranlagen durch Storm sind ein weiterer Hinweis für die schlechte Abbaubarkeit dieser Verbindungen wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde [268].

UV-VIS-Spektren der in Abbildung 96 dargestellten Verbindungen sind in Abbildung 97 gezeigt. In Kapitel 0 (Seite 146) wird die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit in den einzelnen Reaktorstufen diskutiert.

#### 6.1.5 Stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit

Das stoffspezifische Monitoring der Haupt- und Nebenverbindungen im Abwasser und den einzelnen Reaktorstufen ermöglichte die weitestgehende Identifizierung der Verbindungen mittels Dioden-Array-Detektor und Massenspektrometer. Durch die Selektivität der beim Online-Monitoring eingesetzten chromatographischen Trennungsmethoden mit und ohne Ionenpaarreagenz war es möglich, aus dem Dioden-Array-Messungen die UV-VIS-Spektren einzelner Verbindungen zu isolieren.

### 6.1.5.1 Zuordnung von UV-VIS-Spektren farbiger Verbindungen aus HPLC-DAD-Messungen

Abbildung 97 zeigt die UV-VIS-Spektren von Verbindungen, die als Verursacher von Farbigkeit bzw. Restfarbigkeit eine Bedeutung haben. Bei der ersten Verbindung (von unten nach oben) handelt es sich um den originalen Farbstoff Reactive Black 5 (RB5-O) wie er in der Handelsware eingesetzt wird. Nachfolgend sind die Spektren der Vinylformen bzw. teilhydrolysierten Verbindungen des Farbstoffes bis zum Hydrolysat (RB5-H) aufgeführt. Die Spektren sind bis auf geringe Abweichungen, die durch die Spektrenbereinigung verursacht wurden, deckungsgleich und somit nur durch chromatographische Retentionszeitunterschiede mit Hilfe von Referenzsubstanzen oder der massenspektrometrischen Detektion zu unterscheiden. Das Spektrum des Farbstoffdimers, das bei einer Nebenreaktion bei der Hydrolyse über Etherbildung entsteht, ist mit der Bezeichnung Di-RB5-H-Ether Spektrum oben in der Abbildung 97 dargestellt. Auch bei dieser Verbindung ist eine große Ähnlichkeit zum Ausgangsfarbstoff zu beobachten.

Ein Produkt der Teilreduktion des hydrolysierten Farbstoffes, RB5-H –PB-2H, hat ein ähnliches Spektrum wie die als Nebenverbindungen der Handelsware beigemischten Verbindungen RB-OH und RB-NH<sub>2</sub>. Bei RB5-H –PB-2H ist im Vergleich zu der nicht autooxidierten Form RB5-H –PB das Absorptionsmaximum im farbigen Bereich um ca. 80 nm in den kurzwelligeren Bereich von blau nach rot verschoben. RB5-H –PB hat mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 550 nm hingegen eine noch deutlichere Blaufärbung. Die Verbindungen RB5-H –PB und RB5-H –PB+DPBE zeigen nahezu identische Spektren. Das Vorhandensein von p-Base oder Di-p-Base-Ether als hydrolysierte Reaktivgruppe hat somit einen geringen Einfluss auf die farbige Absorption.

Die Reaktionsprodukte der vollständigen Reduktion und nachfolgenden Autooxidation, TAHNDS $_{DP1-4}$ , absorbieren im gleichen farbigen Bereich wie der Reaktivfarbstoff. Bei den einzelnen Intermediaten sind Verschiebungen um bis zu 20 nm in den kurzwelligen Bereich wie bei TAHNDS $_{DP3}$  = 612 nm  $\rightarrow$  TAHNDS $_{DP4}$  = 593 nm zu beobachten. Die bei den massenspektrometrischen Untersuchungen beobachteten strukturellen Ähnlichkeiten der TAHNDS-Verbindungen werden durch ihre UV-VIS-Spektren bestätigt. Die Hydrolyse von TAHNDS $_{DP4}$  bis TAHNDS $_{DP4}$  geht einher mit einer tendenziellen Verschiebung vom blauen in den roten Bereich. Das Verhältnis von farbiger Absorption zu UV-Absorption verschiebt sich von TAHNDS $_{DP4}$  zu einer intensiveren Absorption im UV-Bereich. Sie verursacht die Zunahme der UV-Absorption in der aeroben Stufe und im Ablauf, wenn durch Hydrolyse mehr TAHNDS $_{DP4}$  als TAHNDS $_{DP2}$  vorliegt.

Bei den im anaeroben Bioreaktor nachgewiesenen unbekannten Verbindungen UNK661 und UNK373 zeigen beide Spektren keine Übereinstimmung mit einer der bekannten Verbindungen. UNK373 zeigt eine wenig intensive farbige Absorption bei etwa 600 nm. Die vorhandene Absorptionsbande bei 350 nm bestätigt, dass die vorgeschlagene Verbindung (siehe Kapitel 6.1.1.5) auf Naphthalin als Grundstruktur basiert, wie es bei den meisten der dargestellten Verbindungen zu beobachten ist. Aufgrund der Ko-Elution mit anderen Verbindungen, konnte von UNK371 kein Spektrum aus den Dioden-Array-Spektren isoliert werden.

UNK661 zeigt eine sehr starke Bande bei etwa 270 nm, die typisch für benzenbasierte aromatische Verbindungen ist und bei allen Derivaten der p-Base als Absorptionsmaximum gemessen wurde. Die naphthalin-typische Bande bei 350 nm ist weniger stark ausgeprägt. Bei 520 nm ist ein Maximum im farbigen Bereich zu beobachten, wodurch UNK661 wie auch die Begleitverbindungen RB-OH/NH<sub>2</sub> eine Rotfärbung besitzen. Eine strukturelle Interpretation dieser Verbindungen, die nach bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung vier SO<sub>3</sub>-Gruppen verlor (siehe Anhang), ist auch unter zu Hilfenahme der UVVIS-Spektren nicht möglich.

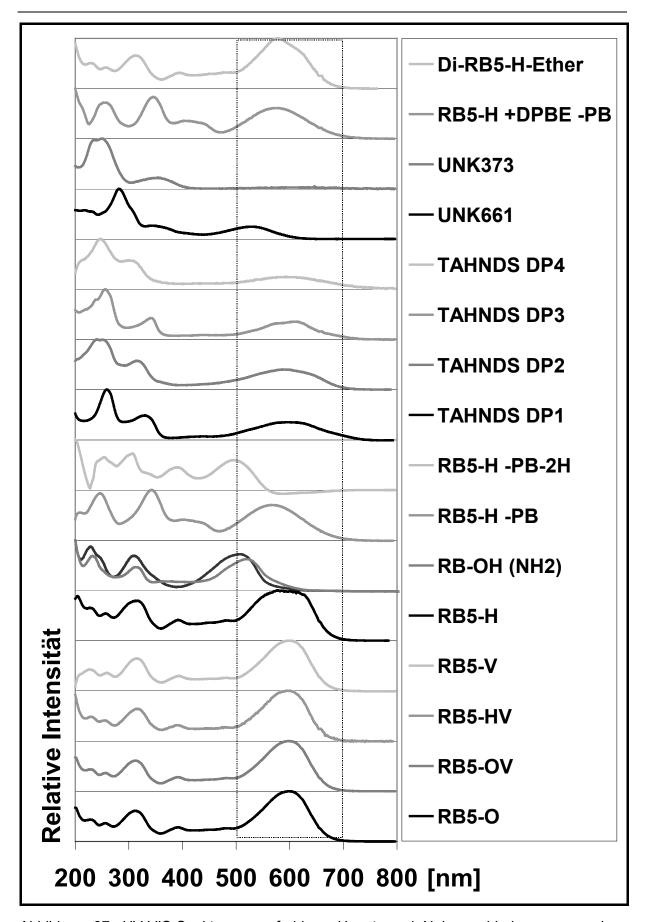


Abbildung 97: UV-VIS-Spektren von farbigen Haupt- und Nebenverbindungen aus dem Abwasser sowie anaeroben und aeroben Bioreaktor isoliert aus dem Online-HPLC-Monitoring mit Dioden-Array-Detektor

### 6.1.5.2 Stoffspezifische Zuordnung der UV-Absorption bei 270 nm

Die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit auf Grundlage des Online-Monitorings ergab sich aus der Zusammenführung der UV-VIS- und der massenspektroskopischen Informationen. Die Auswertung wurde exemplarisch für zwei Betriebstage zu Beginn einer Versuchsreihe mit einer Raumbelastung von 1,6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> am vierten und 15. Betriebstag durchgeführt. Die genauen Prozessbedingungen sind in Abbildung 79 (Seite 134) dargestellt.

Für die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit wurden der blaue Bereich mit 585 nm (entspricht dem Extinktionsmaximum von Reactive Black 5) und der ultraviolette Bereich mit 270 nm ausgewählt. Diese Auswahl sollte Aufschluss über die Zuordnung der blauen Farbigkeit im anaeroben und aeroben Bioreaktor sowie deren Ursache im Ablauf des aeroben Bio-Membran-Reaktors bringen. In Kapitel 6.1.6 (Seite 152) wurde die zum Teil erhebliche Zunahme der Absorption im UV-Bereich bei 270 nm festgestellt. Die Ursache dafür liegt an der membranbedingten Anreicherung von Intermediaten mit hohem UV-Anteil wie TAHNDS<sub>DP4</sub>. Der Zuwachs ist um so höher, wenn der anaerobe Bioreaktor nicht optimal betriebenen wurde. Durch die unvollständige Reduktion gelangten teilreduzierte Verbindungen und Intermediate in den aeroben Bioreaktor, die, bedingt durch die intakte Azobindungen über sehr viel höhere Extinktionskoeffizienten verfügten und in Folge eine Anwachsen der UV-Extinktion verursachten. Auch die Totalreduktion von RB5-H zu TAHNDS<sub>DP1-4</sub> führt zu einer Zunahme der UV-Absorption im Verhältnis zur farbigen Absorption (siehe Abbildung 97).

In Abbildung 98 sind die zeitlichen Entwicklungen der Absorptionsänderung im farbigen und ultravioletten Wellenlängenbereich dargestellt. Im ultravioletten Bereich stabilisierten sich die gemessenen Werte ab dem 14. Betriebstag im anaeroben Bioreaktor, bei dem eine Zunahme der Absorption von etwa +40 % in Bezug auf die Feed-Absorption festzustellen war. Im aeroben Bioreaktor war nach einem Minimum am 14. Betriebstag bei +40 % ein stetiger Anstieg auf ca. +80% zu beobachten. Eine Abnahme der UV-Absorption wurde im Ablauf des aeroben Bioreaktors beobachtet. Nach einem Maximum von etwa – 40 % am dritten Betriebstag und einer stetigen Abnahme der Absorption in Folge, pendelte sie sich nach dem 15. Betriebstag bei –70 bis –80 % ein.

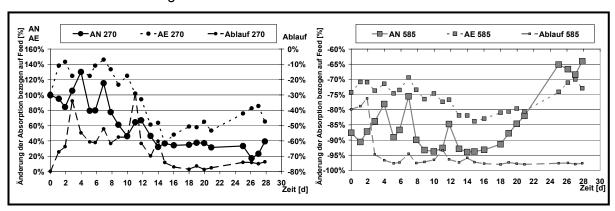


Abbildung 98: Bestimmung der Entwicklung der Änderung der Absorption im UV-Bereich bei 270 nm (links) und der Entfärbungsleistung bei 585 nm (rechts) im kontinuierlichen Betrieb (AN – anaerober Bioreaktor, AE – aerober Bioreaktor, Ablauf – Permeat des aeroben Bioreaktors), Membrantyp: Ultrafiltrationsmembran Hoechst High Chem PES-50H, (MWCO = 50000 Da)

Setzt man diese Beobachtung in Relation zu den stoffspezifischen Anteilen an der UV-Absorption, so lassen sich aus Abbildung 99 die UV-Absorption verursachenden Verbindungen identifizieren. In der linken Abbildung sind die stoffspezifischen Anteile an der UV-Absorption am 4. Betriebstag dargestellt. Den Hauptanteil trugen im anaeroben

Bioreaktor TAHNDS<sub>DP4b</sub> und p-Base mit ca. 35 und 20 % Anteil. Die unvollständige Reduktion zu diesem Zeitpunkt dokumentieren die vorhandenen Anteile von RB5-H, RB5-V sowie RB5-HV an der Absorption. Neben Di-p-Base-Ether (DPBE) hatten ABSEESA/ABSESA sowie TAHNDS<sub>DP1</sub>/Naphthalinsulfonsäure (NSA) und TAHNDS<sub>DP4a</sub> einen geringen Anteil an der UV-Absorption. Bedingt durch die geringere Selektivität des Dioden-Array-Detektors im Vergleich zum Massenspektrometer sind die UV-Anteile nicht vollständig basisliniengetrennter Verbindungen wie TAHNDS<sub>DP1</sub> und Naphthalinsulfonsäure (NSA) zusammengefasst.

Im aeroben Bioreaktor konzentrierte sich der Anteil der UV-Absorption mit 70% Anteil auf TAHNDS<sub>DP4b</sub>, das wie das Monitoring zeigte, im aeroben Bioreaktor akkumulierte und nicht weiter abgebaut wurde. Der Anteil von ABSEESA/ABSESA sowie TAHNDS<sub>DP3a</sub> war gegenüber dem anaeroben Bioreaktor erhöht. Die noch vorhandenen Anteile von p-Base und Di-p-Base-Ether (DPBE) zeigten, dass die Adaption der aeroben Biozönose an diese Substanzen innerhalb der Anfahrphase nicht vollständig vollzogen war (Details zum Abbauverhalten siehe Kapitel 6.1.3.2, Seite 133 und Kapitel 6.1.3.3, Seite 136).

Aufgrund des am vierten Betriebstag noch nicht erreichten vollständigen Abbaus von p-Base, trägt sie im Ablauf mit ca. 37 % Anteil als Hauptverursacher zur UV-Absorption bei. Auffällig ist hier, dass der Anteil der Nebenverbindungen aus der Synthese der p-Base bei fast 15 % liegt. Unterhalb eines Anteils von 10 % sind die Verbindungen Di-p-Base-Ether (DPBE), PBSA als Derivate der p-Base vertreten. TAHNDS $_{DP2}$  und TAHNDS $_{DP3a}$  bestimmen den Restanteil an der UV-Absorption.

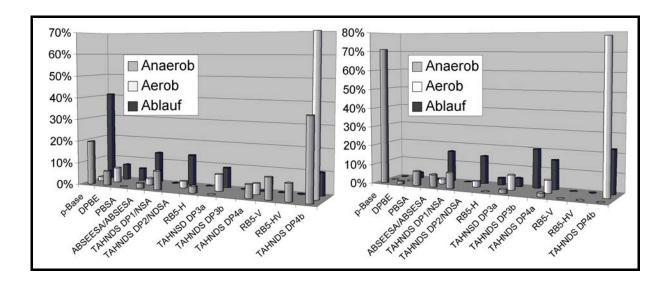


Abbildung 99: Stoffspezifische Zuordnung der UV-Absorption (270 nm) bei einer Raumbelastung von 1,6 m $M_{RB5-H}$  L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> am 4. Betriebstag (links) und am 15. Betriebstag (rechts)

Der Anteil von über 70 % p-Base an der UV-Absorption am 15. Betriebstag (rechte Darstellung in Abbildung 99) ist ein Zeichen für die vollständige Reduktion des Diazofarbstoffes. Unter optimalen reduktiven Bedingungen ist der Anteil der Intermediate an der UV-Absorption im Vergleich zum vierten Betriebstag vernachlässigbar gering. Die restliche Absorption verteilt sich auf die p-Base-Derivate DPBE, PBSA sowie ABSEESA/ABSESA. TAHNDS $_{\rm DP1}$  hat an diesem Betriebstag nur einen Anteil von 5% an der UV-Absorption.

Im aeroben Bioreaktor dominiert TAHNDS<sub>DP4</sub> mit einem Anteil von fast 80 % die UV-Absorption, weil p-Base zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgebaut war. Geringe Anteile von < 5 % entfallen auf ABSEESA/ABSESA, wobei durch das stoffspezifische Monitoring der Abbau von ABSESA nachgewiesen werden konnte, so dass der Anteil vollständig auf ABSEESA entfällt. Weitere Restanteile werden von TAHNDS<sub>DP3a</sub> und TAHNDS<sub>DP4a</sub> abgedeckt.

Im Ablauf der aeroben Stufe verteilt sich die UV-Absorption mit etwa gleichem Anteil auf fünf Verbindungen, die demnach das Verfahren nach 15 Tagen wenig oder nicht abgebaut passieren. Neben TAHNDS $_{DP4a/b}$  entfallen die weiteren Anteile auf TAHNDS $_{DP2}$  und TAHNDS $_{DP3b}$  sowie ABSEESA. Der Anteil von TAHNDS $_{DP3b}$  ist ungewöhnlich, weil er nur im Ablauf des aeroben Bioreaktors einen relevanten Anteil an der UV-Absorption erzielt. ABSEESA ist von allen die einzige benzenbasierte Verbindung, die zu diesem Betriebszeitpunkt im Ablauf einen Anteil von > 10 % besitzt. Mehr als 80 % der Absorption wird den naphthalinbasierten Verbindungen zugerechnet, die damit eindeutig als Hauptverursacher der UV-Absorption identifiziert sind. Der geringe Anteil von hydrolysiertem Reactive Black 5 im Ablauf zeigt, wie wichtig es ist, den anaeroben Bioreaktor von Beginn an unter optimalen Bedingungen zu betreiben.

In der Anfahrphase des biologischen Verfahrens ist zu empfehlen, einen Teil des Abwassers im anaeroben-aeroben Kreislaufbetrieb zu fahren, um eine Anreichung nicht reduzierter Azoverbindungen zu minimieren. Nach Adaption der aeroben Stufe an die abbaubaren Verbindungen wie die p-Base-Derivate könnte dann der kontinuierliche Betrieb aufgenommen werden. Weitere Möglichkeiten zur Verfahrensoptimierung auf Grundlage des stoffspezifischen Monitorings werden in Kapitel 7 (ab Seite 202) diskutiert.

### 6.1.5.3 Stoffspezifische Zuordnung der VIS-Absorption bei 585 nm

Für die Beurteilung und Zuordnung der Herkunft von Restfarbigkeit in den einzelnen Reaktorstufen wurde für die stoffspezifische Zuordnung das Extinktionsmaximum des Farbstoffes Reactive Black 5 gewählt. Die Entwicklung der Entfärbeleistung bei 585 nm ist in Abbildung 98 (rechts) dargestellt. Die Redoxpotentialschwankungen der Anfahrphase spiegeln sich in den schwankenden Entfärbungsraten des anaeroben Bioreaktors wider, die zwischen –75 und -95 % variierten. Ab dem neunten Betriebstag war eine Stabilisierung der Entfärbeleistung bei -93 bis -94 % zu beobachten, die am 12. Betriebstag nochmals gestört wurde. Mit Beginn des sukzessiven Anstieges des Redoxpotentials ab dem 17. Betriebstag ging auch die Abnahme der Entfärbeleistung auf – 65 % einher. Die Entwicklung im aeroben Reaktor zeigt eine Abnahme von –70 % auf – 80% bis zum 20. Betriebstag, nach dem sich dann die unvollständige Reduktion im anaeroben auf die Farbigkeit im aeroben Bioreaktor auswirkte. Die Gesamtentfärbeleistung gemessen am Ablauf des aeroben Bio-Membran-Reaktors unterschritt bereits nach dem zweiten Betriebstag den geforderten Grenzwert von 95% und lag den weiteren Verlauf über nahezu konstant bei einer 98%igen Entfärbung.

Abbildung 100 zeigt in der linken Darstellung die Anteile einzelner Verbindungen an der VIS-Absorption in den zwei Reaktorstufen und dem Ablauf am vierten Tag des kontinuierlichen Betriebes. Bis zu 50 % der Farbigkeit wurden von TAHNDS<sub>DP4b</sub> verursacht. Mit weniger als 10 % fielen die Farbstoff-Verbindungen RB5-H, RB5-HV, RB5-V und die Reduktionsprodukte RB5-H –PB sowie TAHNDS<sub>DP1</sub> und TAHNDS<sub>DP4b</sub> ins Gewicht. In der Anfahrphase des Bioreaktors zeigte sich hier die noch unvollständige Reduktion der Azoverbindungen. Der hohe Anteil an TAHNDS<sub>DP4b</sub> ist auf die vorgehenden Versuchsreihen zurückzuführen, da die Bioreaktoren nicht geleert bzw. mit frischem Schlamm aufgefüllt wurden.

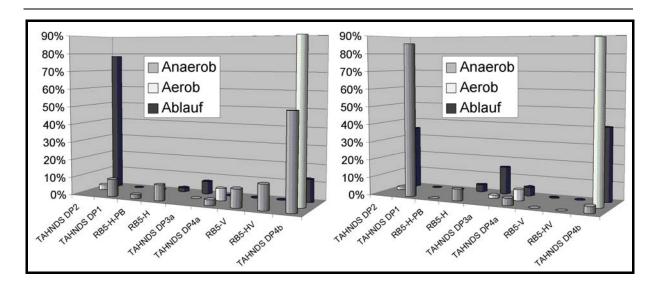


Abbildung 100: Stoffspezifische Zuordnung der VIS-Absorption (585 nm) bei einer Raumbelastung von 1,6 m $M_{RB5-H}$  L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> am 4. Betriebstag (links) und am 15. Betriebstag (rechts)

In der aeroben Stufe war TAHNDS<sub>DP4b</sub> die dominierende Verbindung mit 90 % Anteil an der Farbigkeit. Geringe Restanteile entfielen auf TAHNDS<sub>DP4a</sub> und TAHNDS<sub>DP2.</sub> Im Gegensatz hierzu ist der Hauptanteil von fast 80 % im Ablauf des aeroben Bioreaktors auf TAHNDS<sub>DP2</sub> zurückzuführen. Dieser Unterschied war auf das unterschiedliche Retententionsverhalten beider Substanzen bei der eingesetzten Ultrafiltrationsmembran zurückzuführen, die TAHNDS<sub>DP4b</sub> stärker als TAHNDS<sub>DP2</sub> retenierte.

Einhergehend mit der nahezu vollständigen Reduktion im anaeroben Bioreaktor am 15. Betriebstag stellte TAHNDS $_{DP1}$  als primäres Reduktionsprodukt des Farbstoffes den Hauptanteil der farbigen Absorption mit 85 %. Weniger als 5 % entfielen auf den hydrolysierten Farbstoff, der später für die Restfarbigkeit im aeroben Bioreaktor keine Bedeutung hatte. Der 90 %ige Anteil von TAHNDS $_{DP4b}$  im aeroben Bioreaktor ist ein weiterer Beleg für die Hydrolyse von TAHNDS $_{DP2}$  über TAHNDS $_{DP3}$  zu TAHNDS $_{DP4}$ , wobei TAHNDS $_{DP3}$  als Zwischenstufe nur eine geringe Bedeutung zukommt. Sie kam nur im Ablauf mit etwas mehr als 10 % Anteil vor. Der Hauptanteil der blauen Restfarbigkeit des Ablaufes war zu gleichen Teilen auf TAHNDS $_{DP2}$  und TAHNDS $_{DP4b}$  zurückzuführen.

# 6.1.6 Beurteilung der Entfärbung von Abwasserkonzentraten nach Abwasserverordnung Anhang 38

Bei Abwasserkonzentraten aus der Textilfärbung handelt es sich um Abwässer, deren Farbstoffgehalt oberhalb 100 - 250 mg L $^{-1}$  (bezogen auf RB5-H entspricht das 135 – 337 µM) liegt [269]. Die durchschnittliche Farbigkeit eines nicht konzentrierten Abwassers (z. B. 1. und 2. Waschflotte) liegt etwa im Durchsichtigkeitsfarbzahlbereich von 1500 m $^{-1}$ . Nach Einhaltung der gesetzlich geforderten -95 %igen Entfärbung liegen die DFZ-Werte mit 75 m $^{-1}$  selbst bei diesen weniger belasteten Abwässern um den Faktor 10 oberhalb der Grenzwerte für die Restfarbigkeit. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrate lagen mit einem Farbstoffeinwaagen von 15 g<sub>RB5</sub> L $^{-1}$  bei Durchsichtigkeitsfarbzahlen von 15500 m $^{-1}$  (436 nm) bis 38000 m $^{-1}$  (620 nm) und im Absorptionsmaximum bei 44000 m $^{-1}$  (585 nm) (siehe auch Kapitel 5.2, Seite 41). Mit der geforderten 95%igen Entfärbung sollen die Durchsichtigkeitsfarbzahlen in den Bereich der niedrig belasteten Abwässer geführt werden (bei 585 nm entspräche das 1700 m $^{-1}$ ).

Für die Bestimmung der optimalen Betriebsparameter zur Entfärbung der Modellkonzentrate mit hydrolysiertem Farbstoff Reactive Black 5 wurde das Behandlungsverfahren

kontinuierlich betrieben. In Abbildung 101 ist ein Versuch dargestellt, bei dem in der linken Abbildung Summenparameter und rechts die wellenlängenbezogenen Entfärbungsraten in ihrer zeitlichen Entwicklung illustriert sind. Die Abwasserzusammensetzung entsprach der in Tabelle 16 (Seite 42) angegebenen Konzentration von 5 mM L<sup>-1</sup>. Bei diesem Versuch wurde das Verfahren mit einer Raumbelastung von 0,5 - 1,5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> über 17 Tage kontinuierlich betrieben. Die durchschnittliche hydraulische Verweilzeit im anaeroben Reaktor betrug zwischen 3,6 und 11 Tagen.

Über den Versuchszeitraum der kontinuierlichen Feed-Zugabe ist ein sukzessives Ansteigen des Redoxpotentials im anaeroben Bioreaktor zu beobachten, das bereits an früherer Stelle diskutiert wurde (siehe Kapitel 6.1.3.1, Seite 128). Durch die Stosszugabe von Ethanol (4 oder 8 mL bei 35 L Betriebsvolumen) war es möglich, kurzfristig ein Absinken des Redoxpotentials zu bewirken. Mit der Steigerung der Raumbelastung auf 1,5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> reichte die zugeführte Menge des Co-Substrates Ethanol nicht mehr aus, die erforderlichen Redoxäquivalente durch die Verstoffwechselung für die Entfärbung zur Verfügung zu stellen.

Trotz des Anstiegs des Redoxpotentials und der damit einhergehenden unvollständigen Reduktion des Diazofarbstoffes lag die Entfärbeleistung des anaeroben Bioreaktors über den gesamten Versuchszeitraum im blauen Bereich (620 nm) bei etwa –80 %. Nach etwa einer Woche stellten sich auch im gelben (436 nm) und roten Bereich (525 nm) konstante Entfärbungsraten von 60% (gelb) bzw. -70 bis -80 % (rot) ein. In der aeroben Stufe sank bedingt durch Rückverfärbung die Gesamtentfärbungsrate im blauen Bereich auf –60 bis –70 %. Noch intensiver wirkte sich dieser Effekt auf den gelben Bereich aus, bei dem eine Farbigkeitszuwachs von +40 % bezogen auf die Feedfarbigkeit beobachtet wurde. Im roten Bereich sank die Entfärbungsrate auf etwa –40 %.

Durch die Betriebsweise der zweiten Stufe als Bio-Membran-Reaktor war es möglich, die geforderte Entfärbeleistung von 95% bis zum 13. Betriebstag einzuhalten. Aufgrund der Undichtigkeit einer Membran sank die Entfärbeleistung nachfolgend auf -80 bis -90 %. Der starke Anstieg der Farbigkeit im aeroben Bioreaktor begründet sich mit Rückverfärbung der Metabolite des reduzierten Farbstoffes (TAHNDS<sub>DP1-4</sub>) und der Retention durch die eingesetzten Ultrafiltrationsmembranen, die beispielsweise für TAHNDS<sub>DP2</sub> eine Rückhaltung von bis zu 90% aufwiesen (Vergleiche mit Tabelle 19, Seite 48).

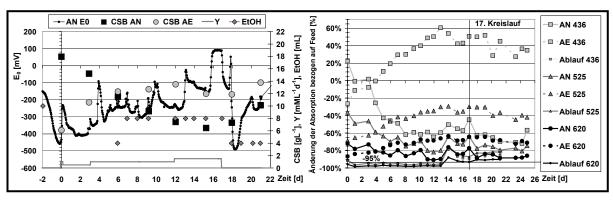


Abbildung 101: Links - Redoxpotential, Raumbelastung und Co-Substrat Dosierung im anaeroben Bioreaktor sowie Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) in der anaeroben und aeroben Stufe (0,5 - 1,5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); Rechts - Bestimmung der Entfärbungsleistung im kontinuierlichen Betrieb bei den Wellenlängen 436, 525 und 620 nm (AN – anaerober Bioreaktor, AE – aerober Bioreaktor, Ablauf – Permeat des aeroben Bioreaktors), Membrantyp: Ultrafiltrationsmembran Hoechst High Chem PES-50H, (MWCO = 50000 Da)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Ethanol als Co-Substrat und Elektronenlieferant für die anaerobe Reduktion dem Behandlungsverfahren kontinuierlich mit dem Feed zugeführt. Die Dosierung betrug bei einer Raumbelastung von 4 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> 0,1 mL<sub>EtOH</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Abbildung 102 (links) zeigt, dass sich das Redoxpotential durch die kontinuierliche Co-

Substratzugabe im Bereich von -200 bis -400 mV bewegte. Die hohen Raumbelastungen von 3 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> führten zu einem Anstieg des Redoxpotentials in der Anfahrphase und bei der Steigerung der Raumbelastung von 3 auf 4 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, das im Bereich oberhalb des Schwellenwertes von -250 mV lag.

Insgesamt bewirkte der Betrieb des anaeroben Bioreaktors im Bereich oberhalb des Schwellenwertes, dass die Entfärbungsleistung auch bei hoher Raumbelastung im blauen Bereich zwischen 90 - 95% betrug. Im roten Bereich lag sie im Mittel bei 90% und im gelben bei 80 - 85%. Die unter diesen Bedingungen bewirkte vollständige Reduktion des Diazofarbstoffes zeigt, dass die Entfärbeleistung wesentlich vom Redoxpotential abhängig ist und auch bei hohen Raumbelastung hohe Werte im gesetzlich geforderten Bereich erzielt werden können. Die von van der Zee und Villaverde beschriebene hemmende Wirkung hoher Farbstoffkonzentrationen auf die Biozönose und eine durch unvollständige Reduktion absinkende Entfärbeleistung wurde in dieser Versuchsreihe mit einer Feedkonzentration von 11 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> nicht beobachtet [112].

Die hohe Entfärbeleistung des anaeroben Bioreaktors bewirkte, dass weniger farbige Intermediate mit intakter Azobindung in den aeroben Bioreaktor eingetragen wurden. Bedingt durch Rückverfärbung und Retention farbiger Verbindungen durch die Ultrafiltrationsmembran sank die Entfärbeleistung im aeroben auf etwa – 80 % im blauen, auf -60 bis –70 % im roten und auf -30 bis –50 % im gelben Bereich. Damit lag sie um ein Vielfaches höher als im vorhergehenden Versuch beschrieben, bei dem im gelben Bereich insgesamt ein Zuwachs an Farbigkeit in bezug auf das eingespeiste Abwasser beobachtet wurde. Die Gesamtentfärbeleistung am Ablauf des aeroben Bioreaktors lag nach Gleichung 1 (siehe Kapitel 3.4.3, Seite 31) zwischen dem vierten und 16. Betriebstag bei 95  $\pm$  1 %. Die am 11. Tag im anaeroben Bioreaktor aufgetretene Störung des Redoxpotentials wirkte sich auch auf die Farbigkeit im aeroben Bioreaktor aus. Einen Einfluss auf die Ablauffarbigkeit wurde nicht festgestellt.

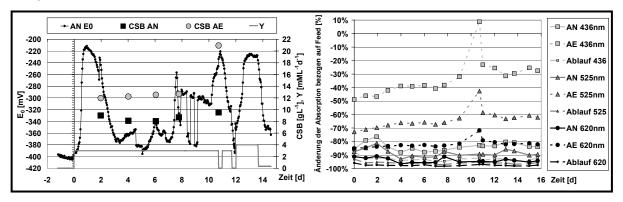


Abbildung 102: Links - Redoxpotential, Raumbelastung im anaeroben Bioreaktor sowie Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) in der anaeroben und aeroben Stufe; Rechts - Bestimmung der Entfärbungsleistung im kontinuierlichen Betrieb bei den Wellenlängen 436, 525 und 620 nm (AN – anaerober Bioreaktor, AE – aerober Bioreaktor, Ablauf – Permeat des aeroben Bioreaktors), Membrantyp: Ultrafiltrationsmembran Hoechst High Chem PES-50H, (MWCO = 50000 Da)

Beim Vergleich der Entwicklung der UV-Absorption (bei 270 nm) der beiden Versuchsreihen zeigte die erste einen Zuwachs von bis zu +2000 % bezogen auf die Zulaufkonzentration im anaeroben Bioreaktor, der ab dem 14. Betriebstag bei +600 % konstant blieb (siehe Abbildung 103, links). Im aeroben Bioreaktor pendelte sich der Zuwachs im Bereich zwischen +600 bis +800 % ein. Der Sprung im Verlauf der UV-Absorption des Ablaufes am 14. Tag bestätigt die eingeschränkte Funktion der Ultrafiltration. Im Vergleich hierzu lagen in der zweiten Versuchsreihe die UV-Absorptionsintensitäten in beiden Reaktoren um nur 100 % höher als im Feed (siehe Abbildung 103, rechts). Die unvollständige Reduktion hatte demnach eine signifikante Auswirkung auf die UV-Absorption in beiden Bioreaktoren. Die nur

lang-same Zunahme der Absorption im anaeroben und aeroben Bioreaktor bei hydraulischen Verweilzeiten von etwa vier Tagen deuten an, dass sowohl der anaerobe als auch der aerobe Bioreaktor unter optimalen Bedingungen arbeiten konnten.

Durch die eingesetzte Ultrafiltrationsmembran konnte in der zweiten Versuchsreihe eine 60 bis 70 %ige Retention der UV-Absorption verursachenden Verbindungen (in Bezug auf das Feed) erzielt werden, wodurch deren Verweilzeit im aeroben Bioreaktor erhöht wurde. Der Anstieg der UV-Absorption im aeroben Bioreaktor deutet darauf hin, dass diese Verbindungen zum Teil akkumuliert wurden. Die Auswertungen des stoffspezifischen Monitorings (siehe 6.1.3.2 und 6.1.3.3, Seite 133 und 136) zeigten, dass ein Teil der untersuchten Verbindungen im aeroben Bioreaktor nach einer Phase von 5-15 Tagen abgebaut wurden (wie z.B. NAPB, ABSESA, TAHNDS<sub>DP2</sub>) oder den aeroben Bioreaktor unabgebaut passierten (wie z. B. ABSEESA; NDSA, TAHNDS<sub>DP4</sub>).

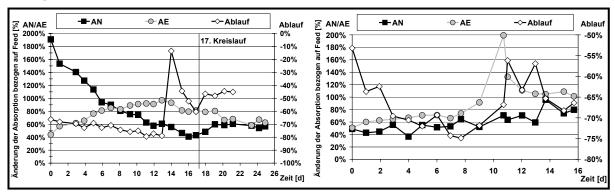


Abbildung 103: Bestimmung der UV-Absorption (270 nm) bei kontinuierlichen Betrieb mit Raumbelastung von: Links – 0,5 - 1,5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; Rechts - 4 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (AN – anaerober Bioreaktor, AE – aerober Bioreaktor, Ablauf – Permeat des aeroben Bioreaktors), Membrantyp: Ultrafiltrationsmembran Hoechst High Chem PES-50H, (MWCO = 50000 Da)

### 6.1.7 Stoffspezifischen Abbaubarkeit von Abwasserinhaltsstoffen und Intermediaten

Die in Literatur beschriebenen Entfärbeverfahren nutzen den spektralen Absorptionskoeffizienten als Summenparameter zur Beurteilung der Entfärbeleistung. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass neben der Farbstoffhauptkomponente des Modellfarbstoffabwassers eine Reihe von Nebenverbindungen einen relevanten Anteil an der UV-Absorption und Farbgebung des Abwassers haben können. In Tabelle 43 sind die stoffspezifischen Abbaubarkeiten der im Monitoring erfassten Verbindungen aufgelistet. Die verbleibende Restfarbigkeit im Ablauf des aeroben Bioreaktors wurde exemplarisch für einen Betriebstag stoffspezifisch zugeordnet, um eine Bewertung der Abwasserrelevanz dieser Verbindungen zu ermöglichen. Eine detaillierte Betrachtung zur stoffspezifischen Zuordnung der Restfarbigkeit in allen drei Messstellen wurde in Kapitel 0 (ab Seite 146) dargestellt.

Tabelle 43: Übersicht der stoffspezifischen Abbaubarkeit von Abwasserinhaltsstoffen und Intermediaten in den Bioreaktoren und Zusammensetzung des Ablaufs ("+" - abbaubar, "-" – nicht abbaubar, "•" vorhanden, n. b. – nicht bestimmt; Restfarbigkeit im Ablauf bezogen auf den 15. Betriebstag aus Kapitel 6.1.5.3)

Verbindung	Anteil im Feed	ε <sub>max</sub> [nm]	Quelle (F, AN,	Abbaubar	keit	Ablauf	Anteil Rest- farbigkeit Ablauf	
	[%]	[iiiii]	AE)	Anaerob Aerob			VIS <sub>585nm</sub> [%]	
RB5-O	-	585	F	-	-	-	-	
RB5-OV		585	F	+	-	-	-	
RB5-V		585	F	+	-	-	-	
RB5-HO		585	F	+	-	-	-	
RB5-HV		585	F	+	-	-	-	
RB5-H		585	F	+	-	-	4	
RB5-H+DPBE		585	F	+	-	-	-	
Di-RB5-H		585	F	+	-	-	-	
$RB-NH_2$		500	F	+	-	-	-	
RB-OH		520	F	+	-	-	-	
RB5-H+SO <sub>2</sub>		585	F	+	-	-	-	
NAPB		270	F	-	+	-	-	
Sulfanilsäure		270	F	-	+	-	-	
DPBA		270	F	-	+	-	-	
PBSA		270	F	-	+	-	-	
ABSEESA		270	F	-	-	•		
ABSESA		270	F	-	+	-	-	
NSA		300	F	-	+	-	-	
NSDA		300	F	-	-	•	-	
TAHNDS <sub>DP1</sub>		600	AN	-	-	-	-	
TAHNDS <sub>DP2</sub>		595	AN	-	-	•	35	
TAHNDS <sub>DP3</sub>		612	ΑE	-	-	•	15	
TAHNDS <sub>DP4</sub>		593	AN	-	-	•	46	
p-Base (PB)		270	AN	-	+	-	-	
DPBE		270	AN	-	+	•	-	
VPB		270	AN	-	+	-	-	
RB5-H-PB		570	AN	+	-	-	-	
RB5-H-PB-2H		500	AN	+	-	-	-	
UNK188		270	AN	-	+	-	-	
UNK343		n. b.	AN	n. b.	n. b.	n. b.	-	
UNK371		n. b.	AN	-	+	•	-	
UNK373		620	AN	-	+	-	-	
UNK661		530	AN	+	-	•	-	
UNK584		n. b.	AN	+	-	-	-	
UNK386 (358)		n. b.	AN	-	-	•	-	

### 6.1.8 Vergleich der Entfärbung von Modell- und Realtextilabwässern

Eine Versuchsreihe mit dem hydrolysierten Farbstoff Reactive Black 5, der in zwei Modellabwässern und zwei realen Abwässern als Hauptfarbstoffkomponente vorlag, wurde über einen Zeitraum von 69 Tagen durchgeführt. Eine gegliederte Darstellung der Raumbelastungsparameter für das anaerob-aerobe Behandlungsverfahren ist in Tabelle 44 angegeben. Im Vergleich zu den Modellabwässern Nr. 1 und 2 waren die Farbstoffraumbelastungen in den realen Abwässern aus Färbereibetrieben sehr viel geringer und lagen mit DFZ-Werten von 390 und 415 im Bereich der wenig konzentrierten Mischabwässer. Die CSB-Raumbelastung des Abwassers Nr. 4 war mit 1,29 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> am höchsten (absoluter CSB-Gehalt 16,1 g L<sup>-1</sup>). Die Salzbelastungen der realen Abwässer lagen absolut bei 39,2

 $g_{NaCl}$  L<sup>-1</sup> und 8,7  $g_{Na2SO4}$  L<sup>-1</sup> (Nr. 3) und 69,7  $g_{NaCl}$  L<sup>-1</sup> und 3,3  $g_{Na2SO4}$  L<sup>-1</sup>(Nr. 4) und damit in einem Bereich, der für biologische Behandlungsverfahren als problematisch gilt.

Neben der kontinuierlichen Zuführung der Abwässer wurde dem anaeroben Bioreaktor in drei Phasen Ethanol als Co-Substrat in unterschiedlichen Tagesmengen zugeführt (siehe Abbildung 104), um die ausreichende Freisetzung von Redoxäquivalenten bei der anaeroben Behandlung anzuregen und eine optimale Reduktion der Farbstoffraumbelastung zu erzielen.

Tabelle 44: Übersicht der Modell- und Realabwässer zur Behandlung im anaerob-aeroben-Verfahren

Nr.		p-Base	ΣRB5 (V, HV, H)	CSB	DFZ <sub>585</sub>	NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
	Chargen-	Raumbelastung						
	zulaufdauer [d]	[mM L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[mM L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[m <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	
1	20 <sup>1</sup>	0,015	0,245	0,464	1300	2,27	0,23	
2	8 <sup>1</sup>	0,026	0,553	0,664	2930	3,76	0,7	
3	21 <sup>2</sup>	0,427	0,078	0,423	415	3,13	0,7	
4	11³	0,181	0,073	1,29	390	5,58	0,26	

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> – Modellabwasser, <sup>2</sup> - Abwasser aus der Garnfärberei WGF-Wuppertal, <sup>3</sup> - Abwasser der Textilveredelungsunion (TVU)

### 6.1.9 Stoffspezifisches Monitoring

Die quantitative Entwicklung des Farbstoffgehaltes und der Intermediate im aneroben Bioreaktor ist in Abbildung 104 (links) illustriert und wurde mit dem zweiten Online-Analyseverfahren mit Hilfe des LaChrom-Systems durchgeführt. Über den Zeitraum von 69 Tagen ist dem Bioreaktor eine Stoffmenge von fast 12 mM Reactive Black 5 zugeführt worden. Das Online-Monitoring zeigt, dass der Farbstoff zu keinem Zeitpunkt im Bioreaktor nachzuweisen war. Neben der p-Base hatte TAHNDS $_{DP1}$  den höchsten Konzentrationsanteil im anaeroben Bioreaktor, was auf die vollständige Reduktion hindeutet. Zu Beginn der Kreislaufphase gab es einen Anstieg des Redoxpotentials oberhalb des Schwellenwertes (siehe Abbildung 105 , links), der zur Hydrolyse von TAHNDS $_{DP1}$  zu TAHNDS $_{DP2}$  führte. Aufgrund des nicht optimalen Redoxpotentials in der letzten Phase des Betriebes, war TAHNDS $_{DP1}$  nicht mehr nachweisbar. TAHNSD $_{DP4}$  trug wie auch in den anderen Versuchsreihen neben TAHNDS $_{DP1}$  bzw. TAHNDS $_{DP4}$  wesentlich zur Farbigkeit bei.

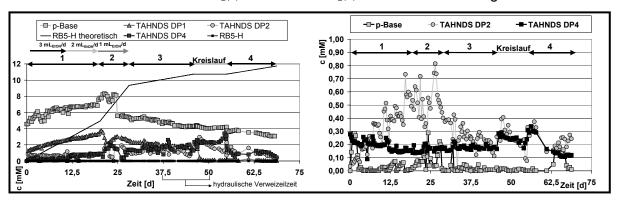


Abbildung 104: Stoffspezifisches Monitoring der Hauptverbindungen bei der Belastung mit unterschiedlichen Abwässern (gemessen mit Online-HPLC-DAD, LaChrom-System), Rechts - anaerober Bioreaktor, Links – aerober Bioreaktor

Die kontinuierliche Zugabe von Ethanol zu Beginn der Versuchsreihe wirkte sich sehr positiv auf das Redoxpotential aus, das bei –450 mV verblieb. Der Wechsel auf eine geringere Menge von 1 mL pro Tag führte auf einen Anstieg in den Bereich von –350 mV. Auch unter Zulauf der Realflotte mit geringerer CSB-Belastung war eine vollständige Reduktion des Farbstoffes zu beobachten. Das farblich am geringsten belastete Abwasser mit der höchsten CSB-Raumbelastung wurde im Redoxpotentialbereich von –200 bis – 300 mV noch ausreichend reduziert.

Im aeroben Bioreaktor hatte zu Beginn der Versuchsreihe TAHNDS<sub>DP2</sub> den größten Anteil an der Restfarbigkeit, die sich ab dem 45. Betriebstag etwa gleichwertig auf TAHNDS<sub>DP2</sub> und TAHNDS<sub>DP4</sub> verteilte (siehe Abbildung 104, rechts). Bei der Entwicklung der p-Base-Konzentration war in der Anfahrphase und nach dem Kreislaufbetrieb vor Phase 4 ein leichter Anstieg zu beobachten, der nach der Adaption der aeroben Stufe auf null sankt. In der Folge traten an verschiedenen Tagen Störungen beim Abbau von p-Base, die in Phase 2 mit einer erhöhten Raumbelastung des anaeroben Bioreaktors von 0,245 auf 0,553 mM L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> einher gingen. In Zusammenhang damit stand auch die Erhöhung der Salzbelastung, die in Abbildung 105 in ihrer zeitlichen Entwicklung für beide Bioreaktoren dargestellt ist.

### 6.1.9.1 Einfluss der Salzbelastung

Mit Beginn der Phase 2 ist ein deutlicher Anstieg der NaCl-Konzentration im anaeroben und aeroben Bioreaktor zu verzeichnen, der innerhalb einer hydraulischen Verweilzeitzyklus zu einer Verdopplung der NaCl-Konzentration von 20 auf 40 g L $^{-1}$  führte. Im Anschluss an diese Erhöhung war im aeroben Bioreaktor wieder der vollständige Abbau der p-Base zu beobachten. Der Salzgradient wirkte sich wahrscheinlich hemmend auf Abbau von p-Base aus im aeroben Bioreaktor. Auf die Reduktion im anaeroben Bioreaktor hatte er keinen signifikanten Einfluss. Nach einer kurzen Adaptionsphase hatte sich die aerobe Biozönose an die neuen Bedingungen angepasst. Da der Gradient der NaCl-Konzentration wesentlich größer war als der von Na $_2$ SO $_4$ , wird angenommen, dass er für die temporäre Hemmung ursächlich war.

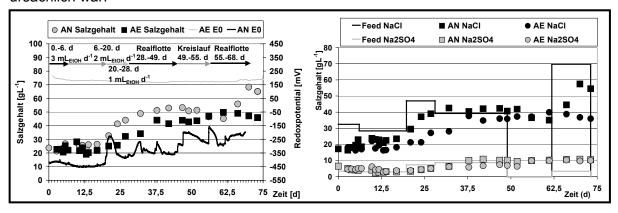


Abbildung 105: Summenparameter der Versuchsreihe: Links – Salzgehalte und Redoxpotential; Rechts – Salzkonzentrationen von NaCl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Feed, Anaeroben (AN) und aeroben Bioreaktor (AE)

Die hohe Salzlasten führen zu hohen osmotischen Drücken, die die Ionengleichgewichte von Zellen derart beeinflussen können, dass die abbaurelevanten Stoffwechselaktivitäten gehemmt oder eingestellt werden [270]. Bei der anaeroben Behandlung (TS = 0,6 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>) des Farbstoffes Mordant Yellow (300 mg L<sup>-1</sup>) verminderte eine Salzbelastungen von 10 g L<sup>-1</sup> NaCl den Umsatz um 30 % und 20 g L<sup>-1</sup> NaCl um 55 % in bezug auf eine Referenzprobe ohne Salzlast [270]. Noch signifikanter wirkt sich die Zugabe von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf den Umsatz aus: 10 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vermindern ihn um 70 %, 20 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> um 80 %. Andere Untersuchungen zeigen den Einfluss von Sulfat und Nitrat auf die anaerobe Abbauleistung von Reactive Red 141 [271]. Demnach haben Sulfatkonzentrationen von 1-10 mM keinen

Einfluss auf die anaerobe Reduktion, Nitratkonzentrationen 5mM verringerten sie um etwa 30%.

Die vorliegenden Beobachtungen der Azofarbstoffreduktionsleistung des anaeroben Bioreaktors und des aeroben Abbaus von p-Base zeigen, dass das anaerob-aerobe Behandlungsverfahren auch bei sehr hohen Salzbelastungen betrieben werden kann. Insbesondere bei der aerobe Biozönose ist zu berücksichtigen, dass Gradienten in der Salzbelastung eine Adaptionsphase erfordern. Die hemmende Wirkung der Salzgradienten war im anaeroben Bioreaktor in gleicher Weise nicht nachzuweisen. Für den kontinuierlichen Betrieb mit Abwässern, deren Salzbelastung ständig wechselt, ist zu empfehlen, diese vorher in einem Sammeltank zu vermischen, um den Salzgradienten möglichst klein zu halten.

#### 6.1.9.2 Abbauverhalten des Chemischen Sauerstoffbedarfs

Beim Vergleich des stoffspezifischen Abbauverhaltens von Modell- und Realabwässern wurde auch der Abbau des Chemischen Sauerstoffbedarfs untersucht. Die organische Belastung (CSB, TOC) der Realabwässer geht hauptsächlich auf den Einsatz von Textilhilfsmitteln sowie von Chemikalien zurück. Der Anteil der Farbstoffe am CSB liegt bei Realabwässern aus Färbereien < 5 % [26]. Bei den Modellabwässern liegt der Anteil nahezu bei 100%, wenn keine weiteren Chemikalien hinzugefügt werden. In der Abwasserverordnung wird für Konzentrate eine 80 %ige Reduktion der CSB-Belastung gefordert [9]-[10]. Der Grenzwert für die Einleitung von behandeltem Abwasser aus der indirekten Einleitung liegt bei 160 mg L<sup>-1</sup>.

Aufschluss über den CSB-Abbau gibt die Auswertung des Langzeitversuchs, der in Abbildung 106 dargestellt ist. Während der ersten Versuchsphase mit Modellabwasser wurde der CSB im anaeroben BMR nur im Bereich < 20% Abbau reduziert, wobei der CSB-Anteil des anfangs täglich zugeführten Ethanols (3 mL d<sup>-1</sup>) mit 140 mg L<sup>-1</sup> zu vernachlässigen war. In Phase 3 (Realwasser) wurde ein prozentualer Zuwachs des CSB festgestellt. Die Ursache hierfür geht aus der Darstellung der absoluten CSB-Werte in der linken Darstellung hervor. Die CSB-Raumbelastung der Phase 2 lag um etwa 3 g L<sup>-1</sup> höher als in Phase 2, was aufgrund der hydraulischen Verweilzeit von 12,5 Tagen zu einer Verschleppung der hohen Belastung führte, die bezogen auf die aktuelle Raumbelastung in einem CSB-Zuwachs resultierte. Gegen Ende der Phase 3 nahm dieser Zuwachs wieder deutlich ab.

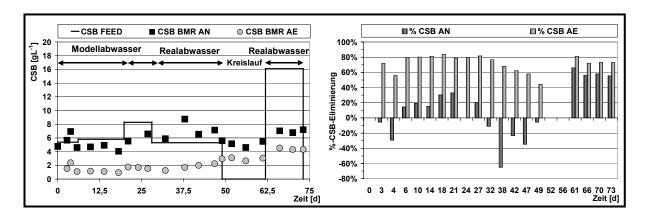


Abbildung 106: Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) des Zulaufs sowie im anaeroben und aeroben Bioreaktor: Links – Absolute Konzentrationen; Rechts – CSB-Abbau bezogen auf die Zulaufkonzentration im anaeroben (AN) und aeroben Bioreaktor (AE); (Vorzeichen: Abbau +, Zuwachs -)

Bei der kontinuierlichen Zugabe des hoch-CSB-belasteten Realabwassers (62. – 75. Betriebstag) stellte sich erstmalig ein stabiler CSB-Abbau im anaeroben Bioreaktor ein, der

bei etwa 55% lag. Die Realflotte der TVU zeichnete sich durch eine geringe Farbigkeit und durch einen hohen CSB sowie hohe Salzgehalte aus. Aufgrund des anaeroben CSB-Abbaus ist anzunehmen, dass es sich bei den CSB verursachenden Verbindungen um leicht abbaubare Schlichtemittel und Textilhilfsmittel handelt, die im Mischabwasser enthalten waren.

Der eigentliche CSB-Abbau wurde insgesamt bei der oxidativen Behandlung im aeroben BMR beobachtet. Hier lagen die Konzentrationen zwischen 1-4  $g_{CSB}$  L<sup>-1</sup> bei Zulaufkonzentrationen aus dem anaerobern Bioreaktor von 4 bis 9  $g_{CSB}$  L<sup>-1</sup>. Die prozentuale Eliminierung des CSBs ist in Abbildung 106 (rechts) dargestellt. Im Zeitraum der ersten 30 Betriebstage konnte eine 80 %ige Eliminierung durch die aerobe Behandlung erzielt werden. In den folgenden 20 Betriebstagen war ein Absinken auf etwa 45 % CSB-Abbau zu beobachten, das mit der Zugabe des Realabwassers in Phase 3 einher ging. Es ist anzunehmen, dass das Absinken des CSB-Abbaus auf einen höheren Anteil an schlecht abbaubaren CSB im Realabwasser zurückzuführen ist. Der hemmende Einfluss durch die Steigerung des Salzgehaltes von etwa 35 g L<sup>-1</sup> auf 45 g L<sup>-1</sup> wurde am Abbau der p-Base in diesem Zeitraum nicht beobachtet und ist damit nicht unbedingt auf das Absinken der CSB-Abbaurate zu übertragen.

Bei der Behandlung weniger belasteter Mischabwässer mit einem CSB von 1,3 g  $L^{-1}$  aus Textilfärbereien mit vergleichbaren industriellen anaerob-aeroben Verfahren wurden 50 % CSB-Abbau erreicht [135]. Der CSB-Abbau bei der anaerob-aeroben Behandlung von Abwasserkonzentraten mit Farbstoffgehalten von bis zu 40 g  $L^{-1}$  und Salgehalten von bis zu 80 g  $L^{-1}$  lag bei 43 – 72 % [31]. Untersuchungen, bei denen ausschließlich Modellabwässer mit Reactive Black 5 untersucht wurden, beschreiben CSB-Abbauraten von 15 % in anaeroben Bioreaktoren und von insgesamt 90 % bei aerober Nachbehandlung [264].

Der CSB-Abbau in der vorliegenden Untersuchung liegt mit durchschnittlich 80 % Abbau nur um 10 % darunter. Durch die eingesetzte Membranrückhaltung am aeroben Reaktor kann der CSB-Abbau insgesamt auf 95 % erhöht werden und erfüllt damit die gesetzlichen Anforderungen zum geforderten CSB-Abbau von Konzentraten in Höhe von 80%.

### 6.2 Untersuchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Orange 16

Der Farbstoff Reactive Orange 16 gehört neben Reactive Black 5 und Reactive Orange 107 zu der Farbstofftrichromie "Marineblau", die bei der Färbung von Baumwollfaser beispielsweise in der Garnfärbung eingesetzt wird. Reactive Orange 16 wurde bereits in Kapitel 5.1 (Seite 40) erwähnt. Seine Abbaubarkeit in realen Abwässern aus einer Färbung mit Marineblau konnte in Kapitel 6.1.3.1 (Seite 128) gezeigt werden. Hier zeigt sich in Abbildung 75 (Seite 130) ein ähnliches Verhalten ds Redoxpotentials bei Reative Orange 16 wie bei Reaktive Black 5. Im folgenden sind die Ergebnisse der Einzeluntersuchung von Reactive Orange 16 dargestellt.

# 6.2.1 LC-MS-Identifizierung von Inhaltsstoffen des Abwassers und seinen Abbauprodukten

Reactive Orange 16 und seine Abbauprodukte wurden einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die gewonnenen Diode-Array-Detektor-Chromatogramme werden im Weiteren dargestellt. Die chromatographischen Peaks werden in den Chromatogrammen mit Abkürzungen der chemischen Namen und die nicht identifizierten Stoffe mit UNK (Unknown) gekennzeichnet. Zur Ermittlung von Strukturen wurden LC-MS-Messungen mit Scan-Ionen-Modi, wie Full Scan Modus, Produktionen-Modus und Vorläuferionen-Modus durchgeführt. In Tabelle 45 und

Tabelle 46 werden die Zusammensetzung der Handelsware Reactive Orange 16, ihres Hydrolysates sowie die Abbauprodukte der anaeroben und aeroben Behandlung zusammengefasst. Aus der massenspektrometrischen Untersuchung werden für die Inhaltstoffe des Abwassers chemische Strukturen abgeleitet. Die einzelnen Stoffe, ihr Fragmentierungsverhalten und die Strukturvorschläge werden im Weiteren ausführlicher besprochen.

Tabelle 45: Zusammensetzung der Handelsware Reactive Orange 16 und ihrer Nebenverbindungen

Verbindung	Abkürzung	Molare Masse	Retentionszeit [min]	
verbindung	Abkurzung	[g/mol]	TBAAc- Methode	NH4Ac- Methode
Reactive Orange 16 Orginal	RO16-O	573	8,7	7,0
Reactive Orange 16 Vinylform	RO16-V	475	8,4	-
Reactive Orange 16 ohne Acetyl	RO16-NA	451	7,2	8,2
Reactive Orange 16 Hydrolysat	RO16-H	493	7,3	7,9
Naphthalinsulphonsäure	NSA	208	7,8	7,0
Naphthalindisulphonsäure	NDSA-a	288	8,0	-
	NDSA-b	288	8,2	-
6-Acetylamino-4- naphthalinsulphonsäure	NANSA	265	6,5	5,0
6-Acetylamino-4-hydroxy-naphthalin-2-sulphonsäure	NAHNSA	281	6,6	6,7
Olygomere Naphthalinsulphonsäuren:				
Dimer	SNFC-2	426	8,7	~8,6
Trimer	SNFC-3	645	9,0	~8,6
Tetramer	SNFC-4	864	9,3	~8,6
Pentamer	SNFC-5	1083	9,5	~8,6

Tabelle 46: Abbauprodukte von Reactive Orange 16

Vorkindere	Able	Molare	Retentionszeit [min]	
Verbindung	Abkürzung	Masse [g/mol]	TBAAc- Methode	NH4Ac- Methode
2-(4-Aminobenzensulfonyl)- ethanol	p-Base	201	2,5	-
Sulfanilsäure	s-acid	172	4,8	-
6-Acetylamino-3-dioxo-3,4-				
dihydronaphthalinsulphonsäure	NA-DAHNSA <sub>DP2</sub>	295	6,4	6,5
6-Acetylo-3-amino-4-				
hydroxynaphthalinsulphonsäure	NA-DAHNSA <sub>DP3</sub>	296	-	2,7
6-Acetylamino-3,4-				
dihydroxynaphthalinsulphonsäure	NA-DAHNSA <sub>DP4</sub>	297	7,2	7,0
Hydroxysubstituierte	=			
NA-DAHNSA <sub>DP1</sub>	NA-DAHNSA <sub>DP5</sub>	310	6,5	6,6
Kopplungsprodukt der p-Base mit				
6-Acetylo-3-amino-4-	D040 D : 4	400		
hydroxynaphthalinsulphonsäure	RO16-Derivat	493	7,0	6,6
6-Amino-3,4-dioxo-3,4-	DALINIOA	050	0.4	4.0
dihydronaphthalin-2-	DAHNSA <sub>DP2</sub>	253	6,1	4,9
sulphonsäure				
3,6-Diamino-4- hydroxynaphtahlin-2-	DVHVCV	254		2.5
sulphonsäure	DAHNSA <sub>DP3</sub>	204	-	2,5
6-Amino-3,4-				
dihydroxynaphthalin-2-	DAHNSA <sub>DP4</sub>	255		4,6
sulphonsäure		255		7,0
Hydroxysubstituierte				
DAHNSA <sub>DP1</sub>	DAHNSA <sub>DP5</sub>	268	6,0	4,7
UNK 242	UNK 242	243	7,1	_
UNK 225	UNK 225	226	6,2	5,1
UNK 478	UNK 478	479	8,2	7,2
UNK 688	UNK 688	-	7,8	~9,0
UNK 871	UNK 871	-	8,2	~9,5
UNK 565	UNK 565	-	-	~11,0
UNK 156	UNK 156	-	-	~12,5
UNK 214	UNK 214	-	-	~13,5
UNK 606	UNK 606	-	7,3	5,8
UNK 662	UNK 662	-	7,5	7,6

# 6.2.1.1 Zusammensetzung der kommerziellen Handelsware Reactive Orange 16

Die Handelsform von Reactive Orange 16 enthält neben dem Farbstoff auch andere Stoffe wie Synthesenebenprodukte, anorganische Salze, wie NaCl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, und Zusatzmittel. Die Zugabe von Salzen und organischen Zusatzmitteln dient der Verbesserung der Löslichkeit und des Rührverhaltens. Als Zusatzmittel werden der Farbflotte Naphthalinsulfonat-Formaldehyd-Sulfonate (SNFC) zugesetzt. Die polymeren Naphthalinsulphonate begleiten in Färbeprozessen monomere Naphthalinsulfonate, die als Ausgangsmaterialien zur Synthese von SNFC verwendet werden oder in Nebenreaktionen entstehen [268].

Die Zusammensetzung der Handelsware RO16 wird im Folgenden diskutiert. In Abbildung 107 ist ein Diode-Array-Detektor-Chromatogramm von Reactive Orange 16 dargestellt.

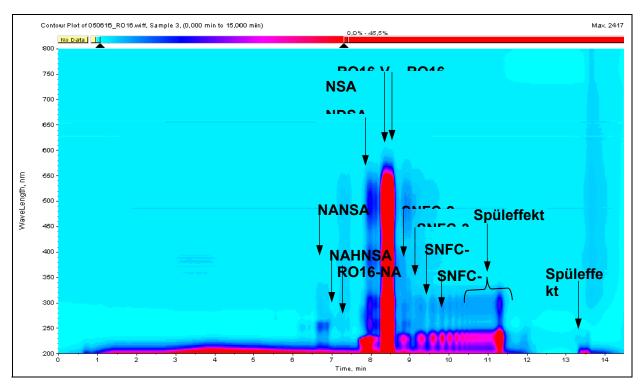


Abbildung 107: DAD-Chromatogramm der Handelsware Reactive Orange 16 (TBAAc-Methode)

Die Handelsware enthält neben dem Farbstoff (RO16-O) seine Vinylform (RO16-V), Ausgangsstoffe zur Farbstoffsynthese (NAHNSA), Nebenprodukte der Synthese (NANSA), polymere (SNFC) und monomere Naphthalinsulfonate (NSA, NDSA). Die genannten Stoffe wurden massenspektrometrisch untersucht, sowohl im Negativ-, als auch im Positiv-Ionen-Modus. Alle zeigen mit negativer Ionisierung bessere Ionisierbarkeit als mit positiver Ionisierung. Der Farbstoff Reactive Orange 16 weist das typische Fragmentierungsverhalten der Azobindung bei Azofarbstoffen auf Abbildung 108. Es wird eine sog. Azo-Typ-Spaltung beobachtet, die auf der Spaltung der C-N-Bindung des Azofarbstoffes beruht. Nach Literaturangaben erfolgt die Spaltung bei negativer Ionisierung im Produktionen-Modus vor allem auf der sulfonsäuretragenden Seite des Moleküls [248]. Die Spaltung kann von einem Wasserstoffatomtransfer zum Fragmention begleitet werden. In der Literatur wird auch die Keto-Typ-Spaltung beschrieben, wobei die -N=N-Bindung gespaltet wird. Sie tritt bei orthooder para-Hydroxy-Azoverbindungen auf, die in der tautomeren Ketohydrazonform vorliegen.

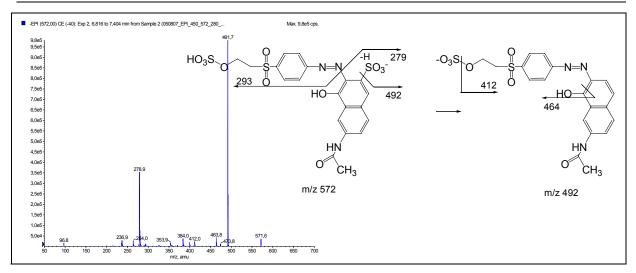


Abbildung 108: Produktionenspektrum und Fragmentierungsweg von Reactive Orange 16 (RO16-O)

Analog zu RO16-O erfolgt die Fragmentierung der Vinylform des Farbstoffes (RO16-V) mit der Azo-Typ-Spaltung der Azobindung (Abbildung 109). Wie bei der orginalen Form des RO16 wird das intensive Ion m/z 279 und außerdem das Ion m/z 446 beobachtet, das durch die Abspaltung von Ethylen, bzw. Kohlenmonoxid entsteht.

Im Fragmentierungsschema von RO16-NA findet sich ein intensives, aus der Azo-Typ-Spaltung kommendes Ion, das durch die Spaltung der Bindung auf der p-Base-Seite des Moleküls entsteht (m/z 266) und ein weniger intensives Ion aus der Azo-Typ-Spaltung auf der sulphonsäuretragenden Seite (m/z 238, Abbildung 109). Es werden auch die durch die Keto-Typ-Spaltung gebildeten Ionen gefunden (m/z 199, m/z 170, m/z 107).

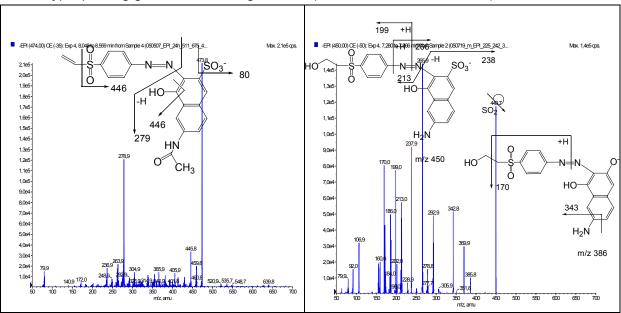


Abbildung 109: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von Reactive Orange 16. Links: Vinylform (RO16-V). Rechts: Reactive Orange 16 ohne N-Acetylgruppe (RO16-NA)

In Abbildung 110 sind die Produktionenspektren und das Fragmentierungsschemata des Ausgangsstoffes (NAHNSA) und des Nebenproduktes der Azofarbstoffsynthese (NANSA) dargestellt. In beiden Produktionen treten intensive Ionen auf, die durch die Eliminierung von Schwefeldioxyd gebildet werden. Das Ion m/z 80 entspricht der Abspaltung von SO<sub>3</sub>. Das Fragmention SO<sub>3</sub> sowie die SO<sub>2</sub>-Eliminierung sind Hinweise auf die Sulphongruppe im

Molekül. Die Ionen m/z 237 im NAHNSA- und m/z 221 im NANSA-Produktionenspektrum weisen auf die Abspaltung der Acetylgruppe aus Quasimolekülionen hin.

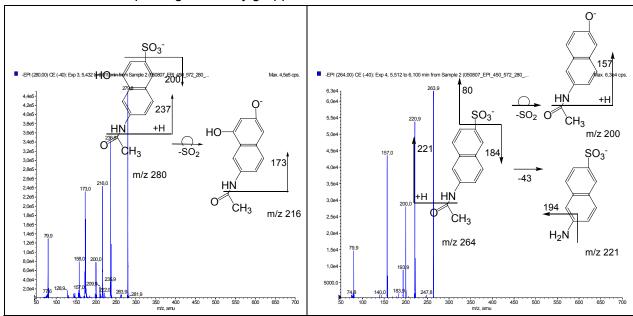


Abbildung 110: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von: Links-6-Acetylamino-4-hydroxy-naphthalin-2-sulphonsäure (NAHNSA) und rechts - 6-Acetylamino-4-naphthalinsulphonsäure (NANSA)

In der Handelsware Reactive Orange 16 wurden 4 unterschiedliche olygomere Naphthalinsulfonate mit Polymerisationsgrad von 2 bis 5 beobachtet: Dimer  $C_{21}H_{14}S_2O_6$ , Trimer  $C_{32}H_{21}S_3O_9$ , Tetramer  $C_{43}H_{28}S_4O_{12}$  und Pentamer  $C_{54}H_{35}S_5O_{15}$  (entspricht n=1-4 in Abbildung 111).

Abbildung 111: Struktur polymerer

#### Naphthalinsulphonate

Unter Einsatz des Ionenpaarreagenzes TBAAc und der Kationsuppression wurden sie als mehrfach geladenen Ionen detektiert. Ihre Ladung entspricht der Zahl von Sulphongruppen im Molekül (SNFC-2: m/z 213, SNFC-3: m/z 215, SNFC-4: m/z 216, SNFC-5: m/z 217). Ansonsten werden in Massenspektren weniger intensive Peaks der einfach geladenen Quasi-Molekülionen oder niedriger, gewöhnlich zweifach, geladenen Ionen beobachtet. Die einfach geladenen Polynatriumaddukte werden im Gegensatz zur Beobachtung von Storm nicht detektiert [268]. Sie lassen sich dagegen in Massenspektren beobachten, die unter Einsatz von Ammoniumacetat für die chromatografische Trennung aufgenommen wurden. Mit dieser Methode werden auch intensive Peaks von einfach geladenen (M-Na)-lonen und Peaks der zweifach geladenen Ionen beobachtet. In Abbildung 112 werden die Full-Scan-Massenspektren dargestellt. die beiden Methoden, TBAAc-Methode mit Kationsuppression und NH<sub>4</sub>Ac-Methode, entnommen wurden.

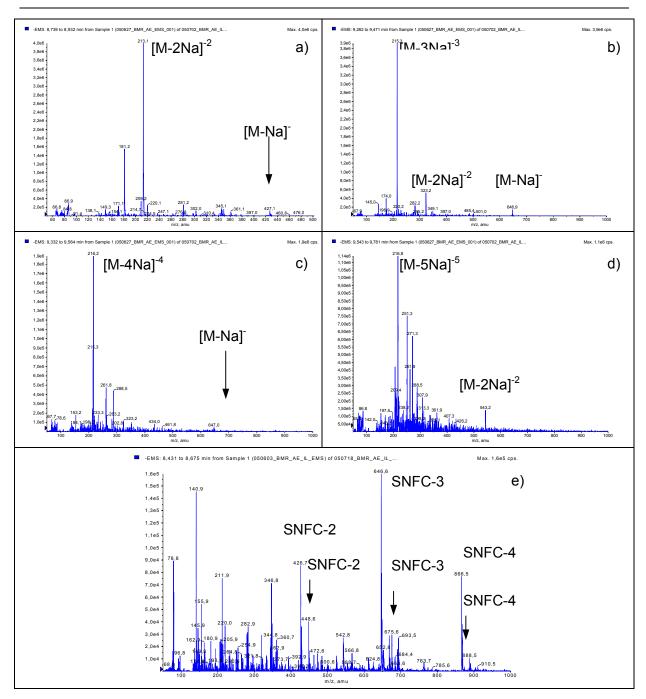


Abbildung 112: Massenspektren polymerer Naphthalinsulphonate: TBAAc-Methode mit Kationsupression: SNFC-2 (a), SNFC-3 (b), SNFC-4 (c), SNFC-5 (d), NH<sub>4</sub>Ac-Methode: SNFC-2, SNFC-3 und SNFC-4 (e)

Außer den polymeren Naphtahlinsulphonaten lassen sich in der Handelsware einfach (NSA) oder zweifach (NDSA) sulphonierte Monomere beobachten. Die beiden Verbindungen zeigen die typische für sulphonierte organische Verbindungen SO<sub>3</sub>- und SO<sub>2</sub>-Abspaltung. Die durch die Abspaltung entstehenden Ionen weisen im Weiteren Kohlenmonoxid-Abspaltung (M=28) auf, die zur Bildung eines stabilen Benzocyclopentadienylanions führen (Abbildung 113).

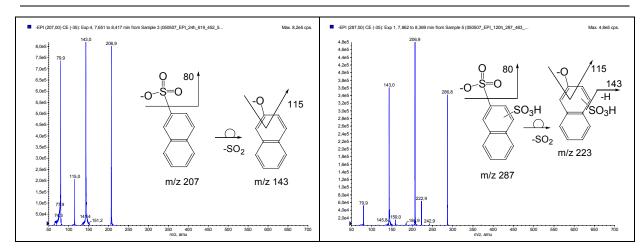


Abbildung 113: Massenspektrum und Fragmentierungsschema der monomeren Naphthalinsulphonate. Links: Naphthalinsulphonsäure (NSA -) und rechts: Naphthalindisulphonsäure (NDSA-isomer "a")

### 6.2.1.2 Produkte der Hydrolyse von Reactive Orange 16

Für die anaerobe Behandlung wurde Reactive Orange 16 in die hydrolysierte Form und die Vinylform überführt. Das erhaltene Hydrolysat wurde der LC-MS-Analyse unterzogen. Nach Literaturangaben unterliegen Azofarbstoffe unter alkalischen Bedienungen zwei möglichen Reaktionswegen: einer basenkatalysierten Eliminierung des Sulphonsäureesters zur Vinylform oder einer Hydrolyse (Abbildung 114).

Abbildung 114: Hydrolysewege des Farbstoffes Reactive Orange 16

Im Hydrolysat wurden die hydrolysierte Form des Farbstoffes (RO16-H) sowie die Vinylform des Farbstoffes (RO16-V) beobachtet. Das Hydrolysat enthält auch die desacetylierte Form des hydrolysierten Farbstoffes (RO16-NA) und die in der nicht-hydrolysierten Handelsware detektierten Stoffen: monomeren (NSA, NDSA) und polymere Naphthalinsulphonate (SNFC) und Synthesenebenprodukte (NAHSA, NAHNSA). Die Fragmentierung des hydrolysierten Farbstoffes wurde untersucht und ist in Abbildung 115 dargestellt. RO16-H zeigt eine für phenolische Strukturen typische Kohlendioxyd-Abspaltung [251] und Azo-Typ-Spaltung der

Azobindung. Außerdem wird eine  $SO_2$ - und  $SO_3$ -Abspaltung beobachtet. Das  $SO_3$ -Fragment wird als Neutralteilchen abgespaltet und tritt auch als Radikalion auf. Die Sulphonylethanolgruppe wird unter der Wasserstoffübertragung aus dem Phenolring als Neutralteilchen abgespaltet.

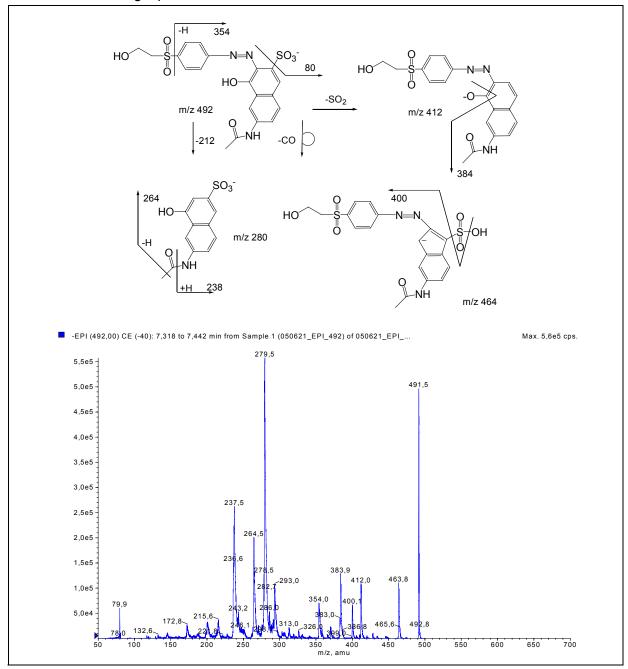


Abbildung 115: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von Reactive Orange 16 Hydrolysat (RO16-H)

### 6.2.1.3 Anaerobe Abbauprodukte von Reactive Orange 16

Die Abbauprodukte der anaeroben Behandlung wurden mittels zweier unterschiedlicher chromatographischen Methoden erfasst, die bereits diskutiert worden sind. Die mit beiden Methoden aufgenommenen DAD-Chromatogramme des anaerob behandelten Abwassers sind in Abbildung 116 dargestellt. Mittels der ionenpaarchromatographischen Methode mit Tetrabutylammoniumacetat ließen sich nicht alle im Abwasser vorhandene Stoffe nachweisen. Der Grund dafür kann die Suppression der kationischen Verbindungen auf dem

Kationaustauscher sein. Zur Detektion dieser Stoffe wurde eine Methode mit Ammoniumacetat als Pufferzusatz an einer Phase mit polarer Selektivität eingesetzt.

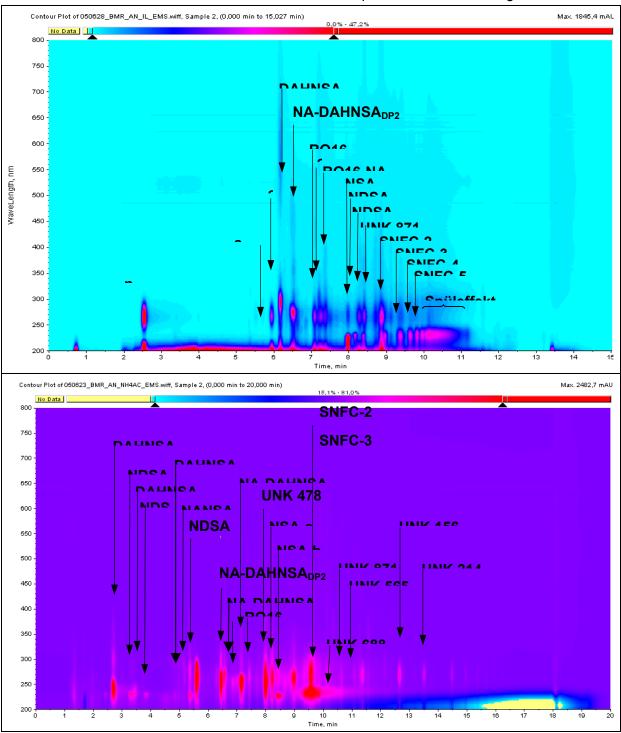


Abbildung 116: DAD-Chromatogramme der Reaktionslösung aus dem anaeroben Reaktor mit der TBAAc-Methode (oben) und mit der NH<sub>4</sub>Ac-Methode (unten)

Alle identifizierten Intermediate des anaeroben Abbaus von Reactive Orange 16 entstehen durch die reduktive Azobindungsspaltung, wobei Phenylamino-Derivate (p-Base und Sulfanilsäure) und Aminohydroxynaphtahlin-Derivate gebildet werden. Unter Naphthalinderivaten finden sich N-Acetylamino-hydroxyamino-naphtahlinsulphonsäure-Derivate (als NA-DAHNSA gekennzeichnet), die in hydrolisierten und oxidierten Formen vorliegen. Weitere Naphthalinderivate sind Hydroxydiamino-naphthalinsulphonat-Verbindundungen (DAHNSA), die aus NA-DAHNSA durch Hydrolyse der Acetylaminogruppe

zur Aminogruppe entstehen und analog zu NA-DAHNSA in hydrolisierter und oxidierter Form auftreten. Als weiteres Abbauprodukt wird erstmalig ein Kopplungsprodukt der Abbauprodukte (RO16-Derivat) beobachtet.

Zu den in Abb. 22 mit UNK bezeichneten Stoffen wurden wegen schwacher Ionisierbarkeit im Electrospray oder aufgrund weniger Strukturinformationen in den Produktionenspektren keine Strukturvorschläge gemacht (Produktionenspektren: Anhang). Die mit Fragenzeichen gekennzeichneten Peaks wurden massenspektrometrisch wegen ihrer Suppression am Kationaustauscher nicht detektiert.

Die Fragmentierung der p-Base und der Sulfanilsäure wurde ebenso untersucht (Abbildung 116). Die p-Base spaltet Radikale HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>· HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>· und Methanolteilchen ab. Durch Umlagerung der Sulphonylgruppe SO<sub>2</sub> entsteht das Fragmention m/z 107. Die Sulfanilsäure spaltet SO<sub>3</sub> -lon und das Neutralteilchen SO<sub>2</sub> ab.

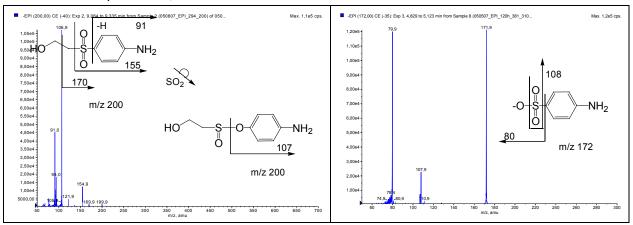


Abbildung 117: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von p-Base und Sulfanilsäure

Drei Acetylamino-hydroxyamino-naphtahlinsulphonsäure-Derivate sind im anaeroben Reaktor zu beobachten: 6-Acetylamino-3-dioxo-3,4-dihydronaphthalinsulphonsäure (NA-DAHNSA $_{DP2}$ ), 6-Acetylo-3-amino-4-hydroxynaphthalinsulphonsäure (NA-DAHNSA $_{DP3}$ ) und 6-Acetyloamino-3,4-dihydroxynaphthalinsulphonsäure (NA-DAHNSA $_{DP4}$ ). Sie lassen sich mittels NH $_4$ Ac-Methode nachweisen. Unter Einsatz TBAAc-Methode wird im anaeroben Reaktor nur NA-DAHNSA $_{DP2}$  detektiert.

Aus der Literatur wurde das Auftreten der Verbindungen NA-DAHNSA hergeleitet [257]. Die durch reduktive Azobindung-Spaltung gebildete NA-DAHNSA $_{DP3}$  wird in wässriger Reaktionslösung zur NA-DAHNSA $_{DP4}$  hydrolysiert. Die beiden Verbindungen unterliegen beim Kontakt mit Luftsauerstoff spontan einer Oxidation zu NA-DAHNSA $_{DP1}$  und NA-DAHNSA $_{DP2}$  (Abbildung 117).

Abbildung 118: Hydrolyse- und Oxidationsprodukte von 6-Acetyloamino-3-Amino-3-Hydroxy-Naphtahlinsulphonat (NA-DAHNSA<sub>DP3</sub>)

Die Abbauprodukte NA-DAHNSA<sub>DP1</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> wurden auch von Stüber beobachtet [257]. In seiner Arbeit wurden Untersuchungen zur Reduktion des Farbstoffes Reactive Orange 16 mit Natriumdithionit durchgeführt. Ähnliche Verbindungen und ein analoges Verhalten wurden bei Abbauprodukten anderer Farbstoffe mit dem *ortho*-Hydroxysubstituierten Naphthalinring im Molekül festgestellt [260].

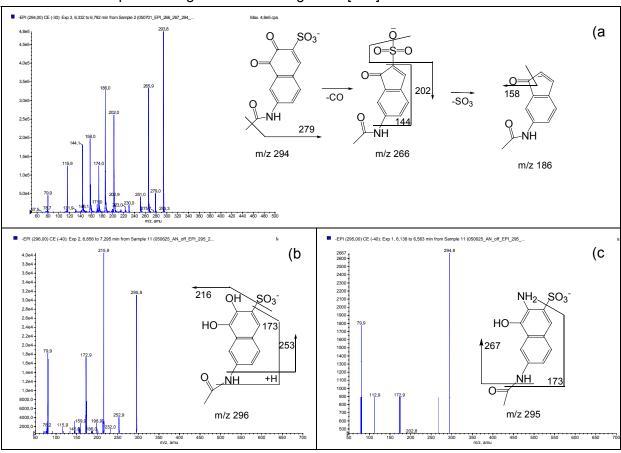


Abbildung 119: Produktionenspektren und Fragmentierungsschemata von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> (a), NA- DAHNSA<sub>DP4</sub> (b), NA-DAHNSA<sub>DP3</sub> (c)

Die Produktionenspektren der NA-DAHNSA-Verbindungen sind in Abbildung 118 dargestellt. Das Massenspektrum von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> wurde mit der TBAAc-Methode aufgenommen. Die anderen Verbindungen konnten mit der NH<sub>4</sub>Ac-Methode untersucht werden. NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> fragmentiert mit der Abspaltung von Kohlendioxyd, Schwefeldioxyd, Schwefeltrioxyd und einem N-Acetylaminoradikal. Die Eliminierung von Kohlendioxyd ist

typisch für phenolischen Verbindungen. Das SO<sub>3</sub>-Fragment und eine realtiv hohe Intensität des M+2-Isostop der Verbindung weisen auch auf das Vorhandensein der Sulphongruppe im Molekül hin. Die Identifikation der Verbindung wird durch Literaturangaben bestätigt [257]. Die Produktionenspektren von NA-DAHNSA<sub>DP3</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP4</sub> zeigen bei der zur chromatographischen Trennung eingesetzten NH<sub>4</sub>Ac-Lösung weniger Produktionen. In beiden Produktionenspektren werden Produktionen der Abspaltung von SO<sub>3</sub> und Ethanon aus der Acetylgruppe beobachtet.

Die *ortho*-aminohydroxysubstituierte Naphthaline sind sehr reaktive Verbindungen und können weiteren Reaktionen unterliegen. Sie sind am chinoiden Ring besonders in der 1,4-Position Nukleophilen zugänglich. Sie reagieren teilweise spontan mit Lösungsmitteln wie Wasser oder Alkoholen [257].

Im anaeroben Reaktor werden zwei Reaktionsprodukte von 6-Acetyloamino-3-imino-4-oxo-3,4-dihydronaphthalin-2-sulphonsäure (NA-DAHNSA<sub>DP1</sub>) gefunden: eine Verbindung mit zusätzlicher Hydroxylgruppe am Naphthalinring von NA-DAHNSA<sub>DP1</sub> (NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>) und ein Kopplungsprodukt der p-Base mit NA-DAHNSA<sub>DP1</sub> (RO16-Derivat). NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> wurde bei Storm genau untersucht [Storm]. Zur Ermittlung der Struktur hat er Experimente mit hochauflösenden MS-Geräten und mit deuterierten Molekülen durchgeführt. Seine Beobachtungen decken sich fast vollständig mit den in unserem Labor erhaltenen Ergebnissen der MS-Untersuchung der Verbindung NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und bestätigen damit den Strukturvorschlag.

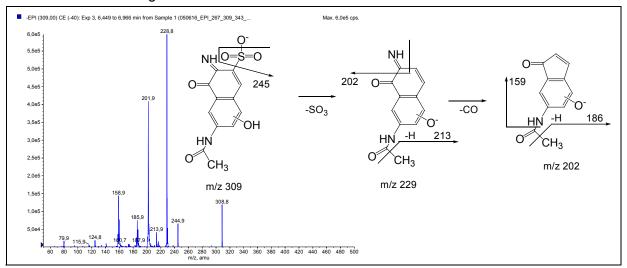


Abbildung 120: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>

Im Massenspektrum von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> treten intensive Ionen m/z 229, m/z 202 auf (Abbildung 120). Die Fragmente lassen sich entsprechend einem SO<sub>3</sub>- und CO-Verlust zuordnen. Die Eliminierung der Masse von 27 weist auf das Vorhandensein einer Aminooder Iminogruppe am aromatischen Ring des Moleküls hin. Außerdem werden aus dem Quasimolekülion m/z 309 das SO<sub>2</sub>-Teilchen (m/z 244), die Acetylgruppe (m/z 159) und das Methanmolekül (m/z 213 und m/z 186) aus der N-Acetylaminogruppe der Ionen m/z 229 und m/z 202 abgespaltet. Bei Storm wurde statt des Fragmentions m/z 186, das Fragmention m/z 187 beobachtet, das durch Methylradikalspaltung gebildet wurde. Die Position der Hydroxylgruppe konnte nicht ermittelt werden.

Das RO16-Derivat entsteht wahrscheinlich durch den nukleophilen Angriff der p-Base am Naphthalinring von NA-DAHNSA<sub>DP1</sub>. Die Verbindung fragmentiert unter Eliminierung von SO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> und HCN. In ihrem Spektrum findet sich das Fragmentierungsmuster von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> wieder (Abbildung 121). Es sind im Massenspektrum das Quasimolekülion m/z 309 und die Fragmentionen m/z 229 sowie m/z 202 zu beobachten. Fragmentionen m/z 335 und m/z 293 bestätigen die Identifikation der am Naphthalinring des RO16-Derivats als gekoppelten p-Base. Das Fragmention m/z 293 entsteht wahrscheinlich durch die Spaltung

der Bindung zwischen dem Naphthalinkohlenstoffatom und Sauerstoffatom am p-Base-Rest sowie durch die Wasserstoffübertragung zum Napthalinring. Das Fragmention m/z 335 kann durch die im Spektrum von p-Base gefundene Spaltung der Bindung zwischen dem aliphatischen Kohlenstoffatom und Schwefelatom unter Wasserstoffübertragung zum Schwefelatom gebildet werden.

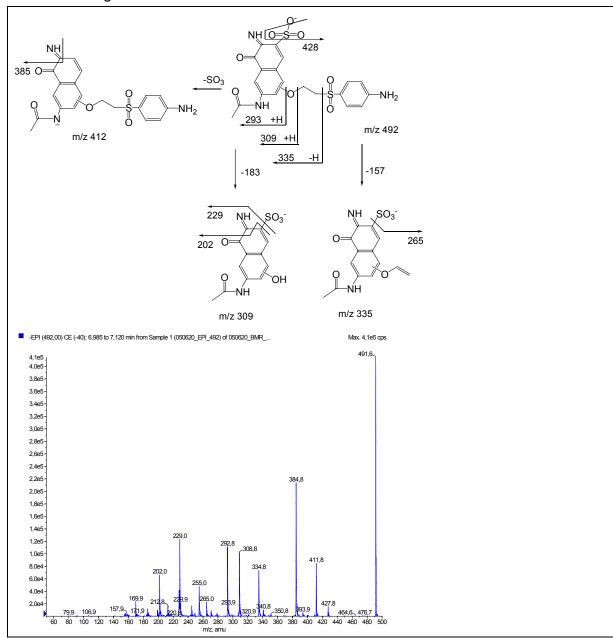


Abbildung 121: Produktionenspektrum und Fragmentierungsschema von RO16-Derivat

Weitere Abbauprodukte, Hydroxydiamino-Naphthalinsulphonat-Derivate (DAHNSA-Verbindungen) entstehen durch die Hydrolyse der N-Acetylaminogruppe der NA-DAHNSA-Verbindungen zur Aminogruppe. Sie liegen analog zu NA-DAHNSA in der nichthydrolysierten (DAHNSA<sub>DP3</sub>) und hydrolysierten, phenolischen (DAHNSA<sub>DP4</sub>) sowie chinoiden (DAHNSA<sub>DP2</sub>) Form vor. Ihr Auftreten lässt sich wie im Fall von NA-DAHNSA mit Hydrolyse und Oxidationsreaktionen in der Reaktionslösung erklären (siehe Abbildung 122).

### Verbesserung des biologischen Abbaus von Textilabwasserkonzentraten IV-9-042 537

Abbildung 122: Hydrolyse- und Oxidationsreaktionen von 3,6-Diamino-4-Hydroxynaphtahlin-2-sulphonsäure (DAHNSA<sub>DP3</sub>)

Ähnlich wie bei NA-DAHNSA ließ sich mit der TBAAc-Methode nur ein DAHNSA-Derivat, DAHNSA $_{DP2}$  detektieren. Mittels der NH $_4$ Ac-Methode wurden auch DAHNSA $_{DP3}$  und DAHNSA $_{DP4}$  beobachtet. In Abbildung 122 sind die Produktionenspektren der Verbindungen dargestellt. Im Produktionenspektrum von 6-Amino-3,4-dioxo-3,4-dihydronaphthalin-2-sulphonsäure (DAHNSA  $_{DP2}$ ) treten lonen auf, die durch die einfache und zweifache Eliminierung von CO gebildet werden. Das weist daraufhin, dass der Analyt zur Gruppe der Phenole oder Chinone gehört. Die CO-Eliminierung ist aber in den Massenspektren von 3,6-Diamino-4-hydroxynaphthalin-2-sulphonsäure (DAHNSA $_{DP3}$ ) und 6-Amino-3,4-dihydroxynaphthalin-2-sulphonsäure (DAHNSA $_{DP4}$ ) nicht zu beobachten. Die intensivsten lonen finden sich bei m/z 80 (SO $_3$ ) im Massenspektrum von DAHNSA $_{DP4}$ .

In den Proben aus dem anaeroben Reaktor wird auch ein Derivat der Verbindungen DAHNSA mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am Naphthalinring – 6-Amino-hydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-dihydronaphthalin-2-sulphonsäure (DAHNSA<sub>DP5</sub>) beobachtet. Die Position der Hydroxylgruppe konnte nicht ermittelt werden. DAHNSA<sub>DP5</sub> weist ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> auf (Abbildung 123). Im Produktionenspektrum treten intensive Fragmentionen aus der Eliminierung von SO<sub>3</sub> und HCN (m/z 187, m/z 160) aus dem Quasimolekülion auf.

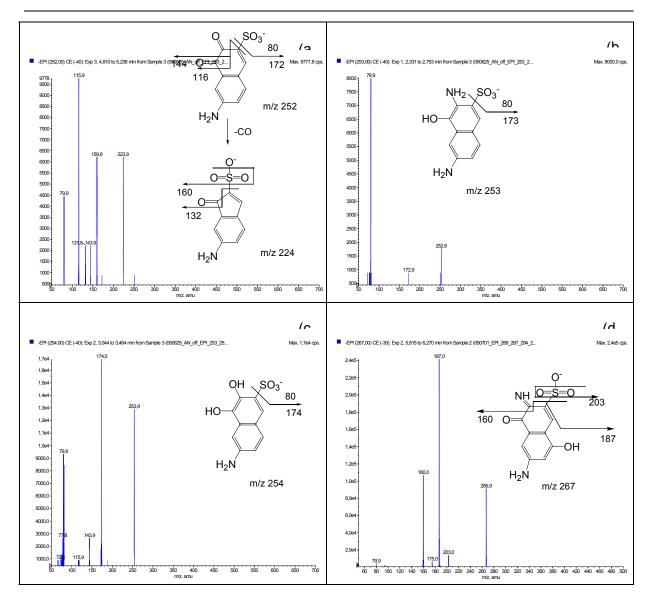


Abbildung 123: Produktionenspektren und Fragmentierungsschemata von DAHNSA<sub>DP2</sub> (a), DAHNSA<sub>DP3</sub> (b), DAHNSA<sub>DP4</sub> (c) und DAHNSA<sub>DP5</sub> (d)

### 6.2.1.4 Aerobe Abbauprodukte von Reactive Orange 16

Die LC-MS-Untersuchungen des aerob behandelten Abwassers haben Veränderungen seiner Zusammensetzung im Vergleich zur anaeroben Stufe gezeigt. Es werden intensive Peaks gefunden, die nicht oder schwer im anaeroben Reaktor nachweisbar sind. Im aeroben Reaktor wird der nahezu vollständige aerobe Abbau anderer Stoffe beobachtet. Eine Übersicht der Zusammensetzung des Abwassers gibt das in Abbildung 124 dargestellte Diode-Array-Detektor-Chromatogramm einer Probe aus dem aeroben Reaktor, gemessen mit der NH<sub>4</sub>Ac- und TBAAc-Methode.

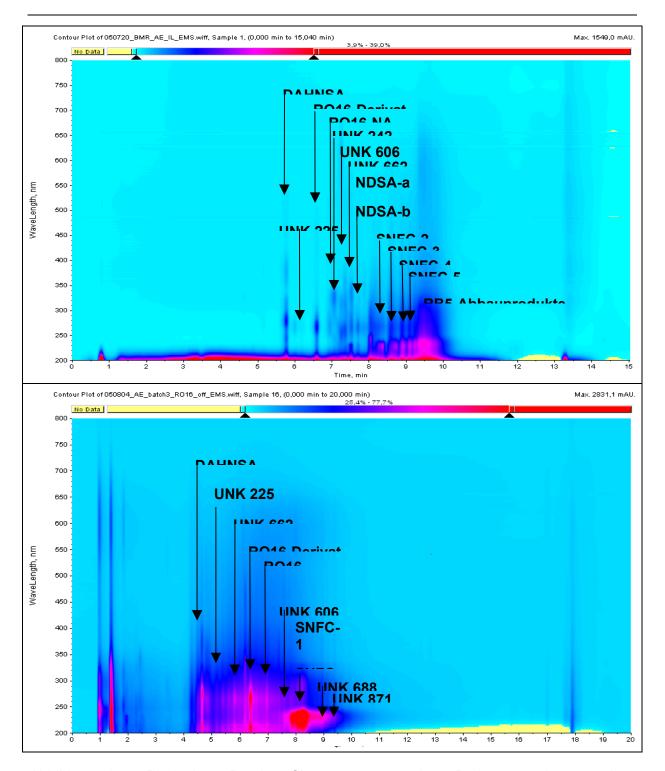


Abbildung 124: Diode-Array-Detektor-Chromatogramm einer Probe aus dem aeroben Reaktor mit der TBAAc-Methode (oben) und NH₄Ac-Methode (unten)\* Die nicht gekennzeichneten Peaks kommen aus den Abbauprodukten von Reactive Black 5

Unter den beschriebenen Verbindungen, die als NA-DAHNSA und DAHNSA bezeichnet werden, lassen sich im aeroben Reaktor nur 6-Acetyloamino-3,4-dihydroxynaphthalinsulphonsäure (NA-DAHNSA $_{DP4}$ ) und 6-Amino-hydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-dihydronaphthalin-2-sulphonsäure (DAHNSA $_{DP5}$ ) beobachten. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Hydrolyse der Aminohydroxy- und Iminooxonaphthalin-Derivate vollständig abgelaufen ist. Es sind keine chinoiden Verbindungen zu beobachten. Im aeroben Reaktor finden sich auch die im anaeroben Reaktor detektierten Verbindungen wie RO16-Derivat und olygomere Naphthalinsulfonate (SNFC).

Die mit UNK bezeichneten Peaks konnten nicht identifiziert werden. Produktionenspektren von UNK 688, UNK 871, UNK 662 und UNK 606 führen zu wenig Strukturinformationen über Fragmentionen niedrigerer Masse (Produktionenspektren: siehe Anhang). Die Produktionenspektren der Verbindungen UNK 242 und UNK 225 sind in Abbildung 125 dargestellt.

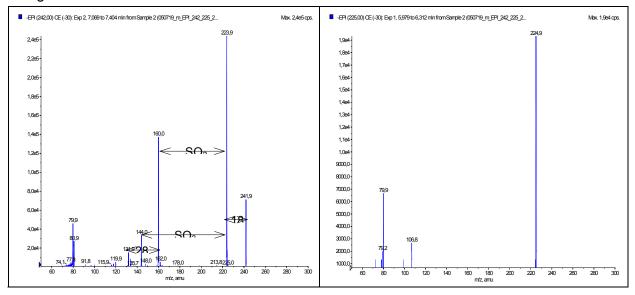


Abbildung 125: Produktionenspektren von UNK 242 (links) und UNK 225 (rechts)

Das Fragmention m/z 80 in den Produktionenspektren der unbekannten Verbindungen UNK 242 und UNK 225 und SO<sub>2</sub>-Abspaltung im Massenspektrum von UNK 242 sind ein Beleg für die Sulphonsäuregruppe in den Quasimolekülenionen. Aus den Produktionenspektren von UNK 225 konnten keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden. Die Eliminierung von H<sub>2</sub>O aus dem Molekülion m/z 242 im Massenspektrum von UNK 242 gibt Hinweise auf eine Hydroxyfunktionen. Der intensive Peak des Fragmentions m/z 224 im Vergleich zum Quasimolekülion m/z 242 in Produktionenspektren kann dafür sprechen, dass UNK 242 als Wasseraddukt auftritt. Die Massendifferenz M = 28 könnte auf eine CO-Eliminierung **UNK** hinweisen. Das Fragmentierungsverhalten von 242 ähnelt Fragmentierungsmechanismen von Naphthalinsulphonsäure-Derivaten. Trotzdem konnten die detektierten Massen der Fragmentionen und Quasimolekülionen keiner Struktur zugeordnet werden.

### 6.2.2 Monitoring der Entfärbung und stoffspezifische Zuordnung der UV-VIS-Absorption

Die Untersuchung der UV-VIS-Absorption bei einer definierten Wellenlänge ermöglicht die zur Einhaltung der nach der Abwasserverordnung Anhang 38 geforderte Entfärbung von Abwasserkonzentraten zu beurteilen. Die spektroskopische Bestimmung Absorptionskoeffizienten zur Auswertung der Farbigkeit des Abwassers wird nach einem in der Europäischen Norm DIN EN ISO 7887 Hauptabschnitt 3 vorgelegten Verfahren durchgeführt. Gemäß diesem Verfahren wird die Messung bei Raumtemperatur mittels UV-VIS-Spektrometer bei drei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt: 436 nm, 525 nm und 620 nm. Genauere Aussagen über die Entfärbeleistung der Entfärbeverfahren und den Anteil einzelner Abwasserkomponenten an der Gesamtfarbigkeit können aufgrund der UV-VIS-Informationen gemacht werden, die aus den Diode-Array-Detektor-Chromatogrammen gewonnen werden. Die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit erfolgt anschließend durch die massenspektrometrische Identifizierung der die Farbigkeit verursachenden Stoffe.

Die Entfärbeleistung wurde im anaeroben und aeroben Reaktor im Sichtbaren bei 436 nm und bei 525 nm (entsprechend der Absorptionsmaxima des Farbstoffes) sowie die

Absorption im ultravioletten Wellenlängebereich bei 270 nm mittels UV-VIS-Spektrometer untersucht. Die stoffspezifische Zuordnung der Restfarbigkeit wurde aufgrund der aus der LC-MS/MS-Messung gewonnenen Informationen durchgeführt. Entwicklung der UV-VIS-Absorption im anaeroben Reaktor Abbildung 126 zeigt die zeitliche Änderung der UV-VIS-Absorption im anaeroben Reaktor innerhalb des 31-tägigen Versuches mit einer kontinuierlichen Farbstoffzufuhr. Der Verlauf der gemessenen UV-VIS-Absorption blieb bis zum 12. Betriebstag konstant. Zwischen dem 12. und 17. Betriebstag wies sie Schwankungen im gelben und roten Bereich auf und zeigte nach dem 17. Betriebstag im ultravioletten sowie im gelben und roten Wellenlängenbereich eine deutliche Veränderung der Absorption. Eine Zunahme der Lichtabsorption war bei 270 nm von etwa 20 % und eine Abnahme bei 436 nm und 525 nm von etwa 10 bis 40% zu beobachten. Nach dem 26. Betriebstag wurde wieder eine Zunahme der Absorption im gelben und roten Bereich und eine Abnahme im UV-Bereich festgestellt. Die Absorption bei 436 nm erreichte nach dem 30. Betriebstag fast den maximalen Wert, bei 525 nm erhöhte sie sich auf das Niveau der ersten Tagen des Versuches und bei 270 nm sank sie um etwa 10 %. Diese Entwicklung der Absorptionsänderung ab dem 26. Betriebstag lässt sich auf die erhöhte Raumbelastung von 3,5 mML<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> im Bioreaktor zurückzuführen. Bei der im Bereich 0,7-2,8 mML<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> liegenden Raumbelastung wurde eine tendenzielle Abnahme der Farbigkeit des Abwassers beobachtet.

Trotz der bis zu 40%-igen Entfärbung des Abwassers ist die Entfärbung nicht ausreichend die durch den Gesetzgeber gestellten Anforderungen der 95%-ige Entfärbung von Abwasserkonzentraten zu erfüllen. Der Absorptionskoeffizient des Abwassers erreicht am 21. Betriebstag im sichtbaren Bereich bei der Wellenlänge von 436 nm den in der ganzen Messreihe niedrigsten Wert von 934 m<sup>-1</sup> und bei 525 nm den Wert von 672 m<sup>-1</sup>. Damit ist die nach der Abwasserverordnung Anhang 38 zugelassene Absorption des Abwassers im gelben Bereich DFZ = 7 m<sup>-1</sup> und im roten Wellenlängenbereich bei DFZ = 5 m<sup>-1</sup> an der Einleitungsstelle mehrfach überschritten.

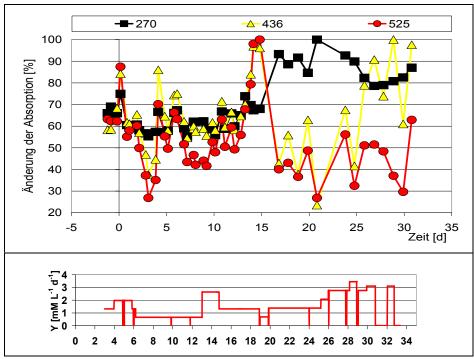


Abbildung 126: Entwicklung der Änderung der Lichtabsorption im UV-Bereich bei 270 nm und im VIS-Bereich bei 436 nm und 525 nm im anaeroben Reaktor (oben) und die Raumbelastung des anaeroben Bioreaktors (unten)

Die stoffspezifische Ursache der Farbigkeit im anaeroben Reaktor wurde chromatographisch untersucht. In Abbildung 127 und Abbildung 128 sind die am 11. und 21. Betriebstag berechneten Anteile der einzelnen Stoffe an der Lichtabsorption im gelben, roten und im UV-Wellenlängenbereich dargestellt. In dem sichtbaren Wellenlängenbereich bei 436 nm und 525 trugen am meisten die polymeren Naphthalinsulphonate zu der Gesamtfarbigkeit bei. Andere Stoffe, wie DAHNSA<sub>DP2</sub>, RO16-Derivat, RO16-Desacetyl, hatten einen viel geringeren Anteil an der Lichtabsorption. NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>, sowie RO16-Derivat und RO16-Desacetyl, die wegen der schlechten Trennung nicht als einzelne Stoffe betrachtet werden konnten, hatten am 21. Betriebstag einen höheren Anteil an den bei 436 nm und 525 nm lichtabsorbierbaren Stoffen gegenüber dem 11. Betriebstag. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des massenspektrometrischen MRM-Monitorings der Stoffe im anaeroben Reaktor. Es wurde ein Anstieg ihrer Konzentration von Beginn bis Ende des Versuches beobachtet.

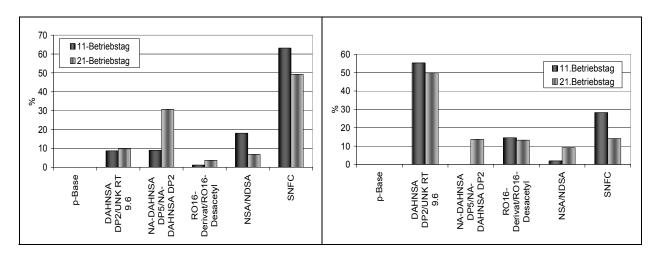


Abbildung 127: Stoffspezifische Zuordnung der Lichtabsorption bei 436 nm (links) und 525 nm (rechts) am 11. Betriebstag und 21. Betriebstag

Am 11. Betriebstag wiesen p-Base, DAHNSA<sub>DP2</sub>, UNK RT 6.9 (eine unbekannte Verbindung) und polymere Nahthalinsulphonate den höchsten Anteil an der UV-Absorption auf. Am 21. Betriebstag hat sich der Anteil von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub>, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>, RO16-Derivat und RO16-NA ähnlich wie bei der Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich gegenüber dem 11. Betriebstag deutlich erhöht. Am 21. Betriebstag wurde auch ein höherer Anteil an monomeren Naphthalinsulphonaten im Vergleich zum 11. Betriebstag festgestellt. Am 21. Betriebstag verteilt sich letztlich die UV-Absorption ungefähr gleich auf die im Diagramm dargestellten Gruppen der Analyten.

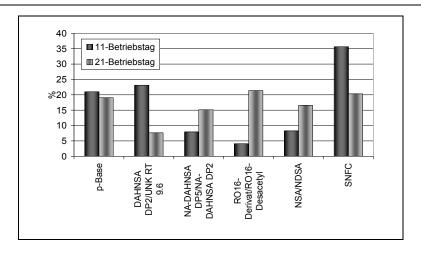


Abbildung 128: Stoffspezifische Zuordnung der Lichtabsorption 270 nm am 11. und 21. Betriebstag

### 6.2.3 Entwicklung der UV-VIS-Absorption im aeroben Reaktor

Im aeroben Reaktor wurden drei 5-7-tägige Batchversuche durchgeführt. Die Abbildung 129 zeigt den Verlauf der Lichtabsorption bei 270 nm, 436 nm und 525 nm innerhalb der Versuche. Im ersten Versuch war am 2.-4. Betriebstag eine 5-10%-ige Abnahme der Absorption in UV-, sowie in beiden sichtbaren Wellenlängenbereichen zu beobachten. Nach dem 4. Betriebstag nahm die Absorption bei allen Wellenlängen zu. Eine ähnliche Entwicklung der UV-VIS-Absorption wurde im zweiten Versuch beobachtet, wobei die VIS-Absorption bis zum 2. Betriebstag um fast 20 % sank und nach dem 4. Betriebstag eine Zunahme von etwa 15% aufwies. Innerhalb des dritten Versuches erfolgte über 7 Betriebstage eine sukzessive Zunahme der Lichtabsorption: im UV-Bereich um 10 % und im VIS-Bereich um etwa 20 %.

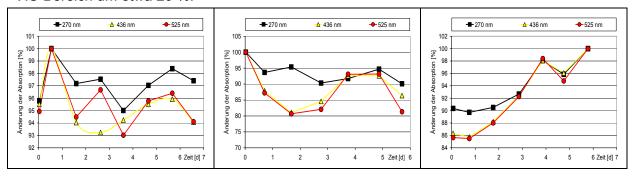


Abbildung 129: Entwicklung der Lichtabsorption im UV-Bereich bei 270 nm und im VIS-Bereich bei 436 nm und 525 nm im aeroben Reaktor: 1. Versuch – (a, 2. Versuch – (b, 3. Versuch - (c

Der Verlauf der Lichtabsorption im dritten Versuch wurde hinsichtlich der die Absorption verursachenden Stoffe chromatographisch untersucht. Aus den entnommenen Dioden-Array-Detektor-Chromatogramme konnte die UV-VIS-Absorption der Proben des 2. und 6. Betriebstags in der aeroben Stufe stoffspezifisch zugeordnet werden, die zu der Lichtabsorption bei den Wellenlängen 270 nm, 436 nm und 525 nm beitragen. Der Anteil an der Gesamtfarbigkeit einzelner Stoffe oder Stoffgruppen (wegen niedriger Selektivität der Säule konnten nicht alle Analyte getrennt werden) ist in der Abbildung 130 dargestellt.

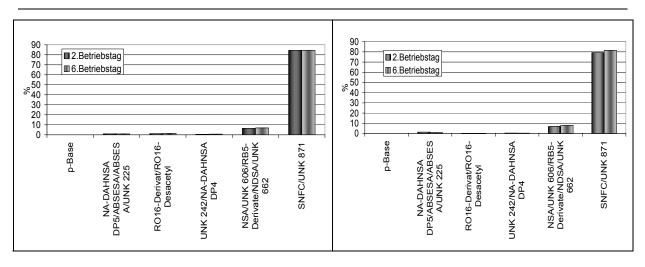


Abbildung 130: Stoffspezifische Zuordnung der Lichtabsorption bei 436 nm (links) und 525 nm (rechts) am 2. Betriebstag und 6. Betriebstag des 3. Versuches

Die Diagramme zeigen, dass die Hauptverursacher der Farbigkeit die polymeren Naphthalinsulphonate, UNK 871 und noch im Reaktor vorhandene Abbauprodukte der vorher durchgeführten Behandlung von Reactive Black 5 sind. Ihr Anteil an der Lichtabsorption bei den Wellenlängen 436 nm und 525 nm beträgt zirka 90 %. Weitere farbige Inhaltsstoffe des aeroben Bioreaktors sind monomere Naphthalinsulphonate, unbekannte UNK 661 und UNK 606 sowie weitere Abbauprodukte von Reactive Black 5. Aus den Diagrammen lassen sich aber keine deutlichen Veränderungen der Zusammensetzung der Proben vom 2. gegenüber dem 6. Betriebstag ableiten. Sie werden mittels des massenspektrometrischen MRM-Monitorings verfolgt.

Abbildung 131 zeigt die stoffspezifische Zuordnung der UV-Lichtabsorption am 2. und 6. Betriebstag. Den größten Anteil an der UV-Lichtabsorption hatten, wie im sichtbaren Wellenlängenbereich, die polymeren Naphtahlinsulphonate, UNK 871 und Abbauprodukte von Reactive Black 5. Am Ende des Versuches war ein vollständiger Abbau von p-Base zu beobachten. Gleichzeitig nahm am 6. Betriebstag im Vergleich zum 2. Betriebstag der Anteil an anderen Abbauprodukten und Synthesenebenprodukten des Farbstoffes zu.

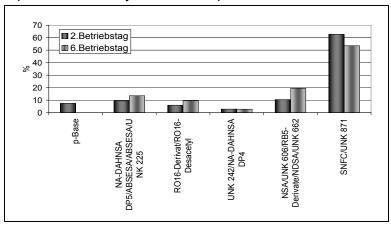


Abbildung 131: Stoffspezifische Zuordnung der Lichtabsorption bei 270 nm am 2. Betriebstag und 6. Betriebstag des 3. Versuches

#### 6.2.4 Massenspektrometrisches Monitoring der Einzelstoffe

Der Verlauf der Konzentrationen des Farbstoffes, seiner Nebenverbindungen und der Abbauprodukte der anaeroben und aeroben Behandlung im Batch-Versuch und im kontinuierlichen Betrieb wurden überwacht. Für das Monitoring der Stoffe wurde eine Online-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS- Analysenmethode eingesetzt. Die quantitative Ermittlung einzelner Stoffe erfolgte offline und online unter Einsatz des Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM) oder Full-Scan-Modus (EMS). Jede Online-Messreihe bestand aus einer Messung mit dem MRM-Modus, einer mit dem EMS-Modus, einer Messung der Standardlösung zur Kontrolle der Empfindlichkeit der Messungen, einer Blank-Messung und einem Spülschritt. Die Messreihen erfolgten jeweils in 4-8-stündigen Zeitabständen. Die Einzelstoffkonzentrationen wurden als integrierte Peakfläche von Diode-Array-Detektor [mAU\*min] und MS/MS-Detektor [cps\*min] ausgedrückt und als absolute oder relative Werte angegeben. Eine Übersicht der zum Monitoring verwendeten einzelnen Stoffe Modi befindet sich im Anhang.

#### 6.2.4.1 Anaerobe Behandlung

Der Abbau des hydrolysierten Farbstoffes (RO16-H) und seiner Vinylform (RO16-V) wurde im Batch-Versuch und bei der kontinuierlichen Betriebsweise untersucht. Für den Batch-Versuch wurde der anaerobe Bioreaktor mit zirka 35 L aus dem Abbau der Trichromie stammenden Schlammes und 5 L des Reactive Orange 16-Hydrolysat aufgefüllt. Der Versuch wurde ohne Ethanolzugabe zur Redoxpotentialsteuerung geführt. Der Abbau des Farbstoffes wurde untersucht.

Wie Abbildung 132 zeigt, wurden der hydrolysierte Farbstoff sowie seine Vinylform innerhalb von 2 Tagen vollständig abgebaut. Den Farbstoffabbau begleitet innerhalb der zwei Tage eine deutliche Zunahme der Konzentration seines Abbauproduktes, p-Base. Das Vorhandensein der p-Base im Reaktor am Anfang des Versuches war darauf zurückzuführen, dass sie auch im Schlamm aus der Behandlung von Reactive Black 5 vorhanden war. Aus der Darstellung der relativen Konzentration der Farbstoff-Derivate als Funktion des Redoxpotentials (Abbildung 132- links) kann abgeleitet werden, dass der Farbstoff unter dem Schwellenwert -310 nicht mehr im anaeroben Reaktor detektierbar war. Das Ergebnis wurde in einem Versuch mit einer kontinuierlichen Arbeitsweise bestätigt.

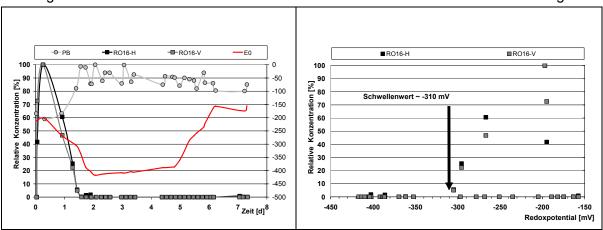


Abbildung 132: Online-MRM-Monitoring des Farbstoffes und des Redoxpotentials im anaeroben Bioreaktor im Batch-Versuch. Links: Zeitliche Entwicklung von RO16-H, RO16-V, p-Base und Redoxpotential. Rechts: Korrelation von RO16-H und RO16-V mit dem Redoxpotential

Es war bemerkenswert, wie sich im Lauf des Versuches das Redoxpotential entwickelte. Innerhalb der ersten 2 Tage war ein spontaner Abstieg und nach 5 Tagen wieder ein Anstieg des Redoxpotentials zu beobachten. Das Absinken des Redoxpotentials und die Abnahme

der Konzentration des Farbstoffes innerhalb der zwei ersten Tage des Versuches korrelierten mit der Zunahme der Konzentration der Abbauprodukte des Farbstoffes (Naphthalinsulphonsäure-Derivate). Die Konzentration von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub>, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> sowie DAHNSA<sub>DP2</sub> und DAHNSA<sub>DP4</sub> nahm bis zum zweiten Tag des Versuches deutlich zu. Es wurde weiter beobachtet, dass die relativen Konzentrationen von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> und DAHNSA<sub>DP2</sub> am 3. Betriebstag abnahmen und auf einem niedrigeren Niveau bis zum 5. Betriebstag verweilten. Am 7. Betriebstag erreichten die Stoffe ihre maximale Konzentration und sanken danach wieder. Die Abnahme ihrer Konzentration korreliert mit der Redoxpotentialabnahme.

Die Verläufe der Konzentrationen von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und DAHNSA<sub>DP5</sub> wiesen keine Abnahme zwischen dem 3. und 5. Betriebstag auf. Stattdessen wurde eine weitere Zunahme beobachtet, obwohl die Steigung ihrer Kurven in diesem Zeitraum geringer als an anderen Tagen war. Die maximalen Werte erreichten DAHNSA<sub>DP5</sub> am 6. und NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> am 7. Betriebstag. Die Zunahme des Redoxpotentials nach dem 6. Betriebstags konnte durch die steigende Konzentration der oxidierten Naphthalinderivaten erklärt werden: NA-DAHNSA<sub>DP2</sub>, DAHNSA<sub>DP2</sub>, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und DAHNSA<sub>DP5</sub>. Die Bildung der Abbauprodukte am 5. und 6. Betriebstag, die wahrscheinlich durch die Feed-Sauerstoffzufuhr zum anaeroben Reaktor ausgelöst wurde, könnte die Zunahme des Redoxpotentials verursacht haben. Wie in Abb. 39 (rechts) gezeigt, waren die Abbauprodukte vor allem bei dem niedrigen Redoxpotential im Reaktor vorhanden. Gleichzeitig waren die höchsten Konzentrationen der Stoffe bei -300 mV bis -200 mV zu detektieren.

Es kann angenommen werden, dass bei sinkender Konzentration von DAHNSA<sub>DP2</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> die entsprechenden reduzierten Derivate gebildet wurden. Darüber hinaus kann keine genaueren Aussagen gemacht werden, da die diese Verbindungen mit der zum Online-Monitoring eingesetzten TBAAc-Methode nicht quantitativ detektiert werden konnten.

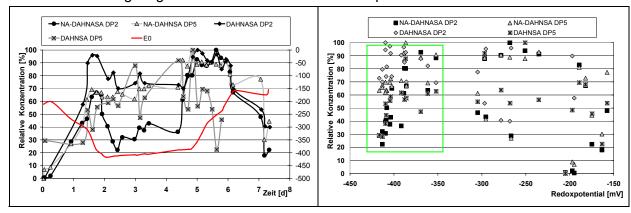


Abbildung 133: Online-MRM-Monitoring der Hauptprodukte des Farbstoffes RO16-H im Batch-Versuch. Links: Zeitliche Entwicklung der Abbauprodukte. Rechts: Korrelation mit dem Redoxpotential

Der Farbstoff und seine Abbauprodukte wurden auch im kontinuierlichen Betrieb bei unterschiedlicher Raumbelastung von 0,5 bis 3,5 mML<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> und Co-Substratzugabe (Ethanol) zur Redoxpotentialsteuerung untersucht. Die Betriebsparameter des anaeroben Reaktors sind in Abbildung 134 graphisch dargestellt.

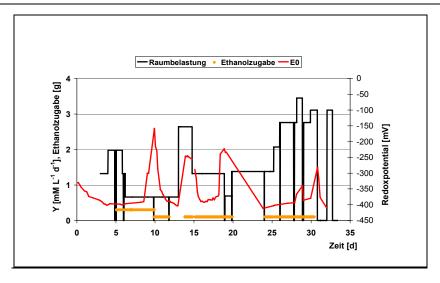


Abbildung 134: Betriebsparametern des anaeroben Bioreaktors

Wie bereits im Batch-Versuch ermittelt, konnte eine Korrelation des Farbstoffabbaus mit der Redoxpotentialentwicklung im anaeroben Bioreaktor auch während des kontinuierlichen Betriebes beobachtet werden. Die Darstellung in Abbildung 130 zeigt, dass zum vollständigen Abbau des Farbstoffes ein Redoxpotential von unterhalb -320 mV erforderlich war. Beim Überschreiten dieses Wertes ließ sich am 10., 13.-16. und 31. Betriebstag der unabgebaute hydrolysierte Farbstoff sowie seine Vinylform im Reaktor nachweisen. Der Anstieg der Farbstoffkonzentration kann auch auf die hohe Raumbelastung von 2,5 mML<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> am 13. – 15. Betriebstag zurückführt werden (siehe Abbildung 134), die zu einer Erhöhung des Redoxpotential beigetragen hat. Da ab dem 12. Betriebstag keine Ethanolzugabe erfolgte (Abb. 40), konnte das Redoxpotential am 13. – 15. Betriebstag auf dem niedrigen Niveau nicht gehalten werden.

In Abbildung 135 ist der Verlauf der Konzentration von einem Abbauprodukt, der p-Base dargestellt. p-Base zeigte einen Anstieg der Konzentration bis zum ungefähr 20. Betriebstag, danach blieb ihre Konzentration konstant und nach dem 23. Betriebstag konnte ein geringes Absinken bis zum Ende des Versuches beobachtet werden, was auf die Bildung des RO16-Derivats zurückführt werden konnte.

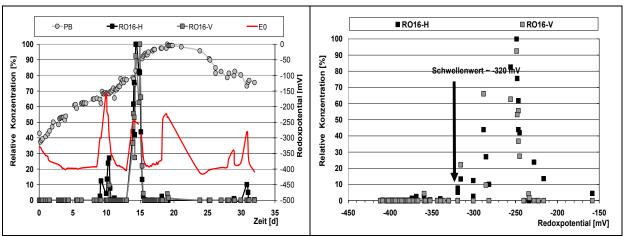


Abbildung 135: Online-MRM-Monitoring des Farbstoffes und des Redoxpotentials im anaeroben Bioreaktor mit kontinuierlicher Farbstoffzufuhr. Links: Zeitliche Entwicklung von RO16-H, RO16-V, p-Base und Redoxpotential. Rechts: Korrelation von RO16-H und RO16-V mit dem Redoxpotential

Das Monitoring des RO16-Derivats und anderer Hauptprodukte des Farbstoffes sind in der Abbildung 136 dargestellt. Die gewonnenen Ergebnisse der MRM-Messung von Abbauprodukten wurden jeweils auf die Peakfläche ausgewählter Peaks aus der Messung des Standards bezogen, die der Messung der zu untersuchenden Probe zeitlich entsprach. Die Messungen der Proben aus dem anaeroben Reaktor waren gegenüber den Messungen der Standardlösung um 0,5 bis 1 Stunde verzögert. Der Bezug auf die Standardmessung ermöglicht, die Fehler der in den längeren Zeitbereichen schwankenden Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Messung zu korrigieren.

RO16-Derivat, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> zeigten eine ähnliche Entwicklung der Konzentration im anaeroben Reaktor (Abbildung 136, links). Vom 13. bis zum 15. Betriebstag wurden niedrige Konzentrationen der Abbauprodukte beobachtet, die anschließend stark anstiegen. Bis zum letzen Tag des Versuches blieb die Konzentration der Stoffe mit Schwankungen auf ungefähr gleichem Niveau. Der Anstieg ihrer Konzentration am 13.-15. Betriebstag kann auf das hohe Redoxpotential sowie die erhöhte Feedzugabe zurückgeführt werden.

Die Verläufe der Konzentration von DAHNSA<sub>DP2</sub> und DAHNSA<sub>DP5</sub> waren sehr ähnlich. Aus den Verläufen konnte aber keine deutliche Tendenz der Änderung der Konzentrationen abgeleitet werden (Abbildung 136, rechts). Es wurde festgestellt, dass die höchste Konzentration den relativ niedrigen Werten des Redoxpotentials entsprach, bei welchem auch der Farbstoff vollständig abgebaut wurde. Der Verlauf der Konzentration von DAHNSA<sub>DP4</sub>, die möglicherweise mit der Konzentration von DAHNSA<sub>DP2</sub> negativ korreliert, konnte aber mit der zum Online-Monitoring eingesetzten TBAAc-Methode nicht ermittelt werden.

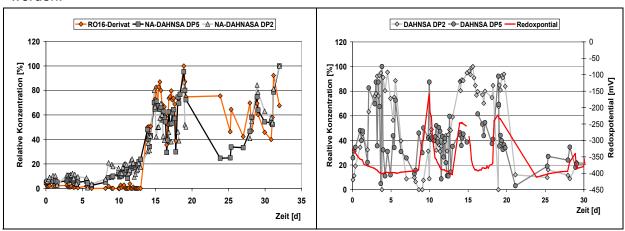


Abbildung 136: Online-MRM-Monitoring der Intermediate im anaeroben Bioreaktor bei kontinuierlichem Betrieb. Links: NA-DAHNSA $_{DP2}$ , NA-DAHNSA $_{DP5}$ , RO16-Derivat, rechts: DAHNSA $_{DP2}$ , DAHNSA $_{DP5}$ 

In Abbildung 137 ist der Verlauf der Naphthalinsulphonate dargestellt: in der linken Abbildung der Verlauf der monomeren Napthalinsulphonate, wie NSA, isomerische NDSA-a und NDSA-b und in der rechten Abbildung der Verlauf der Oligomere SNFC-2, SNFC-3 und SNFC-4. Die nahezu konstanten Konzentrationen der monomeren Naphthalinsulphonate wiesen darauf hin, dass sich diese Verbindungen anaerob nicht abbauen ließen. Mit Ausnahme der ersten Tage des Versuches, an welchen die Konzentration zunahm, blieb sie nachfolgend auf ungefähr gleichem Niveau. Die polymeren Naphthalinsulphonate zeigten eine leichte Zunahme der Konzentration ab dem ersten Betriebstag bis zum Ende des Versuches. Die hohen Schwankungen der Messung sind auf die schwache chromatographische Trennung der polymeren Naphthalinsulphonate und das starke Peaktailing zurückzuführen.

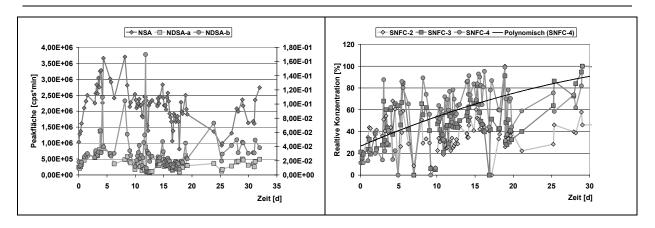


Abbildung 137: Online-MRM-Monitoring der Naphthalinsulphonate im anaeroben Bioreaktor bei kontinuierlichem Betrieb. Links: NSA, NDSA-a, NDSA-b, rechts: SNFC-2, SNFC-3, SNFC-4

### 6.2.4.2 Aerobe Behandlung

In der aeroben Stufe wurden die Abbaubarkeit der Inhaltsstoffe des Abwassers und die Bildung von Abbauprodukten in drei Batch-Versuchen untersucht. Für den ersten Versuch wurden 25 L aerobem Schlamm aus dem vorhergehenden Versuch zum Abbau einer Farbstoff-Trichromie 5 L Abwasser aus dem Ablauf des anaeroben Reaktors zugegeben, das hauptsächlich Abbauprodukte des Farbstoffes Reactive Orange 16 enthielt. Für die nächsten beiden Versuche wurde dem Reaktor 10 L Abwasser entnommen und jeweils 10 L Ablauf des anaeroben Reaktors zugegeben. Zur Untersuchung des Batch-Prozesses wurden massenspektrometrische Online- sowie Offline-Messungen eingesetzt. Die Online-Messungen wurden unter Einsatz der TBAAc-Methode durchgeführt. Beim Offline-Monitoring wurden sowohl die TBAAc- als auch die NH<sub>4</sub>Ac-Methode eingesetzt.

Die linke Darstellung in Abbildung 138 zeigt das Online-MRM-Monitoring des RO16-Abbauproduktes der anaeroben Behandlung im aeroben Reaktor - DAHNSA<sub>DP2</sub>. Im ersten und zweiten Versuch wurde der nahezu vollständige Abbau von DAHNSA<sub>DP2</sub> beobachtet. Im dritten Versuch konnte eine geringe Konzentration der Verbindung nachgewiesen werden. Die anderen DAHNSA-Derivate, die im anaeroben Reaktor mit der NH<sub>4</sub>Ac-Methode zu beobachten waren, DAHNDSA<sub>DP1</sub> und DAHNSA<sub>DP4</sub>, konnten im aeroben Reaktor nicht mehr gefunden werden. DAHNSA<sub>DP5</sub>, das hydroxylierte Derivat der DAHNSA-Verbindungen, wurde im aeroben Reaktor nur teilweise abgebaut. In allen Versuchen zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Konzentration von DAHNSA<sub>DP5</sub>: am Anfang eine Zunahme der Konzentration und anschließend eine leichte Abnahme bis zum Ende des Versuches.

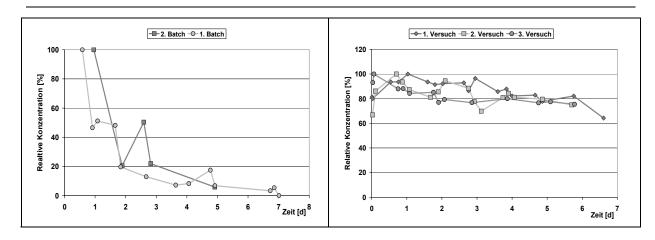


Abbildung 138: Online-MRM-Monitoring der Intermediate im aeroben Bioreaktor. Links: DAHNSA<sub>DP2</sub> im 1. und 2. Versuch. Rechts: DAHNSA<sub>DP5</sub> im 1., 2. und 3. Versuch

Von den Verbindungen der NA-DAHNSA-Reihe wurde im aeroben Reaktor nur NA-DAHNSA<sub>DP4</sub> detektiert. NA-DAHNSA<sub>DP1</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> wurden im aeroben Reaktor nicht nachgewiesen. Die Konzentration von NA-DAHNSA<sub>DP4</sub> nahm innerhalb der drei Versuche ab Abbildung 139, links). Das mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe substituierte NA-DAHNSA-Derivat, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>, zeigte einen sehr schnellen Abbau. Die Ergebnisse der Offline-Messung sind in Abbildung 139 (rechts) dargestellt.

Sulfanilsäure zeigte einen ähnlichen Konzentrationsverluaf wie NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>. In jedem der durchgeführten Batch-Versuche wurde diese Verbindung innerhalb von 2-3 Tagen vollständig abgebaut (Abb. 47-links).

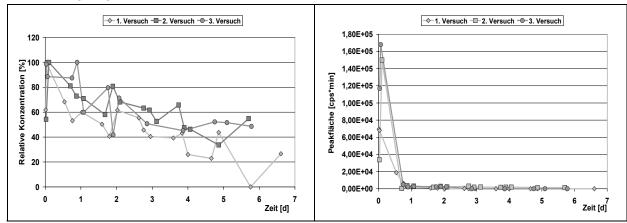


Abbildung 139: Monitoring der Intermediate im aeroben Bioreaktor. Links: Offline-MRM-Monitoring von NA-DAHNSA<sub>DP4</sub>. Rechts: Offline-MRM-Monitoring von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>

Auch p-Base wurde nach 2-3 Betriebstagen im aeroben Reaktor nicht mehr detektiert (siehe Abbildung 140). Die schnelle Abbaubarkeit der p-Base unter den aeroben Bedingungen ist aus der aeroben Behandlung der anaeroben Abbauprodukte von Reactive Black 5 bekannt. Die relative Konzentration des Derivates von p-Base, RO16-Derivat, zeigte eine abnehmende Tendenz im 1. und 3. Versuch. Im 2. Versuch blieb die Konzentration der Stoffe nahezu konstant.

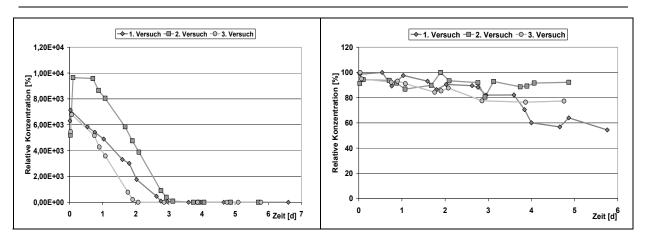


Abbildung 140: Offline-Monitoring der Intermediate im aeroben Bioreaktor. Links: DAD-Monitoring von p-Base. Rechts: MRM-Monitoring von R016-Derivat

Das monomere Naphthalinsulphonat NSA zeigte eine Abnahme der Konzentration im Laufe der Versuche (Abbildung 141, rechts). Im ersten Versuch war der Abbau relativ langsam. In den darauf folgenden Versuchen wurde NSA innerhalb von 1-2 Tagen fast vollständig abgebaut. Im Gegensatz dazu wiesen die beiden beobachteten zweifach sulphonierten monomeren Naphthalinsulphonate, NDSA-a und NDSA-b, keine bedeutsame Änderung der Konzentration in allen durchgeführten Versuchen auf. Analog war bei den polymeren Naphthalinsulphonaten kein Abbau in aeroben Batch-Versuchen zu beobachten.

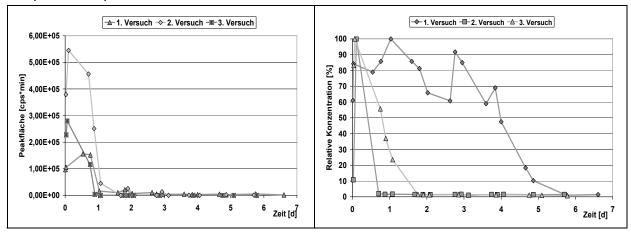


Abbildung 141: Offline-Monitoring der Intermediaten im aeroben Bioreaktor. Links: Offline-MRM-Monitoring von Sulfanilsäure. Rechts: EMS- (1. Versuch) und MRM-Monitoring von NSA (2. und 3. Versuch)

Das Monitoring der nur im aeroben Reaktor nachgewiesenen Verbindungen UNK 662 und UNK 606 zeigte eine deutliche Zunahme der Konzentration in allen durchgeführten Batch-Versuchen. In Abbildung 142 sind die Verläufe der Peakflächen aus dem EMS-Monitorring beider Verbindungen in den einzelnen Versuchen dargestellt. Die Konzentration von UNK 606 stieg bis zum 3. - 4. Betriebstag deutlich an und blieb dann konstant oder nahm bis zum Ende des Versuches leicht ab. UNK 662 bildete sich im 1. Versuch erstmalig nach dem 2. Betriebstag, wobei die Konzentration an den folgenden Tagen bis zum Ende des Versuches kontinuierlich anstieg.

Die Konzentration anderer unbekannter Verbindungen wie UNK 225 und UNK 242 blieb nahezu konstant. Da diese Verbindungen im aeroben Reaktor bereits vor dem Versuch vorhanden waren, ist es nicht eindeutig festzustellen, ob die aerobe Behandlung des Abwassers aus dem anaeroben Ablauf zur Bildung dieser Verbindungen beitrug.

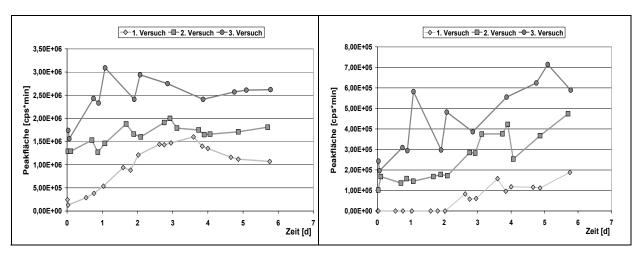


Abbildung 142: Offline-EMS-Monitoring der Intermediaten im aeroben Bioreaktor von: UNK 606 (links) und UNK 662 (rechts)

#### 6.2.4.3 Anaerobe/Aerobe Abbaubarkeit der Intermediaten

Aus dem stoffspezifischen Monitoring konnte die Abbaubarkeit der Intermediaten der biologischen Behandlung in der anaeroben und aeroben Stufe abgeleitet werden. Die Abbaubarkeit der Feedkomponente und Intermediaten wurde in Tabelle 47 dargestellt.

Die gute anaerobe Abbaubarkeit zeigten der hydrolysierte Farbstoff (RO16-H) und die Vinyl-Form des Farbstoffes (RO16-V). Auch Spuren der orginallen Form des Farbstoffes in seinem Hydrolysat wurden anaerob vollständig abgebaut. Keine anderen Intermediaten ließen sich anaerob abbauen. DAHNSA<sub>DP2</sub> und DAHNSA<sub>DP5</sub> wiesen eine schwankende korrelierte mit den gemessenen Redoxpotentialswerten Abbaubarkeit auf. Andere Naphthalinsulphonsäure-Derivate wurden anaerob nicht abgebaut oder konnten mit der eingesetzten chromatographischen Online-Methode nicht untersucht werden.

p-Base, Sulfanilsäure und Naphthalinsulphonsäure (NSA) wurden aerob vollständig abgebaut. Die vollständige Abbaubarkeit war auch bei NA-DAHNSA $_{DP5}$ , NA-DAHNSA $_{DP4}$  sowie DAHNSA $_{DP5}$  zu beobachten. Die gefundenen im anaeroben Reaktor NA-DAHNSA $_{DP2}$ , NA-DAHNSA $_{DP3}$ , DAHNSA $_{DP3}$  und DAHNSA $_{DP4}$  wurden im aeroben Reaktor kaum detektiert. RO16-Derivat und DAHNSA $_{DP5}$  wurden aerob nur teilweise abgebaut.

Zwei unbekannten Verbindungen UNK 606 und UNK 662 wurden als Produkte der aeroben Behandlung identifiziert. Es wurde die Zunahme der Konzentration der Stoffe im aeroben Reaktor beobachtet.

Polymere Naphthalinsulphonate SNFC-2, SNFC-3, SNFC-4 und SNFC-5 ließen sich weder anaerob weder aerob abbauen. Auch die monomeren Napthalinsulphonate NDSA sowie die unbekannten UNK 225, UNK 242, UNK 688, UNK 871 und UNK 565 wurden kaum abgebaut.

Tabelle 47: Anaerobe/Aerobe Abbaubarkeit von Feedkomponeneten und Intermediaten

Substanz	Feed	Hydrolysat	AN	AE	anaerob abbaubar	Aerob abbaubar
RO16-O	+	-	+	-	+	-
RO16-H	-	+	+	-	+	-
RO16-V	+	+	+	-	+	-
RO16-NA	+	+	+	+	~	-
NSA	+	+	+	+	-	+
NDSA-a	+	+	+	+	-	-
NDSA-b	+	+	+	+	-	-
NANSA	+	+	+	+	-	-
NAHNSA	-	+	+	+	-	?
SNFC-2	+	+	+	+	-	-
SNFC-3	+	+	+	+	-	-
SNFC-4	+	+	+	+	-	-
SNFC-5	+	+	+	+	-	-
p-Base	-	-	+	+	-	+
s-acid	-	+	+	+	-	+
NA-DAHNSA <sub>DP2</sub>	-	-	+	-	-	?
NA-DAHNSA <sub>DP3</sub>	-	-	+	-	?	?
NA-DAHNSA <sub>DP4</sub>	-	-	+	+	?	+
NA-DAHNSA <sub>DP5</sub>	-	-	+	+	-	+
RO16-Derivat	-	-	+	+	-	~+
DAHNSA <sub>DP2</sub>	-	-	+	+	~	+
DAHNSA <sub>DP3</sub>	-	-	+	-	?	?
DAHNSA <sub>DP4</sub>	-	-	+	-	?	?
DAHNSA <sub>DP5</sub>	-	-	+	+	~	~+
UNK 242	-	-	+	+	-	-
UNK 225	-	-	+	+	-	-
UNK 478	-	-	+	+	-?	+?
UNK 688	-	-	+	+	-	-
UNK 871	-	-	+	+	-	-
UNK 565	-	-	+	+	-	-
UNK 156	-	-	+	+	?	?
UNK 214	-	-	+	~	?	?
UNK 606	-	-	-	+	-	-
UNK 662	-	-	-	+	-	_

<sup>+</sup> vorhanden, abbaubar, - nicht vorhanden, nicht abbaubar, ~ schwankende Abbaubarkeit, ? nicht ermittelt

#### 6.2.5 Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffes

Der gesamte organische Kohlenstoff TOC (engl.: total organic carbon) ist ein Summenparameter in der Wasser- bzw. Abwasseranalytik und spiegelt die Belastung des Abwassers mit organischen Stoffen wieder. Der TOC wird durch katalytischen Aufschluss der Probe bestimmt. Zuerst wird der anorganische Kohlenstoff (Kohlensäure und Carbonate) durch Ansäuern ausgetrieben. Dann wird die Probe erhitzt und die organischen Kohlenstoffverbindungen zu Kohlendioxid umgesetzt und photometrisch gemessen.

Die TOC-Werte wurden im anaeroben und aeroben Reaktor ermittelt. Die Abbildung 143 zeigt den Verlauf den TOC-Werten im anaeroben Reaktor. Im Batch-Versuch war ein ungefähr 15%-ige TOC-Abbau zu beobachten. Die TOC-Werten nahmen im kontinuierlichen Versuch bis zum 10. Betriebstag ab, dann aber nahmen sie zu, und nach 23. Betriebstag

nahmen sie wieder ab. Der Zunahme der TOC-Werten ist wahrscheinlich auf die erhöhte Raumbelastung zurückzuführen. Sie korreliert auch mit dem Anstieg der Konzentration von NA-DAHNSA<sub>DP2</sub>, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>, RO16-Derivat (siehe Abbildung 136).

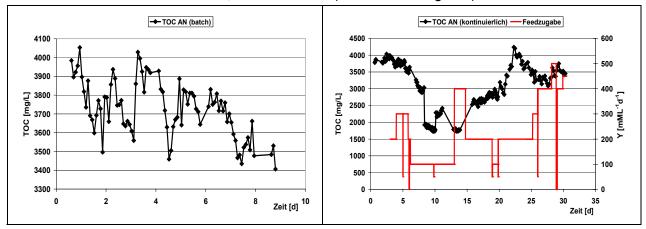


Abbildung 143: TOC-Werten-Verlauf im anaeroben Reaktor. Links: TOC im Batchversuch. Rechts: TOC und Feedzugabe im kontinuierlichen Versuch

Im aeroben Reaktor wurde keine deutliche Veränderung der TOC-Werten beobachtet (Abbildung 144).

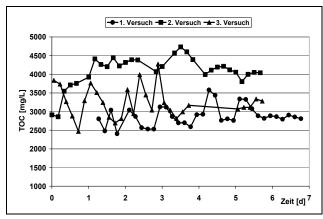


Abbildung 144: TOC-Werten-Verlauf im aeroben Reaktor

# 6.2.6 Abbauleistung der anaeroben Reaktor mit nicht immobilisierten Bakterien

Zur Beurteilung der Abbaubarkeit von Intermediaten und der Entfärbeleistung der aeroben Stufe mit den nicht trägerfixierten Kulturen wurden zwei Batch-Versuche in einem aeroben Reaktor durchgeführt. Da das Volumen des zur Behandlung eingesetzten Abwassers nahezu gleich mit dem Volumen des Reaktors mit trägerfixierten Bakterien war, konnten allgemeine Aussagen über die Entfärbe- und Abbauleistung des Reaktors mit nicht immobilisierten Mikroorganismen in Bezug auf das Verfahren mit trägerfixierten Mikroorganismen gemacht werden.

Die UV-VIS-Messungen der Proben, die aus dem Batch-Reaktor mit nicht immobilisierten Bakterien stammten, haben eine schwache Entfärbeleistung des Verfahrens gezeigt. In Abbildung 145 sind die Verläufe der Änderung der relativen Lichtabsorption im 1. und 2. Versuch dargestellt. Im 1. Versuch wurde die nahezu konstante Lichtabsorption im UV-Bereich und bei 436 nm beobachtet. Bei 525 nm nahm die Lichtabsorption nach dem 3.

Betriebstag zu. Im 2. Versuch war eine 10 bis 20%-ige Abnahme der Lichtabsorption im sichtbaren Bereich und eine unveränderte UV-Lichtabsorption zu beobachten.

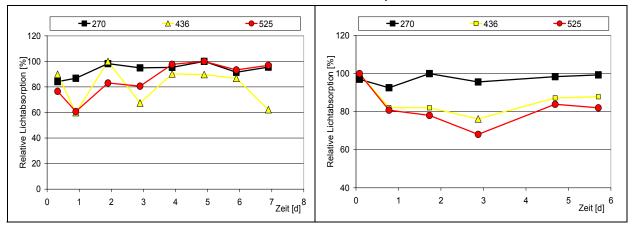


Abbildung 145: Entwicklung der Änderung der Lichtabsorption im UV-Bereich bei 270 nm und im VIS-Bereich bei 436 nm und 525 nm im 1. (links) und 2. Versuch (rechts)

Die Intermediate wurden im aeroben Reaktor mit nicht immobilsierten Bakterien offline mit dem massenspektrometrischen MRM- und EMS-Modus unter Einsatz der chromatografischen TBAAc-Methode quantitativ ermittelt.

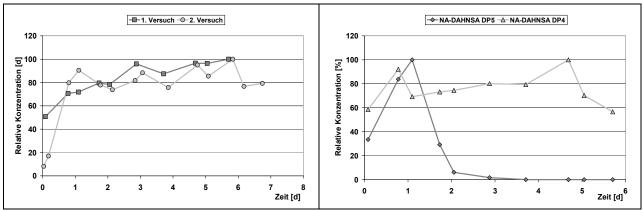


Abbildung 146: Offline-Monitoring der Intermediaten im aeroben Bioreaktor mit nicht immobilsierten Bakterien. Links: MRM-Monitoring von DAHNSA<sub>DP5</sub>. Rechts: MRM-Monitoring von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und EMS-Monitoring von NA-DAHNSA<sub>DP4</sub> (2. Versuch)

Unter den Naphthalinsulphonsäure-Derivaten DAHNSA wurde nur das hydroxylierte Derivat DAHNSA<sub>DP5</sub> detektiert. Der Konzentrationsverlauf von DAHNSA<sub>DP5</sub> zeigte einen Anstieg im Laufe der Versuche (Abbildung 145 - links).

Im Gegensatz zum Reaktor mit den immobilisierten Bakterien (siehe Abb. 41) wurde DAHNSA $_{DP2}$  nicht gefunden. Zum Monitoring anderer DAHNSA-Derivate wurden keine Messungen mit der NH $_4$ Ac-Methode durchgeführt.

Das Monitoring von NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> zeigte eine gute Abbaubarkeit der Verbindung nach zirka zwei Betriebstagen (Abbildung 146 - rechts). Es wurde keine abnehmende NA-DAHNSA<sub>DP4</sub>- Konzentration im Gegensatz zum Reaktor mit immobilisierten Bakterien zu beobachten. (siehe Abbildung 139, Abbildung 146 - rechts). Die Konzentration des Stoffes blieb fast unverändert bis zum Ende des Versuches.

Der Abbau der p-Base war bei der Behandlung mit nicht immoblisierten Bakterien deutlich langsamer als mit trägerfixierenden Mikroorganismen (Abbildung 147 - links). Die Konzentration der p-Base war ab dem 1. bis zum 3. Betriebstag im 1. Versuch und bis zum

5. Betriebstag im 2. Versuch konstant. Danach wurde eine Abnahme der Konzentration um zirka 50% im 2. Versuch und der vollständige Abbau im 1. Versuch beobachtet.

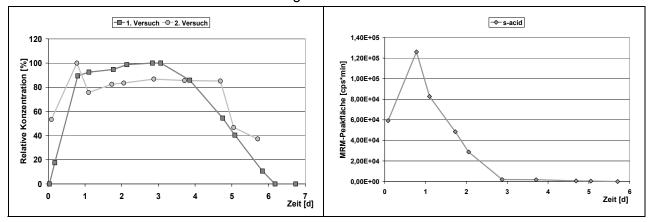


Abbildung 147: Offline-Monitoring der Intermediaten im aeroben Bioreaktor mit nicht immobilsierten Bakterien. Links: MRM-Monitoring der p-Base. Rechts: MRM-Monitoring der Sulfanilsäure (2. Versuch)

Die Sulfanilsäure wurde analog zur Behandlung mit immobilisierten Kulturen nach 3 Betriebstagen vollständig abgebaut (Abbildung 147 - rechts), während das Monitoring von RO16-Derivat im Reaktor mit immobilisierten Bakterien keine abnehmende Tendenz der Konzentration zeigt blieb. Bei der NSA wurden hohe Schwankungen der Konzentration, aber kein Abbau beobachtet.

Der Konzentrationsverlauf der unbekannten Verbindung UNK 606 zeigte eine Zunahme bis zum 2. – 3. Betriebstag und dann ein Absinken der Konzentration. Die zunehmende Konzentration bis zum 2. - 3. Tag korrelierte negativ mit dem Konzentrationsverlauf von Sulfanilsäure und NA-DAHNSA<sub>DP4</sub>. Darauf folgte eine Konzentrationsabnahme bis zum letzten Tag des Versuches (Abbildung 148).

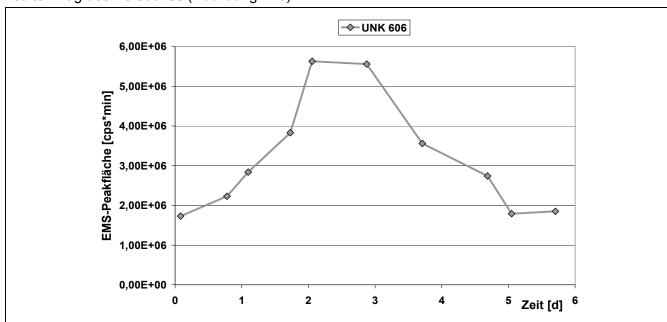


Abbildung 148: Offline-EMS-Monitoring von UNK 606 (2. Versuch)

In den Proben aus dem Reaktor mit immobilisierten Bakterien wurde dagegen ein Anstieg der Konzentrationskurve bis zum Ende des Versuches beobachtet (siehe Abbildung 139 - links). Das beobachtete Abfallen der Konzentration im Reaktor mit nicht immobilisierten Bakterien kann auf die schlechtere Trennung in den Chromatogrammen zurückgeführt

werden, die die Quantifizierung erschwert hat und verfälschen konnte. Die unbekannte Verbindung UNK 662, deren Bildung im Lauf des Versuches unter Einsatz von trägerfixierten Mikroorganismen beobachtet wurde, war bei nicht immobilisierten Mikroorganismen nicht zu detektieren.

#### 6.2.7 Abbaumechanismus von Reactive Orange 16

Die durchgeführten Untersuchungen haben ermöglicht Mechanismen des Abbauprozesses zu postulieren. Die vorgeschlagenen Mechanismen wurden in Abbildung 149 und Abbildung 150 dargestellt. In der anaeroben Stufe des Verfahrens wurden Produkte der Reduktion der Azobindung, p-Base und Naphthalinsulphonsäure-Derivate beobachtet. Aus der Literatur sind zwei unterschiedliche Mechanismen der Reduktion der Azofunktion bekannt [102]. Nach dem ersten Mechanismus wird die Azobindung in einer einstufigen Reaktion unter Übertragung von vier Elektronen zu den zwei korrespondierenden Aminoverbindungen reduziert. In dem zweiten Mechanismus unterliegt die Ketohydrazon-Form des Azofarbstoffes der Reduktion. Durch die Übertragung eines Wasserstoffäquivalentes bildet sich eine Hydrazonverbindung, die anschließend in einer Disproportionierungsreaktion zu einem Amin und einem Iminochinon zerfällt (NA-DAHNSA-Reihe). Im anaeroben Verfahren wurden auch Hydrolysenprodukte der Naphthalinderivate aromatischer Amine und Iminochinone nachgewiesen. Die durch Substitution der Aminogruppe gebildeten Chinone könnten eine gewisse Rolle bei der Reduktion des Farbstoffes spielen.

Die Reduktion des Azofarbstoffes könnte intrazellulär oder extrazellulär unter Anwesenheit von Chinonderivaten als Redoxmediatoren auftreten. Die Chinonderivate waren ursprünglich im dem eingesetzten Schlamm vorhanden, sowie als Abbauprodukte der Behandlung von Reactive Orange 16 gebildet wurden. Das Normalredoxpotential eines Chinon-Hydrochinon-Paares könnte ein entscheidendes Kriterium für die Geschwindigkeit der enzymatischen Chinonreduktion, als auch für die Farbstoffreduktion durch das Hydrochinon sein. Aus dem Vergleich beider Teilreaktionen könnte sich der optimale Wert des Redoxpotentials für den Abbauprozess, sog. "Redoxpotential-Fenster" erweisen [102].

Abbildung 149: Mechanismen der anaeroben Abbau von Reactive Orange 16

Die Hydrolyse der Acetylamid-Gruppe zur Aminogruppe führt zu Bildung der DAHNSA-Verbindungen, die analog zu NA-DAHNSA der Hydrolyse zu Chinonen und Hydrochinonen unterliegen. Im anaeroben Verfahren konnten mit der zum Online-Monitoring eingesetzten chromatografischen Methode nicht alle Verbindungen der NA-DAHNSA- und DAHNSA-Reihe überwacht werden und deswegen keine Bedingungen der Bildung einzelner Stoffe verfolgt werden. Es wurde aber im anaeroben Verfahren die chinoide Form der NA-DAHNSA (NA-DAHNSA<sub>DP2</sub>) beobachtet. Unter aeroben Bedingungen tritt sie in der phenolischen Form auf (NA-DAHNSA<sub>DP4</sub>). NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> entsteht vermutlich durch die

Hydroxylierung der primär gebildeten NA-DAHNSA<sub>DP3</sub>. RO16-Derivat wird wahrscheinlich durch den Angriff der p-Base auf die Hydroxylgruppe am Naphthalinring der NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> gebildet.

In der aeroben Stufe wurde ein schneller Abbau von DAHNSA<sub>DP2</sub>, NA-DAHNSA<sub>DP5</sub> und p-Base sowie eine Abnahme der Konzentration NA-DAHNSA<sub>DP4</sub> und RO16-Derivat beobachtet. Bei der unbekannten Verbindungen UNK 606 und UNK 662 handelt sich vermutlich um die Olygomerisation der anaeroben Abbauprodukten, die in der aeroben Stufe abgebaut wurden.

Abbildung 150: Mechanismen der Bildung der Naphthalinsulphonsäure-Derivate

## 6.3 Untersuchung synthetischer und realer Abwässern mit Reactive Orange 107

Der Farbstoff Reactive Orange 107 gehört neben Reactive Black 5 und Reactive Orange 16 zu der Farbstofftrichromie "Marineblau", die bei der Färbung von Baumwollfaser beispielsweise in der Garnfärbung eingesetzt wird. Reactive Orange 107 wurde bereits in Kapitel 5.1 (Seite 40) erwähnt. Seine Abbaubarkeit in realen Abwässern aus einer Färbung mit Marineblau konnte in Kapitel Seine Abbaubarkeit in realen Abwässern aus einer Färbung mit Marineblau konnte in Kapitel 6.1.3.1 (Seite 128) gezeigt werden. Hier zeigt sich in Abbildung 75 (Seite 130) ein ähnliches Verhalten des Redoxpotentials bei Reative Orange 107 wie bei Reaktive Black 5. Im folgenden sind die Ergebnisse der Einzeluntersuchung von Reactive Orange 107 dargestellt.

# 6.3.1 LC-MS-Identifizierung von Inhaltsstoffen des Farbstoffhydrolysates Reactive Orange 107

Der Farbstoff Reactive Orange 107 und seine Abbauprodukte wurden wie die beiden anderen Farbstoffe der Trichromie einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die aus dieser Untersuchung gewonnenen Informationen über die Zusammensetzung des Hydrolysats sind im Folgenden dargestellt. Die chromatographischen Peaks werden in den Chromatogrammen mit Abkürzungen der chemischen Namen und die nicht identifizierten Stoffe mit UNK (Unknown) gekennzeichnet (siehe Abbildung 151). Zur Ermittlung von Strukturen wurden LC-MS-MS-Messungen mit Scan-Ionen-Modi, wie Full Scan Modus, Produktionen-Modus und Vorläuferionen-Modus durchgeführt. Chemische Strukturen wurden aus der massenspektrometrischen Untersuchung für die Inhaltstoffe des Abwassers abgeleitet. Die einzelnen Strukturvorschläge werden im Weiteren ausführlicher besprochen.

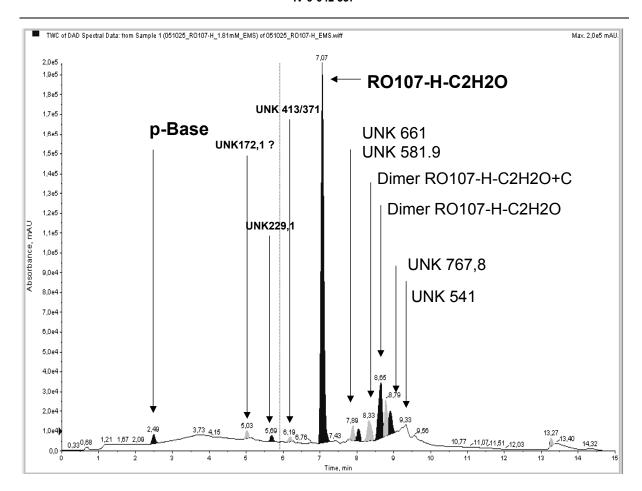


Abbildung 151: Dioden-Array-Chromatogramm des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Orange 107

### 6.3.2 Produkte der Hydrolyse von Reactive Orange 107

Wie Abbildung 151 zeigt, besteht die Hauptkomponente des hydrolysierten Farbstoffes zu mehr als 60% aus der hydrolysierte Form des Farbstoffes, bei der die Acetatgruppe abgespalten ist. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch Reactive Orange 16 (siehe vorhergehendes Kapitel).

Die hydrolysierte Form mit Acetamidgruppe spielt demgegenüber eine untergeordnete Rolle. Es zeigt sich, dass Dimerformen einen großen Anteil an den restlichen farbigen Verbindungen darstellen.

Abbildung 152: Chemische Strukturformeln des Vinylsulfonfarbstoffes: RO107-O und RO107-O- $C_2H_2O$  = Schwefelsäureesterform; RO107-V und RO107-V- $C_2H_2O$  = reaktive Vinylform; RO107-H und RO107-H- $C_2H_2O$  = hydrolysierte Form

Neben der Komponente RO107-H- $C_2H_2O$  stellt Dimer RO107-H- $C_2H_2O$  die zweite farbige Hauptkomponente des Farbstoffes dar. In Abbildung 153 ist die Strukturformel und das zugehörige UV-VIS-Spektrum dargestellt, dass nehezu deckungsgleich mit dem Spektrum des hydrolysierten Farbstoffes ist. Die Verbindung zweier hydrolysierter Farbstoffmoleküle über eine Etherbindung wurde bereits beim Farbstoff Reactive Black 5 und Reactive Orange 16 diskutiert.

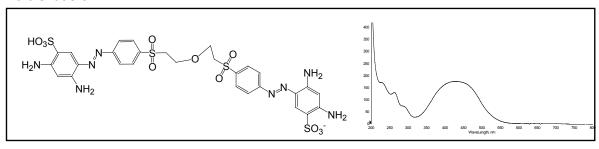


Abbildung 153: Chemische Strukturformeln des Dimers RO107-H- $C_2H_2O$  mit  $\emph{m/z}$  781 und UV-VIS-Spektrum

Analog zu den beiden bereits untersuchten Farbstoffen, ergab die chromatographische Trennung mit anschließender Ms-Detektion die Möglichkeit zur Identifizierung weitere Nebenkomponenten des Farbstoffes.

Abbildung 154 zeigt zwei Nebenkomponenten NA-ABSA und BNA-BSA, die als Vorprodukte der Farbstoffsynthese von Reactive Orange 107 identifiziert werden konnten.

Abbildung 154: Chemische Strukturformeln zweier Nebenkomponenten des Farbstoffes RO107, die im Hydrolysat nachgewiesen werden konnten

## 6.3.3 Monitoring der biologischen Behandlung von Reactive Orange 107

In mehreren Batchversuchen sollte das Abbauverhalten des Hydrolysats von Reactive Orange 107 bzw. der relevanten farbigen Bestandteile untersucht werden. Hierzu wurde der anaerobe Bioreaktor mit einer Stoßbelastung von 6mM pro Liter Reaktorvolumen befüllt. Eine kontinuierliche Behandlung des Farbstoffes wurde bereits in vorhergehenden Kapiteln diskutiert.

### 6.3.3.1 Anaerobe Behandlung

Im Vergleich zu den beiden Farbstoffen Reactive Black 5 und Reactive Orange 16 zeigen die Hauptkomoonenten des Farbstoffes Reactive Orange 107 eine vergleichsweise schnelle Abbaurate. Die Stoß-Raumbelastung von 6mM wurde innerhalb von weniger als zwei Tagen abbgebaut bzw. reduktiv gespalten (siehe Abbildung 155). Analog zeigten auch die anderen farbigen Komponenten eine schnelle Entfärbung bzw. reduktive Spaltung.

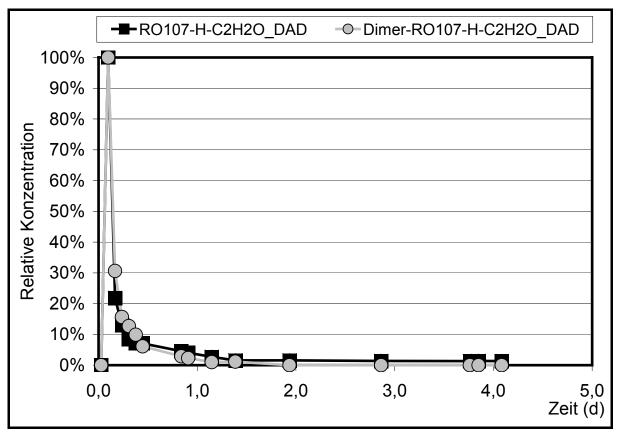


Abbildung 155: Stoffspezifisches Abbaumonitoring von RO107-H-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O und Dimer RO107-H-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (zusammen >70% der Farbigkeit des Hydrolysates) im anaeroben Bioreaktor

Nach Durchführung von drei Batch-Versuchen mit jeweils 6 mM Farbstoff wurde ein Teil der anaerob behandelten Flüssigkeit dem Bioreaktor entnommen. Mit ihr wurden Stop-Feed-Batch-Versuche im aeroben Bioreaktor durchgeführt, die im folgenden diskutiert werden.

### 6.3.3.2 Aerobe Behandlung

Abbildung 156 zeigt das stoffspezifische Abbauverhalten von verschiedenen Abbauprodukten der anaeroben Spaltung des hydrolysierten Farbstoffgemisches aus Reactive Orange 107. Wie schon bei anderen Versuchen in aeroben Bioreaktoren zeigt p-Base eine schnelle Abbaurate, die einen vollständigen Abbau innerhalb von neun Tagen erlaubt. Die Biomasse war vorher noch nicht mit farbstoffhaltigen Abwässern in Kontakt gekommen. Daraus lässt sich eine schnelle Adaption an diese Verbindungen nachweisen.

Weitere Komponenten, die einem Monitoring unterzogen wurden, sind UNK319 und UNK240 sowie NA\_ABSA, das bereits in Abbildung 154 dargestellt wurde. UNK240 ist eine Verbindung, die bei der aeroben Behandlung von anaeroben Abbauprodukten des Farbstoffes Reactive Orange 107 entstanden ist. Eine strukturelle Charakterisierung war leider nicht möglich.

Im Vergleich zu anderen sulfonierten aromatischen Verbindungen wie ABSEESA, das als Nebenkomponente bei Reactive Black 5 eine Rolle spielt, ist die Nebenkomponente NA-ABSA im aeroben Bioreaktor sehr gut abbaubar und nach drei Tagen nur noch in geringen Konzentration nachweisbar.

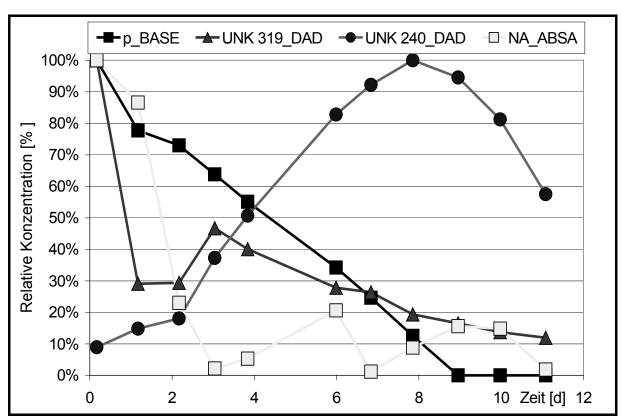


Abbildung 156: Stoffspezifischer Konzentrationsverlauf von Hauptkomponenten im aeroben Bioreaktor bei einem Step-Feed-Batch-Experiment an noch nicht adaptierten Schlamm

## 6.3.4 Farbigkeitsmonitoring der Entfärbung von Reactive Orange 107 im Batchversuch

Die Untersuchung von Farbigkeitsparametern wie der Durchsichtigkeitsfarbzahl bei den gesetzlich festgelegten Wellenlängen zeigte, dass auch bei hohen Konzentration von 6 mM

eine sehr gute Entfärbung des Farbstoffhydrolysates von Reative Orange 107 erzielt werden konnte. Dies deckt sich mit den im kontinuierlichen Versuch erhaltenen Ergebnissen.

Die relative Entfärbung eines Batch-Versuches ist in Abbildung 157 dargestellt. Es zeigte sich, dass innerhalb der ersten beiden Betriebstage eine nahezu 95%ige Netfärbung im gelben und roten Spektralbereich erreicht werden konnte. Die Entwicklung der Absorption um UV-Bereich liegt nach eineinhalb Tagen konstant bei 80% und ist damit sehr viel geringer als bei Reaktive Black 5, bei dem eine starke Zunahem der UV-Absorption verzeichnet werden konnte.

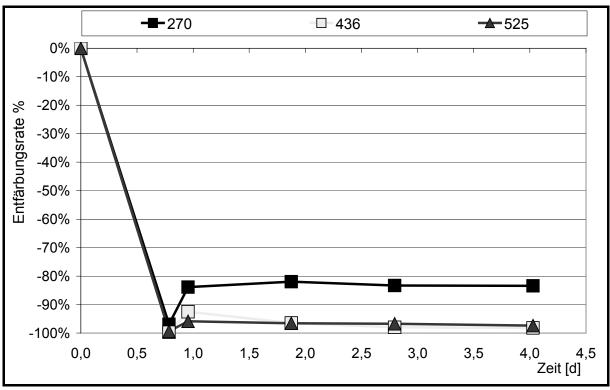


Abbildung 157: Entwicklung der relativen Entfärbung bei einem Step-Feed-Batch-Versuch im aneroben Bioreaktor bei einer Belastung mit 6 mM RO107

Im Vergleich zur Entwicklung der Farbigkeit im aeroben Bioreaktor bei anderen untersuchten Farbstoffen zeigte sich bei RO107 eine deutlichen weitere Entfärbung. Die Verbindung UNK319, die bei der Rückverfärbung nach der anaeroben Behandlung von RO107 eine wesentliche Rolle spielt, konnte in der aeroben Stoffe nach etwa 11 Tagen um 90% abgebaut werden. Daher ist in Abbildung 158 eine deutliche Abnahme der Farbigkeit im aeroben Bioreaktor zu beobachten.

Insgesamt ist im farbigen Bereich eine Farbigkeitsabnahme von mehr als 60% zu messen, die im blauen Bereich bei über 90% liegt. Damit könnte für die Gesamtentfärbung bei einem kontinuierlichen Verfahren die geforderte 95%ige Entfärbung erbracht werden.

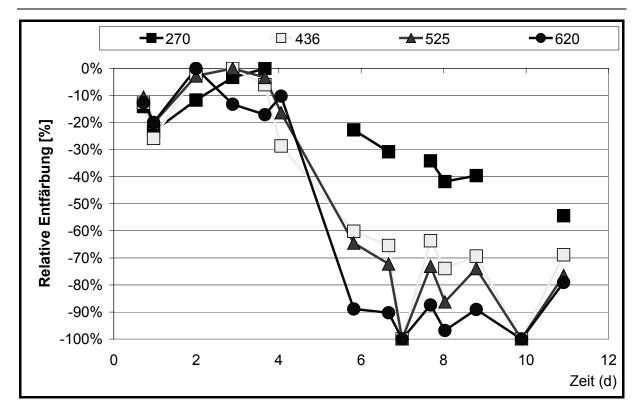


Abbildung 158: Entwicklung der relativen Entfärbung bei einem Step-Feed-Batch-Versuch im aeroben Bioreaktor bei einer Belastung mit RO107-Abwasser aus der anaeroben Behandlungsstufe

### 6.3.5 Abbaumechanismus von Reactive Orange 107

Ein Vorschlag zum Abbaumechanimus von hydrolysiertem Reactive Orange 107 ohne Acetgruppe ist in Abbildung 159 dargestellt. Er nimmt im Vergleich zu den beiden anderen intensiv untersuchten Farbstoffen Reactive Black 5 und Reactive Orange 16 eine Sonderrolle ein, weil er nach der anaeroben Behandlung eine besonders intensiv gefärbtes Intermediat bildet (UNK319), dessen chemische Strukturformel bislang mit Hilfe der LC-MS-MS nicht identifiziert werden konnte. Es ist daher bemerkenswert, dass sich diese Verbindung bei aeroben Behandlung wieder abbaueb lässt und somit eine Reduktion der Farbigkeit erreicht werden kann, die beispielsweise bei TAHNDS<sub>DP2-4</sub> sehr schwierig ist.

Abbildung 159: Vorgeschlagenes Abbauschema des hydrolysierten Farbstoffes Reactive Orange 16 ohne Acetgruppe

## 7 Prozessanalytisch gestützte Verfahrensoptimierung

Durch das stoffspezifische Monitoring der farbigen und nicht farbigen Substanzen im anaeroben und aeroben Bioreaktor konnte nachgewiesen werden, dass eine vollständige anaerobe Reduktion der Azobindungen zu aromatischen Aminen unter bestimmten Betriebsbedingungen im anaeroben Bioreaktor beobachtet werden kann. Die abwassertechnische Beurteilung der Entfärbeleistung eines Behandlungsverfahrens ist hingegen spektroskopischen Messungen der Restfarbigkeit unterworfen, für die Grenzwerte der Durchsichtigkeitsfarbzahl (DFZ) in der Abwasserverordnung festgelegt sind (siehe Kapitel 3.4.3, Seite 31) [9]-[10]. Mit dem Ziel, die Einleitbedingungen für azofarbstoffhaltige Abwasserkonzentrate einzuhalten, sollte auf Grundlage des stoffspezifischen Abbauverhaltens von farbigen Substanzen ein Konzept zur Verfahrensoptimierung entwickelt werden. Primäres Ziel sollte die Gewährleistung einer 95 %igen Entfärbung bei kontinuierlichem Betrieb der Bioreaktoren sein, um die behandelten Abwasserkonzentrate einer weiteren Abwasserbehandlung zuführen zu können. Ein mit der Entfärbung einhergehender Abbau von chemischem Sauerstoffbedarf durch das untersuchte anaerob-aerobe Behandlunsgverfahren ist wünschenswert.

#### Verfahrensoptimierung der biologischen Entfärbung

Die zur Entfärbung von Azofarbstoffen in der Literatur beschriebenen Entfärbungsgrade weisen trotz ähnlicher Behandlungskonzepte eine hohe Schwankungsbreite auf [112]. In den anaerob-aeroben zweistufigen Behandlungsverfahren werden in der Regel 70 bis 100% der Entfärbeleistung der aneroben Stufe zugerechnet [31]. Die zu Reactive Black 5 vorliegenden Untersuchungen mit anaeroben Verfahren bestätigen diese Beobachtung (%-Entfärbeleistung): 95 % (500 mg<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) [13], 65 % (530 mg<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) [15], 80 % (500 mg<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) [130], 78,2 % (100 mg<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) [264], 63% (20 mg<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) [266].

Eine Ursache für die schwankenden Entfärbungsgrade von Reactive Black 5 zwischen 63 bis 95% sind durch die Unterschiede der eingesetzten Verfahren und Betriebsbedingungen begründet, d.h. nicht jedes Verfahren wurde unter optimalen Bedingungen betrieben. Van der Zee führt neben der hydraulischen Verweilzeit und der Biomassenkonzentration die unterschiedlichen Konzentrationen der Azofarbstoffe im Abwasser als eine Ursache für diese Schwankungen an. Überschreiten die der anaeroben Stufe zugeführten Konzentrationen den normalen Textilabwassergehalt von 10 – 250 mg<sub>Farbstoff</sub> L<sup>-1</sup>, dann kann dies die Entfärbungskapazität des Bioreaktors überfordern bzw. sich toxisch auf die Biomasse auswirken und in Folge eine Hemmung des Abbaus verursachen [112]. Eine störende Wirkung von Abwässerinhaltsstoffen wurde von Libra et al. in einem methanisierenden anaeroben Bioreaktor beobachtet [15]. Das Vorhandensein nicht vollständig hydrolysierter Reaktivfarbstoffe mit Vinylgruppen führte zu einer Hemmung der methanisierenden Bakterien und in Folge zu einer nicht vollständigen Azoreduktion im anaeroben Bioreaktor.

In der Praxis haben die unterschiedlichen Entfärbungsraten einzelner Farbstoffe sowie die schwankenden Farbstoffkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Farbigkeit des Ablaufes in Kläranlagen, in die indirekt einleitende Textilveredelungsbetriebe ihr Abwasser entsorgen [135]. Zur Steuerung der Restfarbigkeit des Ablaufes einer kommunalen Kläranlage, die Abwasserabnehmer eines indirekt einleitenden Textilveredelungsbetriebes ist, wurden die Stossbelastungen durch Restflotten aus der Färbung in Zwischenresevoirs gepuffert und entsprechend der Entfärbkapazität der Kläranlage über eine Faulturmbehandlung dosiert zugegeben [16].

Die häufig eingesetzten verfahrensoptimierungsbezogenen Maßnahmen bestehen bei den beschriebenen Verfahren in der Anpassung der hydraulischen Verweildauer, d.h. in der Reduktion der Raumbelastung zur Stabilisierung der Entfärbungskapazität [13], [16], [21], [45]-[46]. Zur weiteren Steigerung der Entfärbeleistung wird die Zugabe von Redoxmediatoren wie Lawson oder elementares Eisen empfohlen, die die laufenden Kosten dieser

Verfahren erhöhen [102], [110]-[112]. Der Zugabe von Braunkohlepartikeln als Adsorbens und Trägermaterial in aneroben Bioreaktoren zur Behandlung von Farbstoffkonzentraten mit 5 g L<sup>-1</sup> bei Raumbelastungen von 1,25 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> werden 96 – 98% der Entfärbeleistung zugeordnet [31].

Im Folgenden werden zwei Ansätze zur Verfahrensoptimierung der Entfärbung von Farbstoffkonzentraten diskutiert, die sich aus den mechanistischen Untersuchungen in dieser Arbeit ableiten und aus technischer Sicht als praktikabel eingeschätzt werden können.

#### 7.1 Steuerung des Redoxpotential zur effizienten anaeroben Azoreduktion

Der Betriebsparameter des Redoxpotentials geht aus der vorliegenden Untersuchung zum Abbaumechanismus des hydrolysierten Reaktivfarbstoffes als der Haupteinflussfaktor einer vollständigen Reduktion der Azobindungen hervor. Bei dem hydrolysierten Diazofarbstoff Reactive Black 5 konnten aus den Untersuchungen mit kontinuierlicher Konzentratzugabe zwei Redoxpotential-Schwellenwerte abgeleitet werden. Der obere Schwellenwert von –250 mV markiert dabei die Teilreduktion des Farbstoffes, die bevorzugt an der ortho-Hydroxy-azobindung beobachtete wurde. Unterhalb des zweiten Schwellenwertes von –400 mV konnte die vollständige Reduktion beider Azobindungen beobachtete werden. Liegt der Arbeitsbereich des Redoxpotentials im anaeroben Bioreaktor im Bereich des oberen Schwellenwertes, wurden neben den teilhydrolysierten Verbindungen wie RB5-H –PB die vermehrte Bildung weiterer Intermediate beobachtet, die sich erst bei einem Absinken unterhalb des zweiten Schwellenwertes einstellte. Bedingt durch den Eintrag dieser Verbindungen in den aeroben Bioreaktor sank die Entfärbeleistung erheblich, wie in den Kapiteln 0 und 6.1.6 nachgewiesen werden konnte.

Den in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Modellabwasserkonzentraten mit einem Farbstoffgehalt von bis zu 11 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> wurden neben dem Reaktivfarbstoff keine weitere C-Quelle zugegeben. Da der Kohlenstoff der Farbstoffmoleküle in der Regel im anaeroben Bioreaktor nicht durch Mikroorganismen oxidiert wird, entstehen auf diesem Wege kein freiwerdender Wasserstoff sowie keine für die Reduktion der Azobindungen erforderlichen Elektronen. Durch die gezielte Zudosierung von Ethanol als leicht oxidierbare Kohlenstoffquelle wurde in einer Versuchsreihe (Raumbelastung 0,5 - 1,5 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) beobachtet, dass das Redoxpotential in Folge bis zu einem Wert von –450 mV sank (siehe Abbildung 101, Seite 153).

Ein ähnlicher Senkungseffekt wurde auch bei der Abnahme der Raumbelastung beobachtet. Nach Beendigung einer Phase mit einer Raumbelastung 4 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sank das Redoxpotential spontan von –220 mV auf –350 mV (siehe Abbildung 102, Seite 154). Daraus lässt sich die Möglichkeit ableiten, das Redoxpotential einerseits über die Höhe der Raumbelastung oder anderseits über eine Ethanoldosierung zu steuern bzw. bei stark wechselnden Raumbelastungen eine Regelung des Redoxpotentials zu realisieren. Um einen kontinuierlichen Betrieb des anaerob-aeroben Entfärbeverfahrens unter optimalen Bedingungen zu gewährleisten, ist aus technischer Sicht die Regelung des Redoxpotentials durch Ethanolzugabe zu bevorzugen. Die Einstellung wechselnder Raumbelastung durch die Regelung der Zulaufvolumens erfordert Pufferkapazitäten, die bei geringer Zulaufmenge das anfallende Abwasservolumen auffangen müssten.

Der in Kapitel 6.1.8 (Seite 156) durchgeführte Vergleich zur Entfärbung von Modell- und Realabwässern zeigt, dass schon bei einer kontinuierlichen Zugabe von 2 - 3 mL<sub>EtOH</sub> d<sup>-1</sup>, das entspricht etwa 0,05 bis 0,075 mL<sub>EtOH</sub> L<sub>Bioreaktor</sub>-1 d<sup>-1</sup>, das Redoxpotential bei einer Raumbelastung von 245  $\mu$ M<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> konstant bei etwa –450 mV gehalten werden konnte (siehe Abbildung 105, Seite 158). Die Verdopplung der Raumbelastung und die Verringerung der kontinuierlichen Zugabe von Ethanol auf 1 mL d<sup>-1</sup> bewirkten unmittelbar eine Störung des Redoxpotentials und einen Anstieg auf –360 mV. Trotz des hohen Anteils an anaerob leicht abbaubaren CSB in der zuletzt behandelten Realflotte dieser Versuchsreihe, verlief das Redoxpotential hier nur im Bereich von etwa –250 mV.

Zur Weiterentwicklung und Etablierung des Verfahrens zur ausschließlichen Entfärbung von Abwasserkonzentraten mit Raumbelastungen im mM-Bereich ist eine Regelung des Redoxpotentials unabdingbar, wenn nicht durch Zufuhr leicht abbaubarer C-Quellen mit dem Abwasser gewährleistet werden kann, dass das Redoxpotential konstant im Bereich des unteren Schwellenwertes von –400 mV liegt. Die eingangs aus der Literatur zitierten Entfärbeleistungen von Reactive Black 5 zwischen 63 – 95 % deuten darauf hin, dass die Betriebsbedingungen der anaeroben Stufen nicht optimal waren. Eine Regelung dieses Betriebsparameters ist daher zur Stabilisierung der Reduktionsrate sinnvoll.

# 7.2 Membranauswahl zur Erhöhung der Verweildauer schwerabbaubarer Rückverfärbungsprodukte

In dem von Krull und Döpkens entwickelten industriellen Verfahren konnte erstmalig eine Hohlkammerfasermembran mit einer Porengröße 0,1 µm bei der aeroben biologischen Behandlung zur Prozesswasserrückgewinnung gering belasteter, farbiger Mischabwässer etabliert werden [135]. Durch sie konnte die Biomasse und höher molekulare Verbindungen zurückzuhalten und damit die Qualität des Prozessrecyclingwassers erhöht werden. Der Beitrag der Membran zur Entfärbung war dagegen zu vernachlässigen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Ultrafiltrationsmembranen zeigen, dass gerade die farbigen Intermediate wie TAHNDS $_{\rm DP2-4}$  durch die Auswahl einer geeigneten Ultrafiltrationsmembran im Bereich zwischen 58 bis 90 % zurückgehalten werden (siehe Kapitel 5.4.1, Tabelle 19, Seite 48). Damit kann die hydraulische Verweilzeit dieser Verbindungen stark erhöht und die Möglichkeit zum Abbau im aeroben Bioreaktor erhöht werden.

Neben den bei der Probenahme verwendeten Ultrafiltrationsmembranen wurden auch offenere Membranen getestet, die über eine molekulare Trenngrenze (MWCO) von 50000 Da (bezogen auf eine Polyethylenglykol-Mischung) verfügten. Aus den stoffspezifischen Messungen im aeroben Bioreaktor und im Ablauf (Membran-Permeat) konnten für beispielsweise TAHNDS $_{\rm DP2}$  Retentionswerte im Bereich von 80 % bestimmt werden.

Der Vorteil offenerer Membranen ist der langfristig stabilere Permeatfluss gegenüber den getesteten "low-cut" Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO von 3500 bis 10000 Da (siehe Tabelle 18, Seite 47). Dies bestätigt die in einer Versuchsreihe eingesetzte Hoechst High Chem PES-50H Membran, bei der mit einem niedrigeren Betriebsdruck von 3 bar über einen Zeitraum von 14 Tagen ohne Reinigung eine konstante Permeatflussleistung von 9 - 11 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> gemessen wurde (MWCO = 50000 Da, siehe Abbildung 102, Seite 154). Im Vergleich hierzu wurden bei einem Betriebsdruck von 5 bar einer Membran des Typs GK der Firma Desal eine sehr viel höherer Fluss von 53 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> beobachtet, der jedoch innerhalb von drei Tagen auf 27 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> absank. Bei der PW Membran des Herstellers Desal nahm die Flussrate innerhalb von 24 Stunden von 113 auf 40 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> ab.

Im Vergleich zu den bei Krull und Döpkens eingesetzten Hohlkammerfasermembranen sind die Permeatflüsse der Ultrafiltrationsmembranen niedriger, was bei gleicher zu installierender Permeatleistung zu einer Erhöhung der erforderlichen Membranfläche führt. Die Entwicklung von Wickelmodulen mit speziellen Spacern, die auch in Bioreaktoren eingesetzt werden können, könnte zu einer besseren Effizienz des Einsatzes von Ultrafiltrationsmembranen in Bioreaktoren beitragen, d.h zu einer wesentlichen Steigerung der Permeatleistung [272].

Bei der Entwicklung des aeroben Membran-Bioraktors stand nur eine begrenzte Membranfläche in den vorhandenen Membranmodulen zur Verfügung, die die hydraulische Belastung des Verfahrens bestimmte. Bei der Umsetzung des Verfahrens in einen technischen Maßstab ist die Erweiterung der Membranaustauschfläche zu empfehlen. Durch den Einsatz von Membran-Bio-Reaktoren entfallen die Investitionen und die Installation von Absenkbecken zur Entfernung des Überschussschlammes.

## 8 Zusammenfassung

#### Online-Prozessanalysenmethodenentwicklung

Das entwickelte Online-Multikomponentenanalyse-Verfahren ist für den Einsatz zum schnellen, robusten und kontinuierlichen Prozessmonitoring von mehr als 35 Verbindungen in anaeroben und aeroben Bioreaktoren bestens geeignet. Dem liegt ein Probenahmesystem zu Grunde, das in der vorliegenden Arbeit erstmalig über eine Kopplung von kontinuierlicher mikrofiltrationsbasierter Probenahme mit LC-MS/MS realisiert werden konnte. Speziell im anaeroben Bereich bietet eine mikrofiltrationsbasierte Probenahme die Möglichkeit, kontinuierlich repräsentative Proben unter sauerstofffreien Bedingungen für Analysensysteme bereit zu stellen. Durch die eingesetzten Membranen ist gewährleistet, dass die Proben frei von Fest-stoffen sind.

Die entwickelte chromatographische Methode auf Basis einer ionenpaarchromatographischen (IC) Gradiententrennung mit Tetrabutylammoniumacetat zeichnet sich durch ihre hohe Selektivität für sulfonierte benzen- und naphthalinbasierte Verbindungen aus, die zu den Hauptverbindungen gehören, aus denen sich Reaktivazofarbstoffe zusammensetzten. Sowohl die Anpassung des organischen Anteils im isokratischen Teil zu Beginn der Monitoring-Methode als auch die Gradientenführung ermöglichen es, auch kationische aromatische Amine selektiv zu chromatographieren und mit dem Dioden-Array-Detektor zu detektieren.

Die gesamte Analysendauer der TBAAC-Ionepaarchromatographie mit Dioden-Array-Detektion sowie anschließender IC-Kationensuppression und ESI-MS/MS konnte durch die Verwendung einer Bischoff-AQ-Säule auf 15 Minuten reduziert werden, was das substanzspezifische Monitoring aus beiden Bioreaktoren im Halbstundentakt ermöglichte. Zurückzuführen ist die Verkürzung der chromatographischen Methodendauer im Vergleich zu herkömmlich eingesetzten 125mm-Säulen mit 5µ-Partikeln im Wesentlichen auf die Kombination von 3µ-Partikeln bei kürzer Säulenlänge von 53 mm bei nahezu gleichbleibender Trennleistung. Eine Reduktion der Equilibrierphase von zehn auf zwei Minuten ermöglichte das spezielle polare Endcapping der Bischoff-AQ-Säule, die zu einer besseren Benetzung und Stabilität der C18-Alkylketten bei wässrigen Eluenten mit organischem Anteil < 10% führt und zur Reduktion der Analysendauer mit beiträgt.

Im Vergleich zu neun anderen Säulen zeichnete sich die Bischoff-AQ-Säule durch gute Selektivität, Auflösung und Trennleistung für eine Mischung von 14 verschiedenen Azofarbstoffen sowie Vor- und Abbauprodukten aus. Auch bei der Übertragung auf Online-Bedingungen konnten die meisten unbekannten und zu identifizierenden Verbindungen aus den Bioreaktoren chromatographisch getrennt werden. Bei koeluierenden Verbindungen wurde die nicht ausreichende chromatographische Trennleistung durch die selektive Detektion mit dem Tandem-Massenspektrometer kompensiert. Säulen mit polarer Selektivität, die durch ein polares Endcapping oder polares Embedding von Amid- oder Carbamatgruppen erreicht wird, eignen sich entgegen der Herstellerangaben nicht zur Chromatographie kleinerer sulfonierter aromatischer Verbindungen, da diese durch Ladungsabstossungsreaktion vor dem Totvolumen eluieren.

Ein Elektrospray-Interface war im negativen Ionenmodus am besten für die massenspektrometrische Detektion der untersuchten Verbindungen geeignet. Die Kalibrierung der Monitoring-Methode mit 13 Referenzverbindungen zeigte, dass die Nachweisgrenzen der Detektion mit ESI-MS/MS bei externer Kalibrierung im mittleren  $\mu$ g L<sup>-1</sup>-Bereich lagen, ohne die Proben vor der Analyse einer Proben- bzw. Matrixaufreinigung zu unterziehen. Bei einzelnen Verbindungen konnten Nachweisgrenzen im mittleren ng L<sup>-1</sup>-Bereich (NWG<sub>DB71</sub> = 0,06  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) erzielt werden. Die unteren und oberen Grenzen der Kalibriergeraden, die über eine quadratische Regression mit x<sup>-1</sup>-Wichtung berechnet wurden, deckten den  $\mu$ g L<sup>-1</sup>-Bereich bis zum unteren mg L<sup>-1</sup>-Bereich ab. Höhere Konzentrationen im mg L<sup>-1</sup>-Bereich

konnten mit dem Dioden-Array-Detektor quantifiziert werden, dessen obere Grenze des linearen Bereichs für p-Base bei  $0.5~g_{p\text{-Base}}~L^{-1}$  (2500 mM) lag. Durch eine Verkleinerung des Injektionsschleifenvolumens konnte der Messbereich auch an höhere Konzentrationen angepasst werden. Die Wiederholpräzision lag bei einer Standardabweichung von durchschnittlich 20 % (n =35) für die 13 Referenzsubstanzen, was für die Zielsetzung des entwickelten Online-Prozess-Monitoring-Verfahren ausreichend ist.

Bei einem Vergleich der Detektionsempfindlichkeiten zeigten sich bei den getesteten Säulen und Methoden erhebliche Unterschiede. Die Bischoff-AQ-Phase, die in der Monitoring-Methode betrieben wurde, gehörte zu den Säulen mit der höchsten Detektionsempfindlichkeit. Die Überprüfung der Robustheit der Methode in bezug auf Matrixeffekte durch hohe Salzbelastungen in Textilabwasserkonzentraten zeigte, dass ein empfindliches LC-MS/MS-Monitoring auch bei Salzgehalten von bis zu 290  $g_{NaCl}$  L<sup>-1</sup> (5  $M_{NaCl}$ ) und 17,9  $g_{Na2SO4}$  L<sup>-1</sup> (0,1  $M_{Na2So4}$ ) möglich ist. Beim Monitoring der untersuchten Modell- und Realabwässer betrugen die Salzgehalte 20 - 80 g L<sup>-1</sup> NaCl (0,34 – 1,4 mM) und < 8,7 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mM), so dass der durchschnittliche ionisierungssuppressive Einfluss auf die Detektion mit der Monitoring-Methode im Bereich der Messgenauigkeit der Kalibrierung von <15 % bzw. < 25% bei <100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lag.

Die höhere Empfindlichkeit der ionenpaarchromatographischen Methoden war auf den ihr nachgeschalteten Kationensuppressor zurückzuführen, der durch Absorption von kationischen Matrixbestandteilen half, Ionisierungsstörungen im Elektrospray zu vermeiden. Damit wird der apparative Aufwand für das Online-Monitoring gerechtfertigt, der bei Verwendung flüchtiger Ionenpaarreagenzien wie Tri-n-butylamin entfallen würde. Durch die mikrofiltrationsmembranbasierte Probennahme ist keine Festphasenextraktion (SPE) zur Matrixaufreinigung bzw. Probenanreichung erforderlich, die bei dem entwickelten Multi-komponentenanalysenverfahren zusätzlich eine aufwändige Bestimmung der Wiederfindungsraten und Durchbruchvolumina bei unterschiedlichen SPE-Phasen erfordern würde.

# Stoffspezifisches Prozessmonitoring, Strukturanalyse und Untersuchung des Azofarbstoffabbaumechanismus von Reactive Black 5

Mit dem entwickelten Online-Multikomponentenanalyse-Verfahren war es erstmalig möglich, Entfärbeprozesse im anaeroben und aeroben Bioreaktor stoffspezifisch zu studieren. In Versuchsreihen mit Farbstoffkonzentration des hydrolysierten Modellfarbstoffes Reactive Black 5 von 8,5 g L<sup>-1</sup> (11,5 mM) und Raumbelastungen von bis zu 3 g L<sup>-1</sup> (4 mM L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) konnten in beiden Stufen des biologischen Behandlungsverfahrens mehr als 35 Verbindungen identifiziert werden. Davon wurden allein 23 Verbindungen dem anaerob-aeroben Abbauprozessen des Farbstoffes zugeordnet. Aus vorhandenen Referenzsubstanzen konnten durch die kollisionsinduzierte Fragmentierung Produktionenspektren erzeugt werden, die die Ableitung von Fragmentierungsmustern ermöglichen. Auf Grundlage dieser Muster konnten die bei Redoxprozessen gebildeten Intermediate des Farbstoffes und seiner Begleitverbindungen strukturanalytisch interpretiert und identifiziert werden. UV-VIS-Spektren, die aus Dioden-Array-Detektor-Messungen isolierten wurden, halfen, die Strukturvorschläge abzusichern.

Mit Hilfe des stoffspezifischen Monitorings der Ausgangsverbindungen und der gebildeten Intermediaten ließen sich halbquantitative Konzentrationsverläufe ableiten. Für unbekannte Verbindungen konnten anhand der Peakflächen aus MS/MS oder DAD-Messungen relative Konzentrationsverläufe berechnet werden. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Korrelation von Summenparametern mit der Entwicklung der stoffspezifischen relativen Konzentrationsverläufe innerhalb einer Versuchsreihe wurden folgende Abbaumechanismen im anaeroben Bioreaktor identifiziert:

Der Hauptmechanismus der Entfärbung des eingesetzten hydrolysierten Diazofarb-stoffes Reactive Black 5 war auf eine zweistufige reduktive Spaltung der Azobindun-gen zurückzuführen, die durch zwei Schwellenwerte von –250 und –400 mV charakterisiert

werden konnte. In einem Redoxpotentialbereich von –100 bis –250 mV trat bevorzugt die Reduktion der ortho-Aminoazobindung des Modellfarbstoffes auf. Unterhalb des oberen Schwellenwertes war der Diazofarbstoff nicht mehr nachweisbar, und es setzte die Reduktion der teilreduzierten Farbstoffe und Neben-farbstoffe bis zum Erreichen des unteren Schellenwertes ein. Der zweistufige reduktive Abbau spiegelt sich auch in unterschiedlichen Zeitkonstanten der Abbau-kinetik des Diazofarbstoffes Reactive Black 5 und seiner teilreduzierten Intermediate wider.

Bei Schwankungen des Redoxpotentials kommt es zu Autooxidation des teilreduzierten Farbstoffes Reactive Black 5 (RB5-H -PB  $\rightarrow$  RB5-H -PB-2H), bei der ein ortho-Diamin zu einem ortho-Diimin oxidiert wird. In Folge wird die noch intakte ortho-Hydroxyazobindung reduziert.

Bei Reduktionsvorgänge mit Zwei-Elektronen-Übertragung auf die tautomere Farb-stoffform bildete sich die Hydrazoform der ortho-Hydroxyazobindung. Wahrscheinlich erfolgte über eine Disproportionierungsreaktion die Bildung des teilreduzierten Farb-stoffes unter Abspaltung der Diazoniumkomponente p-Base.

Die Untersuchung zweier unbekannter Intermediate deutet darauf hin, dass es bei einem Nebenfarbstoff mit zwei ortho-Hydroxyazobindungen durch eine Spaltung von C-N-Bindungen zur Bildung von instabilen naphthalinbasierten α-Diazoketonen kommen kann.

Eine Re-Oxidation teilreduzierter Verbindungen, aus denen sich wieder Azofarbstoffe bilden, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

Als Folgeprodukte der vollständigen anaeroben Reduktion des Modellfarbstoffes wurde von Kudlich die Bildung 3,5,6-Triamino-4-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS) vorgeschlagen, das unter Autooxidation zu 6-Amino-5-hydroxy-3,4-diimino-3,4-dihydronaphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS $_{DP1}$ ) reagiert [201]. Die sauerstofffreie Beprobung des anaeroben Bioreaktors ermöglichte erstmalig den massenspektrometrischen Nachweis von TAHNDS $_{DP1}$ , das unterhalb des Schwellenwertes von –250 mV zu 4,6-Dihydroxy-3,5-diimino-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure hydrolysiert (TAHNDS $_{DP2}$ ).

Anhand der Fragmentierungsmuster der Verbindungen konnten die vorgeschlagenen Molekülstrukturen abgesichert werden. TAHNDS $_{DP2}$ , das für die blaue Rückverfärbung im aeroben Bioreaktor verantwortlich gemacht wird, konnten zwei weitere Folgeprodukte einer möglichen Hydrolyse zugeordnet werden. Die Hydrolyse von TAHNDS $_{DP2}$  zu 5,6-Dihydroxy-3-imino-4-oxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS $_{DP3}$ ) und weiter zu 4,6-Dihydroxy-3,5-dioxo-3,5-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure bzw. 5,6-Dihydroxy-3,4-dioxo-3,4-dihydro-naphthalin-2,7-disulfonsäure (TAHNDS $_{DP4}$ ) ist durch das abnehmende Verhältnis von N-haltigen (HCN mit 27 u) zu O-haltigen Neutralteilchen (CO mit 28 u) abgesichert. Ähnliche Mechanismen wurden bei der spontanen Transformation von ortho-aminohydroxy-substituierten Naphthalinen beobachtet [257], [262].

# Prozessmonitoring zur Beurteilung der stoffspezifischen Abbaubarkeit und Zuordnung der Restfarbigkeit

Anhand der stoffspezifischen prozessanalytischen Detektion mit DAD und LC-MS/MS war es möglich, die Abbaubarkeit einzelner Verbindungen in den anaerob-aeroben Prozessstufen zu beobachten und zu bewerten. Alle bekannten Verbindungen mit Azobindungen konnten im anaeroben Bioreaktor bei geeignetem Redoxpotential durch Reduktion der Azobindungen zu ihren entsprechenden Aminen abgebaut werden. Neben Autooxidationsreaktionen unterlagen diese Amine im anaeroben Bioreaktor keinem weiteren Abbau, wenn das Redoxpotential negativ blieb.

Die durch Reduktion des Modellfarbstoffes Reactive Black 5 freigesetzte p-Base (Diazoniumkomponente) konnte unter aeroben Bedingungen nach einer kurzen Adaptionsphase des immobilisierten Belebtschlammes abgebaut werden. Wahrscheinlich beinhaltete

der Abbau die vollständige Mineralisierung dieser Verbindungen, von der keine weiteren Folgeprodukte nachgewiesen wurden. Alle auf p-Base basierenden Verbindungen, die als Nebenprodukte der p-Base-Synthese und auf Nebenreaktionen der Hydrolyse im Färbebad zurückgeführt werden konnten, unterlagen einem vergleichbar guten Abbau im aeroben Bioreaktor. Die Verbindung 2-[2-(4-Amino-benzensulfonyl)-ethoxy]-ethansulfonsäure (ABSE-ESA) war als einziges p-Base-Derivat in der aeroben Stufe nicht abbaubar und trug mit 10% Anteil zur Erhöhung der UV-Absorption im Ablauf des Verfahrens bei.

Die naphthalinbasierten TAHNDS-Folgeprodukte der anaeroben Reduktion, die sich aus der Kupplungskomponente des Modellfarbstoffes ableiten, wurden in anderen Untersuchungen als teils abbaubar teils nicht abbaubar beschrieben [15], [201], [260]. In dieser Arbeit konnten sie eindeutig als die Hauptverursacher der Rückverfärbung und der Restfarbigkeit im Ablauf des Behandlungsverfahrens nachgewiesen werden. Das erstmals massenspektrometrisch nachweisbare primäre Reduktionsprodukt TAHNDS<sub>DP1</sub> unterlag bereits im anaeroben Bioreaktor bei einem Anstieg des Redoxpotentials über –250 mV einer Autooxidation zum stabilen TAHNDS<sub>DP2</sub>. In der aeroben Stufe bildeten sich unter Hydrolyse die neuen Folgeprodukte TAHNDS<sub>DP3</sub> und TAHNDS<sub>DP4</sub> mit je zwei Isomeren. Durch die blau Färbung, die diese Verbindung in wässriger Lösung hat, stellten TAHNDS<sub>DP2</sub> und TAHNDS<sub>DP4</sub> mengenmäßig den größten Anteil an der Restfarbigkeit im Ablauf des anaerob-aeroben Verfahrens mit abschließender Membranstufe. TAHNDS<sub>DP4</sub> als finales Hydrolyseprodukt akkumulierte in der aeroben Stufe aufgrund der Rückhaltung durch die Ultrafiltrationsmembran. Ein Abbau wie ihn Kudlich bei TAHNDS<sub>DP2</sub> beobachtete, konnte nicht nachvollzogen werden [201].

Bei der Belastung des anaerob-aeroben Verfahrens mit Realabwässern und Modellabwasserkonzentraten konnte in beiden Fällen eine vollständige Reduktion der Azoverbindungen bei Raumbelastungen von bis zu 4 mM L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> im anaeroben Bioreaktor mit Hilfe des stoffspezifischen Monitorings nachgewiesen werden. Bei schwankenden Salzbelastungen im Zulauf von bis zu 80 g L<sup>-1</sup> wurde in der aeroben Stufe eine kurzzeitige Hemmung des Abbaus beobachtet. Nach einer Adaptionsphase von etwa drei Tagen konnte in der Regel wieder ein Einsetzten des Abbaus von z.B. p-Base beobachtet werden.

Die nahezu konstante Abbaurate des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) von 80 % bei schwankender Salzbelastung zeigt, dass die aeroben Stufe auch bei der Belastung des anaeroben Bioreaktors mit Abwasserkonzentraten stabil betrieben werden kann. Je nach Anteil an leicht abbaubaren C-Quellen wie Schlichtemitteln leistet der anaerobe Reaktor einen Teil der CSB-Eliminierung, wodurch ausreichend Redoxäquivalente zur Reduktion der Azobindungen zur Verfügung gestellt werden.

# Stoffspezifisches Prozessmonitoring, Strukturanalyse und Untersuchung des Azofarbstoffabbaumechanismus von Reactive Orange 16

Das Monitoring von Reactive Orange 16 in der anaeroben Stufe ergab eine Korrelation des Farbstoffabbaus mit den gemessenen Redoxpotentialswerten. Die hydrolysierte und die Vinylform des Farbstoffes Reactive Orange 16 wurden bei einem Redoxpotential unterhalb - 310 mV vollständig abgebaut. Die Abbauprodukte des Farbstoffes entstanden durch reduktive Spaltung der Azobindung (p-Base und NA-DAHNSA<sub>DP3</sub>) und unterlagen weiteren Reaktionen, wie der Reduktion der Acetylgruppe (DAHNSA), Substitution der Aminogruppe am Naphthalinring (NA-DAHNSA- und DAHNSA-Reihe) und Bildung von Kopplungsprodukten (RO16-Derivat).

Die UV-VIS-Messung zeigte im kontinuierlichen Versuch nach dem 17. Betriebstag eine deutliche Abnahme der Lichtabsorption im sichtbaren Wellenlängebereich und eine Zunahme der UV-Lichtabsorption. Dies entspricht nach der stoffspezifischen Zuordnung der UV-VIS-Lichtabsorption und nach der Ergebnissen der MS-Untersuchung der Bildung von chinoiden und hydroxylierten Formen der NA-DAHNSA-Verbindungen (NA-DAHNSA<sub>DP2</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>) sowie des Kopplungsproduktes der p-Base mit einem

Napthalinsulphonsäurederivat (RO16-Derivat). Die geforderte 95%-ige Entfärbung des Abwasserkonzentrates wurde nicht erreicht. Im Batch-Versuch hat ein 15%-iger TOC-Abbau stattgefunden, während bei der kontinuierlichen Betriebsweise schwankende TOC-Werten beobachtet wurden.

In der aeroben Stufe des Verfahrens wiesen p-Base, Sulfanilsäure, die hydroxylierte Derivate der DAHNSA- und NA-DAHNSA-Verbindungen (DAHNSA<sub>DP5</sub> und NA-DAHNSA<sub>DP5</sub>) sowie die im Hydrolysat vorhandenen monomeren Naphthalinsulphonate sehr gute Abbaubarkeiten auf. Die Verbindungen wurden innerhalb von 2-3 Tagen vollständig abgebaut. Als vermeintliche Abbauprodukte dieser Verbindungen wurde die Bildung von massenspektrometrisch nicht zu identifizierenden Verbindungen UNK 606 und UNK 662 beobachtet. Die UV-VIS-Lichtabsorption war im aeroben Versuchen nahezu konstant oder leicht gestiegen, sowie kein TOC-Abbau hat stattgefunden.

Das Monitoring der Abbauprodukte im Reaktor mit nicht immobilisierten Mikroorganismen zeigte einen langsameren Abbau der p-Base im Vergleich zum Reaktor mit immobilisierten Mikroorganismen und keinen Abbau von DAHNSA<sub>DP5</sub>. Der Abbau anderer Intermediaten wies ähnliche Konzentrationsverläufe wie unter Einsatz der trägerfixierten Mikroorganismen auf. Es wurden Fragmentierungsmuster der negativen Ionen einiger Verbindungen gewonnen. Dabei wurden eine Spaltung der N-C-Bindung des zu untersuchenden RO16-Hydrolysats und eine Spaltung der Azobindung unter Wasserstoffübertragung der Vinylform Farbstoffes beobachtet. massenspektroskopische des Die Untersuchung Naphthalinsulphonsäure-Derivate ergab hohe Intensitäten der Peaks. Kohlenstoffmonoxid-, Sulphurtrioxyd- und Sulphurdioxyd-Abspaltung entstanden.

# Stoffspezifisches Prozessmonitoring, Strukturanalyse und Untersuchung des Azofarbstoffabbaumechanismus von Reactive Orange 107

Der Farbstoff Reactive Orange 107 stellt neben den beiden anderen beiden Farbstoffen der Trichromie "Marineblau" eine herausragende Rolle bei der Beobachtung von Rückverfärbungsreaktionen dar. Ähnlich wie bei dem blauen Farbstoff Reactive Black 5, der blaue Rückbverfärbungskomponenten TAHNDS<sub>DP1-4</sub> bildete, ist bei Reactive Orange 107 die Bildung einer noch unbekannten Verbindung UNK319 zu beobachten. Die Besonderheit dieser Verbindung ist ihre aerobe Abbaubarkeit, die im Zusammenhang mit einer weiteren Reduktion der Farbgkeit in der aeroben Stufe zu sehen ist.

Im Vergleich zu den Farbstoffen Reactive Black 5 und Reactive Orange 16 wurde bei Reactive Orange 107 bzw. den anaeroben Abbauprodukten keine Bildung von ortho-Hydroxyaminoaromaten beobachtet, die einer möglichen Autoxidation unterliegen.

Die Hauptkomponenten des Farbstoffes und auch die unter anaeroben Bedingungen gebildeten Intermediate ließen sich sehr gut abbauen. Auch Nebenkomponenten wie NA-ABSA und BNA-BSA ließen sich trotz ihrer sulfonierten aromatischen Grundkörper gut unter aeroben Bedingungen abbauen.

#### Verfahrensentwicklung und Optimierung

Das in dieser Arbeit erarbeitete Verfahrenskonzept bestehend aus einer anaeroben und aerob-membrangekoppelten Prozessstufe sollte für die Behandlung von azofarbstoffhaltigen Abwasserkonzentraten etabliert und optimiert werden. Um einen Austrag von Mikroorganismen aus den anaeroben in die aeroben Prozessstufe zu vermeiden, wurden diese auf aktivkohlebeschichteten Polyurethanschaumwürfeln immobilisiert. In Vergleichsversuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Immobilisierung der Mikroorganismen der anaeroben Stufe eine Verdopplung der Reduktionsgeschwindigkeit bei einer Farbstoffbelastung von 2,6 mM<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup> (1,9 g<sub>RB5-H</sub> L<sup>-1</sup>) erzielt werden kann. Damit ist es möglich, beim kontinuierlichen Betrieb des anaeroben 40-Liter-Bioreaktors hohe Raumbelastungen von bis zu 4 mM L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>

mit Zulaufkonzentrationen von bis zu 11 mM L<sup>-1</sup> bei Verweilzeiten zwischen vier bis zehn Tagen zu realisieren.

Um den anaeroben Bioreaktor als Hochleistungsreaktor zur Reduktion azofarbstoffhaltiger Konzentrate kontinuierlich zu betreiben, ist eine Regelung des Redoxpotentials auch bei Zugabe von Realabwässern mit hohem leicht abbaubaren C-Anteil empfehlenswert. Die Zudosierung von Ethanol hat sich in dieser Arbeit als ideal zur Redoxpotentialsenkung gezeigt. Durch die Installation einer Regelung wäre es möglich, ein stabiles Redoxpotential unterhalb des zweiten Schwellenwertes von –400 mV auch bei sehr hohen Farbstoffzulaufkonzentrationen zu erreichen. Eine Verschleppung von teilreduzierten Azofarbstoffen und den im Bereich des ersten Schwellenwertes gebildeten Intermediaten in die aerobe Stufe könnte damit ausgeschlossen werden. Damit vermiede man die mit den Intermediaten in Zusammenhang stehende Verschlechterung der Entfärbeleistung und den enormen Anstieg der UV-Absorption um bis zu 2000 % in bezug auf die Zulauf-Absorption.

Die Versuchsreihen mit unterschiedlichen Raumbelastungen des Verfahrens zeigen, dass unter optimalen Bedingungen allein durch anaerobe Behandlung im blauen Spektralbereich die geforderte Entfärbung von 95% erreicht werden kann. Bedingt durch die Bildung der Rückverfärbungsprodukte liegt die Entfärbung im roten Bereich bei 90 % und im gelben Bereich bei 80 - 85 %. Ohne die geforderte Reduzierung des chemischen Sauerstoffbedarfes von 80 %, wäre eine optimierte anaerobe Behandlung wahrscheinlich zum Erreichen der 95 %igen Entfärbung ausreichend.

Die aerobe Stufe wird durch die nachgeschaltete Cross-Flow-Ultrafiltration als Bio-Membran-Reaktor betrieben. Um das biologische Membranfouling möglichst gering zu halten, ist auch in dieser Stufe die Immobilisierung der Mikroorganismen auf aktivkohlebeschichteten Polyurethanschaumwürfeln zu empfehlen. In der vorliegenden Untersuchung trägt die Immobilisierung dazu bei, dass bei unterschiedlichen Salzbelastungen der zugeführten Abwässer nach einer kurzzeitigen Hemmung des Abbaus im aeroben Bioreaktor und Adaption an die neuen Bedingungen die Mineralisierung fortgesetzt wird. Damit wird eine kontinuierliche Eliminierung des chemischen Sauerstoffbedarfs gewährleistet.

Um Störungen der Entfärbeleistung in der anaeroben Prozessstufe zu kompensieren und die Verweilzeit schwer oder nur langsam abbaubarer farbiger Verbindungen zu erhöhen, können Ultrafiltrationsmembranen eingesetzt werden. Die Wahl der molekularen Trenngrenze (MWCO) von Low-Cut-Membranen mit 3500 Da bis hin zu offenen Ultrafiltrationsmembranen mit bis zu 50000 Da ist dabei weniger entscheidend als die Stabilität der Permeatleistung. Die gemessenen Rückhaltung der getesteten Membranen (MWCO = 3500 bis 50000 Da) für die Rückverfärbungsprodukte liegen für TAHNDS $_{\rm DP2}$  zwischen 80 bis 90%. Die spezifischen Permeatflüsse hingegen schwanken zwischen 11 und 113 L m $^{-2}$  h $^{-1}$ . Über die Wahl des Betriebsdruckes kann die erforderliche Permeatflussmenge beeinflusst werden, wobei sich mit erhöhtem Druck das Membranfouling beschleunigt.

Für den kontinuierlichen Betrieb empfiehlt es sich, die Membranfläche so zu dimensionieren, dass der Betriebsdruck bei etwa 0,3 Mpa liegt, was einerseits zu einer erheblichen Reduktion des Reinigungsaufwands für die Membranen und andererseits zu einer erhöhten Betriebsdauer der Schläuche im Vergleich zu einem Betriebsdruck von 0,5 Mpa führt. Die Versuche mit unterschiedlichen Membranen zeigten, dass durch die Ultrafiltrationen schwankende Entfärbeleistungen der anaeroben Stufe soweit kompensiert werden können, dass ein Einhalten der geforderten 95 %igen Entfärbung im blauen, roten und gelben Bereich ermöglicht wird. Zusätzlich trägt die Ultrafiltration zu einer weiteren Reduktion des chemischen Sauerstoffbedarfs im Permeat bzw. im Ablauf des Verfahrens bei.

Zur Stabilisierung der Reaktorbedingungen wäre es sinnvoll, Konzentratchargen vor der Einleitung in das Anaerob-aerobe-Bio-Membran-Verfahren einer Vermischung zu unterziehen, um Stossbelastungen im Farbstoff- und Salzgehalt abzuschwächen. Durch diese Maßnahme sowie die Regelung des Redoxpotentials kann ein kontinuierlicher Betrieb des dargestellten Verfahrens zur mindestens 95 %igen Entfärbung von azofarbstoffhaltigen

Konzentraten bei einer 80 %igen Reduktion des chemischen Sauerstoffbedarfes gewährleistet werden.

### 9 Ausblick

Durch ihre universellen Einsatzmöglichkeiten ist das entwickelte Prozessanalyseverfahren auf viele analytische Problemstellungen übertragbar, bei denen ein stoffspezifisches Online-Multikomponenten-Monitoring erforderlich ist. Dazu gehört der Einsatz zur Überwachung einer Vielzahl anderer abwasserrelevanter Verbindungen, deren Abbauverhalten in biologischen oder anderen Behandlungsverfahren nicht bekannt ist. Mit der Erweiterung der Detektoren könnten die stoffspezifischen analytischen und strukturanalytischen Möglichkeiten vergrößert werden. Hier wäre beispielsweise eine Kopplung an eine Stop-Flow-NMR-Detektor denkbar, wie sie von Pham et al. zur Untersuchung von Farbstoffnebenverbindungen eingesetzt wurde und eine eindeutige Absicherung der Interpretation möglicher Intermediate bietet [3]. Weitere Untersuchungen könnten dann Aufschluss über die mögliche Bildung von  $\alpha$ -Diazoketonen durch eine Azo-Typ-Spaltung von Azobindung unter reduktiven Bedingungen bringen.

Neben der Beobachtung des Abbauverhaltens umweltrelevanter Verbindungen in Bioreaktoren könnte mit dieser hochselektiven Technik auch der Bereich der prozessintegrierten Qualitätskontrolle erschlossen werden, wie sie von Widmer im Rahmen der Weiterentwicklung prozessanalytischer Techniken bzw. Totaler Analysensysteme (TAS) gefordert wurde [136]. Durch die Verwendung von kürzeren partikulären Säulen, die mit 1,8µ-Partikeln gepackt sind oder von monolithischen Säulen können die Methodendauern zu Trennung komplexer Mischungen auf wenige Sekunden bis Minuten reduziert werden. Damit erschließt sich für die Multikomponentenanalyse beispielsweise auch der Bereich schnell ablaufender chemischer Synthesen von nicht oder wenig flüchtiger Verbindungen, deren Reaktionskonstanten im Minutenbereich liegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die bislang wenig untersuchte Behandlung von azofarbstoffhaltigen Konzentraten in anaerob-aeroben Behandlungsverfahren grundsätzlich möglich ist. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass sie sich auch für andere Farbstoffklassen wie die Dispersions- und Substantivfarbstoffe eignet [31].

Bei der Neuinstallation von Abwasserbehandlungskapazitäten wäre es sinnvoll, den Einsatz des entwickelten biologischen Verfahrens zur Behandlung hochkonzentrierter farbstoffhaltiger Abwässer mit Maßnahmen des produktintegrierten Umweltschutz (PIUS) zu kombinieren. Neben den Restflotten könnten dem Verfahren Abwasserkonzentrate zugeführt werden, die beim Prozesswasserrecycling wenig belasteter Spülbäder und Prozessabwässer durch Membrankonzentration anfallen.

Die Anwendung der diskutierten Optimierungsansätze wäre auch auf bereits bestehende biologische Verfahren zur Entfärbung niedrig belasteter Abwässer denkbar, um sie in ihrer Entfärbungskapazität für Abwasserkonzentrate effektiv erweitern zu können. Die von Minke und Rott vorgeschlagene Trennung von wenig und stark belasteten Abwasserströmen ist in diesem Zusammenhang erstrebenswert, um eine gezielte Teilstrombehandlung etablieren zu können [12], [21].

## 10 Literatur

- [1] Foeller, A., Industrievereinigung Farbstoffe und organische Pigmente im Verband der Chemischen Industrie e.V., 2005
- [2] Kaps, U., Kopp M., Richter K., Quantitative Untersuchungen zur Erfassung der Umweltexpositionen im Bereich der in der Textilveredelung eingesetzten Chemikalien, Umweltforschungsvorhaben des Bundesministers für Umwelt Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsvorhaben 10602061, 73, 1990
- [3] Pham, T.L.H Rotard, W., Preiss, A., Elend, M., Möglichkeiten und Grenzen der LC-MS bei der Analyse von Farbstoffmetaboliten, SfB 193, Biologische Abwasserbehandlung 16, 2. LC-MS Kolloquium, TU Berlin, 2001
- [4] Zoellinger, H., Color Chemistry, Wiley-VCH, 1998, 3. Auflage
- [5] ATV-Arbeitsgruppe 7.2.23 "Textilveredelungsindustrie", Abwasser der Textilindustrie, Korrespondenz Abwasser - ATV-Arbeitsberichte, 36, 1989, 1074-1083
- [6] Schönberger, H., Zu Abwasserfrage der Textilveredelungsindustrie, Dissertation, TU Berlin, 1996
- [7] Hillebrand, T., Böhm, E., Landwehr, M., Marscheider-Weidemann, F., Die Abwassersituation in der deutschen Papier-, Textil- und Lederindustrie Repräsentative Bestandsaufnahme für die Bewertung chemischer Stoffe, GWF Wasser Abwasser, 73, 1999, 267-273
- [8] Heinfling, A., Bergbauer; M., Szewzyk, U., Biodegradation of reactive dyes by white-rot fungi perspectives for an application in wastewater treatment, Sfb 193 - Biologische Abwasserreinigung 9, 171-187
- [9] Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer, AbwV Anhang 38 Textilherstellung, Textilveredlung, WassR 2.2.1.38, Stand 6/2004
- [10] BMU-/LAGA Hinweise und Erläuterungen zu Anhang 38, 1/2004
- [11] Sosath, F., Biologisch-chemische Behandlung von Abwässern der Textilveredelung mit Reaktivfarbstoffen, Fortschritt-Berichte VDI Reihe 15 Umwelttechnik, 215, 1999
- [12] Minke, R.; Rott, U., Oxidative Aufbereitung und anaerobe Vorbehandlung, 23. Osnabrücker Umweltgespräch, Vortrag,, Prozessnahe Maßnahmen zum Integrierten Umweltschutz in der Textilveredelung, Osnabrück, 2003
- [13] Oxspring, D. A., McMullan, G., Smyth, W.F., Marchanat, R., Decolourisation and metabolism of the textile dye Remazol Black B by an immobilized microbial consortium, Biotechn. Letters, 18, 5, 1996, 527-530.
- [14] Wiesmann, U., Sosath, F., Borcher, M., Riedel, G., Breithaupt, T., El-Dein, A. M., Libra, J. Versuche zur Entfärbung und Mineralisierung des Azo-Farbstoffs C.I. Reactive Black 5, GWF Wasser Abwasser, 143, 4, 2002, 329-336
- [15] Libra, J. A., Borcher, M., Vigelahn, L., Strom, T., Two stage biological treatment of diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites, Chemosphere, 56, 2, 2004, 167-180
- [16] Minke, R., Optimierung der Reinigungsleistung einer kommunalen Kläranlage durch Steuerung der Einleitung eines Textilveredelungsbetriebes, Vortrag, Stuttgarter Kolloquium 2004, Industrieabwasser und Veredelung, Universität Stuttgart
- [17] Baumann, P., On-line-Messtechnik in Abwasseranlagen, KA Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall, 48, 6, 786-791, 2001
- [18] Hengel, R., Innovative Systemlösungen in der Online-Abwasseranalytik, WLB Wasser, Luft und Boden, 7/9, 30, 32-33, 1999

- [19] Beck, H. P., Klein, C., Ertunc, T., Simultane Inline-Überwachung von Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat im Ablauf kommunaleer Kläranlagen, WLB Wasser, Luft und Boden, 7/9, 34-36, 1999
- [20] Staiger Mohilo, Inline-Analytik auf Kläranlagen, WLB Wasser, Luft ud Boden, 43, 10, 43-44, 1999
- [21] Minke, R., Rott, U., Prozesswasser-Rückgewinnnung und Abwasser-Vorbehandlung in der Textilveredelungsindustrie, Wasser und Abfall, 6, 2000, 20-25
- [22] Correia, V.M., T. Stephenson; S. J. Judd, Charactarization of textile wastewaters a review, Environmental Technology, 15, 1994, 917-929
- [23] Bisschops, I., Spanjers, H., Literature review on textile wastewater characterisation, Environmental Technology, 24, 2003, 1399-1411
- [24] N. N., Modifikation textiler Prozesse sowie Einsatz neuer und verbesserter Verfahren zur Eliminierung von Laststoffen aus dem Abwasser der Textilveredelung, Abschlussbericht zum Deutsch -Brasilianischen Gemeinschaftprojekt, Institut für Textil- und Verfahrenstechnik, Denkendorf, 1999
- [25] N. N., Technische Anleitung zur Verwertung, Behandlung und sonstigen Entsorgung von Siedlungsabfällen, TA Siedlungsabfall, Banz. S. 4967, 14. Mai 1993
- [26] N. N., Textilindustrie übergibt Selbstschutzverpflichtung für verbesserten Gewässerschutz, BMU-Pressedient 063/97, 1997
- [27] N.N., Einführung in die Textilfärberei, I. Teil: Cellulosefasern, Bayer AG
- [28] Rys, P., Stamm, O. A., 265. Zur Reaktion von Reaktivfarbstoffen mit Cellulose V. Untersuchung von Nebenprodukten bei der Applikation von Reaktivfarbstoffen, Helvetica Chimica Acta, 49, Fasciculus 7, 2287-2296, 1966
- [29] Schönberger, H., Zur Abwasserfrage der Textveredelungsindustrie, Fortschritt-Berichte VDI Umwelttechnik, 196, 1998, VDI-Verlag, Düsseldorf, S. 6
- [30] Holme, I., Thornton, A., Reactive dyes pose main problem in colour clean-up, International Dyer, 179,1994, 19-21
- [31] Sarsour, J., Reduzierung der Belastung des Textilveredelungsabwassers durch eine kombinierte anaerobe/aerobe Behandlung hochkonzentrierter Abwasserteilströme, Dissertation, Universität Stuttgart, 2004
- [32] Staude, E., Reversosmose farbstoffhaltiger Abwässer, Chemie Ingenieur Technik, 45, 20, 1979, 1222-1225
- [33] Correia, V.M., T. Stephenson; S. J. Judd., Charactarization of textile wastewaters a review., Environmental Technology, 15, 1994, 917-929
- [34] Cooper, A.R., Booth, R.G., Purification of polymeric dyes by ultrafiltration, J. Appl. Polymer. Sci., 23, 1979, 1373-1384
- [35] Erswell, A., Brouckaert, C. J., Buckley, C.A., The reuse of reactive dye liquors using charged ultrafiltration membrane technology, Desalination, 70, 1988, 157-167
- [36] Porter, J.J., Membrane filtration techniques used for recovery of dye, chemicals and energy, American Dyestuff Reporter, 22, 6, 1990, 21-25
- [37] Treffry-Goatley, K., Buckley, C.A., Groves, G.R., Reverse Osmosis treatment and reuse of textile effluents, Desalination, 47, 4, 1983, 313-320
- [38] Sójka-Ledakowicz, J., Koprowski, T., Machnowski, W., Knudsen, H. H., Membrane filtration of textile dyehouse wastewater for technological waster reuse, Desalination, 19, 1998, 1-10

- [39] Van der Bruggen, B., De Vreese, I., Vandecasteele, C., Water Reclamation in the Textile Industry: Nanofiltration of Dye Baths for Wool Dyeing, Ind. Eng. Chem. Res., 40, 2001, 3973-3978
- [40] Chen, G., X. Chai, P-L. Yue, Y. Mi, Treatment of textile desizing wastewater by pilot scale nanofiltration membrane separation, Journal of Membrane Science, 127, , 1997, 93-99
- [41] Bes-Piá, A., Mendoza-Roca, J.A., Alcaina.Miranda, M.I., Iborra-Clar, A., Iborra-Clar, M.I., Reuse of wastewater of the textile industry after its treatment with a combination of physico-chemical treatment and membrane technologies, Desalination, 149, 2002, 169-174
- [42] Marcucci, M., Ciardelli, G., Matteucci, A., Ranieri, L., Russo, M., Experimental campaigns on textile wastewater for reuse by means of different membrane processes, Desalination, 149, 2002, 137-143
- [43] Koyuncu, I., Reactive dye removal in dye/salt mixtures by nanofiltration membranes conatining viniylsulphone dyes: Effects of feed concentration and cross flow velocity, Desalination, 143, , 2002, 243-253
- [44] Akbari, A., Remigy, J.C., Aptel, P., Treatment of textile dye effluent using a polyamide-based nanofiltration membrane, Chemical Engineering and Processing, 41, 2002, 601-609
- [45] Minke, R., Rott, U., Produktionsintegrierter Umweltschutz in der Textilindustrie, awt -Abwassertechnik, 3, 1998, 5-13
- [46] Minke, R., Rott, U., Prozesswasser-Rückgewinnnung und Abwasser-Vorbehandlung in der Textilveredelungsindustrie, Wasser und Abfall, 6, 2000, 20-25
- [47] Schönberger, H., Kaps., U., Reduktion der Abwasserbelastung in der Textilindustrie. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben 10206511 des Umweltbundesamtes, UBA-Texte, 1994
- [48] Van der Bruggen, B., Lejon, L., Vandecasteele, C., Reuse, treatment, and discharge of the concentrate of pressure-driven membrane processes, Environ. Sci. Technol., 37, 17, 2003, 3733-3737
- [49] Rehn, I., Blasengeschwulste bei Fuchsin Arbeitern, Arch. Klein. Chir., 50, 1895, 588
- [50] Case, R.A., Hosker, M.E., McDonald, D.B., Pearson, J.T., Tumours of urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha naphtylamine and beta naphthylamine, Br. J. Ind. Med., 11, 75, 1954, reprinted in 50, 5, 1993, 389-411
- [51] International Agency for Research on Cancer (IRAC), www.iarc.fr
- [52] Request for Assistance in... Health Hazard Alert— Benzidine- o-Tolidine-, and o-Dianisidine-Based Dyes, NIOSH ALERT 1980, DHHS (NIOSH) Publication No. 81-106, http://www.cdc.gov/niosh/81-106.html
- [53] Boeniger, M., Carcinogenicity And Metabolism Of Azo Dyes, Especially Those Derived From Benzidine, PB81-171027, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), July 1980
- [54] Current 24, DIRECT BLUE 6, DIRECT BLACK 38, AND DIRECT BROWN 95 BENZIDINE DERIVED DYES, DHHS (NIOSH) Publication no. 78-148, 1978, http://www.cdc.gov/niosh/78148\_24.html
- [55] Rinde, E., Troll, W., Metabolic Reduction of Benzidine Azo Dyes to Benzidine in the Rhesus Monkey, J National Cancer Institute, 55, 1, 1975, 181-182
- [56] Brown, M.A., DeVito, S.C., Predicting Azo Dye Toxicity, Critical Review in Environmental Science and Technology, 23, 3, 1993, 249-324
- [57] DyStar Ecology, German Legislation on Azo Dyes, 2000, DyStar Textilfarben GmbH & Co. Deutschland KG, Customer Service Ecology, P.O. Box 100480, 51304 Leverkusen, Deutschland

- [58] N.N., Untersuchung von Bedarfsgegenständen, Nachweis der Verwendung bestimmter Azofarbstoffe aus textilen Bedarfsgegenstände, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG B 82.02-2, 1998-01
- [59] Directive 2002/61/EC of the European Parliament and of the Council of 19th July 2002, Official Journal of the European Communities, 2002, L243/15.
- [60] Mündliche Mitteilung, Dr. Hans-Ulrich Krieg, Eco-Umweltinstitut, 2003
- [61] Clarke, E. A., Anliker, R., Organic dyes and pigments. Handbook of Environmental Chemistry, Springer Verlag, 1980
- [62] Hildenbrand, S., Schmahl, F. W., Wodarz, R., Kimmel, R., Dartsch, P.C., Azo dyes and carcinogenic aromatic amines in cell cultures, International Archives of Occupational Environmental Health, 72 (Suppl 3), M52-M56, 1999
- [63] N. N., New strategy for future EU chemicals policy-EURATEX Statement –final. EURATEX-European Apparel and Textile Organisation, April 2002, http://www.euratex.org/download/publications/papers/white\_paper\_euratex\_statement\_final.doc .html
- [64] Sicherheitsdatenblatt 250469/01, Remazol Brilliantorange 3R, DyStar, 1996
- [65] Sicherheitsdatenblatt 256777/02, Remazol Goldgelb RNL 150%, DyStar, 1999
- [66] Material Safety Data Sheet, Reactive Black 5, Sigma-Aldrich Co., 2001
- [67] Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A., Forsythe, S., The toxicity of textile reactiveazo dyes after hydrolysis and decolourisation, J Biotechnol, 101, 2003, 49-56
- [68] Soewondo, P., Zweistufige anaerobe und aerobe biologische Behandlung von synthetischem Abwasser mit dem Azofarbstoff CI Reactive Orange 96, TU Berlin, Dissertation, 1997
- [69] Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der GDCh, 145-147 BUA-Stoffberichte: Kurzberichte, Benzoesäure, Natriumbenzoat; m-Toluidin; C.I. Reactive Black 5, S. Hirzel Verlag, 1995
- [70] Shenai, V.A., Some aspects of toxicity of aromatic amines and azo dyes., Colourage, 44, 12, 1997, 41-46
- [71] Myslak, Z. W., Bolt, H. M., II. Toxikologische und arbeitsmedzinische Aspekte, Bekleidung und Wäsche, 11, 1990, 75-77
- [72] Reinke, M., Anwendung von automatisierten und miniaturisierten Toxizitätstests bei der Überwachung und Bewertung von Methoden zur biologischen Reinigung von Industrieabwässern, Dissertation TU Berlin, 1995
- [73] Schmidt, M., Analytische Verfolgung des mikrobielleen Abbaus des Reaktivfarbstoffes Remazol-Brilliantviolett 5R (neu), TU Berlin, Diplomarbeit, 1994
- [74] Toxic Substances Control Act, 1976, http://www.epa.gov/region5/defs/html/tsca.htm
- [75] TSCA NEW CHEMICALS PROGRAM (NCP) CHEMICAL CATEGORIES, EPA, 2000, http://www.epa.gov/oppt/newchems/chemcat.htm
- [76] Baughman, G. L., Weber, E. J., Transformation of Dyes and Related Compounds in Anoxic Sediment: Kinetics and Products, Environ. Sci. Technol., 28, 1994, 267-276
- [77] Malle, K. G., Wie schmutzig ist der Rhein?, Chemie in unserer Zeit, 12, 1978, 111-122
- [78] Zerbinati, O., Salomone, S., Ostacoli, G., Sulfonated derivatives of naphthalene in water samples of an Italian river, Chemosphere, 29, 12, 1994, 2639-2643
- [79] Zerbinati, O., Vincenti, M., Pittavano, S., Gennaro, M. C., Fate of aromatic sulfonated in fluvial environment, Chemosphere, 35, 10, 1997, 2958-2305

- [80] Riu, J., Schönsee, I., Barceló, D., Determination of sulphonated azo dyes in water and wastewater, Trends in Analytical Chemistry, 16, 7, 1997, 405-419
- [81] Riu, J., Schönsee, I., Barceló, D., Determination of Sulfonated Azo Dyes in Groundwater and Industrial Effluents by Automated Solid-phase Extraction Followed by Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry, Journal of Mass Spectrometry, 33, 1998, 653-663
- [82] Fracasso, M. E., Leone, R., Brunello, F., Monastra, C., Tezza, F., Storti, P. V., Mutagenic activity in wastewater concentrates from dye plants, Mutation Research, 298, 1992, 91-95
- [83] Chhaya, J., J. Thaker; R. Mittal, S. Nuzhat; A. P. Mansuri; R. Kundu, Influence of Textile Dyeing and Printing Industry Effluent on ATPasas in Liver, Brain, and Muscle of Mudskipper, Periophthalmus dipes, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 1997, 793-800
- [84] Hitchcock, D. R., Law, S. E., Wu, J., Williams, P. L., Determining Toxicity Trends in the Ozonation of Synthetic Dye Wastewaters Using the Nematode Caenorhabditis elegans, Arch. Envirin. Toxicol., 34, 1998, 259-264
- [85] Wang, C., Yediler, A., Lienert, D., Wang, Z., Kettrup, A., Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of ist oxidation products, Chemosphere, 52, 2003, 1225-1232
- [86] Burkinshaw, S.M., C. Graham, Recycling of Exhausted Reactive Dyebath, Dyes and Pigements, 28, 3, 1995, 193-206
- [87] Willmott, N., Guthrie, J., Nelson, G., The biotechnology approach to colour removal from textile effluent, Journal of Society of Dyers and Colourists, 114, 2, 1998, 38-41
- [88] Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., Micobial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review, Bioresource Technology, 58, 1996, 217-227
- [89] Hao, O.J., Kim, H., Chaing, P.C., Decolorization of Wastewater, Critical Review in Environmental Science and Technology, 30, 4, 2000, 449-505
- [90] Uygur,A., An overview of oxidative and photooxidative decolorisation treatments of textile waste waters, J. Soc. Dyers Colourists, 113, 7/8, 1997, 211-217
- [91] Vogt, U., Baylase<sup>®</sup> Rp-System Echtheitswäsche von Reaktivfärbungen, Stuttgarter Kolloquium Industrieabwasser und Textilveredelung, 2004, Tagungsband, S. 41
- [92] Cooper, P., Removing colour from dyehouse waste waters a critical review of technology available, Journal of Society of Dyers and Colourists, 109, 1993, 97-100
- [93] Marmagne, O., Coste, C., Color removal from textile plant effluents, American Dyestuff Reporter, 1996, 15-21
- [94] Vandevivere, P. C., Bianchi, R., Verstraete, W., Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 72, 1998, 289-302
- [95] Slokar, Y. M., Majcen Le Marechal, A., Methods of decoloration of textile wastewaters, Dye and Pigements, 37, 4, 1998, 335-356
- [96] Rott, U., Minke, R., Overview of wastewater treatment and recycling in the textile processing industry, Water Science and Technology, 40, 1, 1999, 137-144
- [97] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatmant technologies with a proposed alternative, Bioresource Technology, 77, 2001, 247-255
- [98] Steenken-Richter, I., Kermer, W. D., Decolorising textile effluents, Journal of Society of Dyers and Colourists, 182, 1998, 182-186
- [99] Pagga, U., Brown, D., The degradation of dyestuffs. II. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests., Chemosphere, 15, 4, 1986, 479-491

- [100] Anliker, R., The biodegradability and environmental relevance of dyestuffs, ETAD Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industry, Newsletter, 1986
- [101] Rieger, P. G., Meier, H. M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H., Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence, Journal of Biotechnology, 91, 1, 2002, 101-123
- [102] Rau, J., Die anaerobe Reduktion von Azofarbstoffen durch Bakterien in Gegenwart von Redoxmediatoren, Dissertation, Universität Stuttgart, 2002, S.18
- [103] Kulla, H. G., Aerobic bacterial degradation of azo dyes. In: Leisinger, T., Cook, A.M., Hutter, R., Nuesch, J. (eds); Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, Academic Press, London, 1981, S. 387-399
- [104] Stolz, A., Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes, Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 1/2, 2001, 69-80
- [105] Zimmermann, T., Kulla, H., Leisinger, T., Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by Pseudomonas KF46., European Journal of Biochemistry, 129, 1982, 192-203
- [106] Ginocchio, J. C., Bischofberger, H., Gmünder, A., Farbelimination in kommunalen Kläranlagen, Chemie Ingenieur Technik, 56, 4, 1984, 310-312
- [107] Shaul, G. M., Dempsey, C. R., Dostal, K. A., Fate of water soluble azo dyes in activated sludge process, EPA/600/S2-88/030, 1988
- [108] Shaul, G. M., Holdsworth, T. J., Dempsey, C. R., Dostal, K. A., Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process, Chemosphere, 22, 1991, 107-119
- [109] Brohm, K., Frohwein, E., Zbl. Lebensmitt. Forsch., 73, 1937, 30
- [110] van der Zee, F. P., Anaerobic azo dye reduction, Dissertation Wagenigen Universität, Institut für Agrartechnologische Untersuchungen, Niederlande, 2001
- [111] van der Zee, F. P., Lettinga, G., Field, J. A., Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge, Chemosphere, 44, 5, 2001, 1169-1176
- [112] van der Zee, F. P., Villaverde, S., Combined anaerobic-aerobic treatment of azo-dyes A short review of bioreactor studies, Water Research, 39, 2005, 1425-1440
- [113] Dubin, P., Wright, K. L., Reduction of azo food dyes in cultures of Proteus vulgaris, Xenobiotica, 5, 1975, 563-571
- [114] Russ, R., Rau, J., Stolz, A., The Function of Cytoplasmic Flavin Reductases in the Reduction of Azo Dyes by Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 66, 4, 2000, 1429-1434
- [115] Gingell, R., Walker, R., Mechanism of azo reduction by Streptococcus faecalis II. The role of soluble flavins, Xenobiotica ,1, 1971, 231-239
- [116] Nam, S., Renganathan, V., Non-enymatic reduction of azo dyes by NADH, Chemosphere, 40, 1999, 251-357
- [117] Kudlich, M., Keck, A., Klein, J., Stolz, A., Localization of the Enzyme System Involved in Anaerobic Reduction of Azo Dyes by Sphingomonas sp. Strain BN6 and Effect of Artificial Redox Mediators on the rate of Azo Dyes Reduction, Applied and Environmental Microbiology, 63, 9, 1997, 3691-3694
- [118] Garten, V. A., Weoss, D. E., The quinone-hydroquinone character of activated carbon and carbon black, Australian Journal of Chemistry, 8, 1955, 68-95
- [119] Wuhrmann, K., Mechsner, K., Kappeler, T., Investigation on rate-determining factors in the microbial reduction of azo dyes, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9, 1980, 325-338
- [120] Mechsner, K.; Wuhrmann, K., Cell permeability as a rate limiting factor in the microbial reduction of sulfonated azo dyes, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 1982, 123-126

- [121] Liebelt, U., Hempel, D.-C., Anaerobe Spaltung von Reaktivfarbstoffen mit chromophorer Azogruppe, Das Gas- und Wasserfach, 137, 7, 1996, 372-380
- [122] Huheey, J. E., Anorganische Chemie, Walter de Gruyter, Berlin, 1988
- [123] Karlson, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994
- [124] Gottschalk, G., Bacterial Metabolism, Springer-Verlag, New York, 1986
- [125] Schmidt, M., Analytische Verfolgung des mikrobielleen Abbaus des Reaktivfarbstoffes Remazol-Brilliantviolett 5R (neu), TU Berlin, Diplomarbeit, 1994
- [126] Yoo, Eui Sun, Biological and chemical mechanisms of reductive decolorization, Dissertation, TU Berlin, 2000
- [127] Yoo, E.S., Libra, J., Adrian, L., Mechanism of Decolorization of Azo Dyes in Anaerobic mixed culture, Journal of Environmental Engineering, 2001, 844-849
- [128] Glässer, A., Entwicklung eines zweistufigen Verfahrens zum Totalabbau von Azofarbstoffen, Universität Paderborn, Dissertation, 1992
- [129] Cariell, C. M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C. A., Mulholland, D. A., Senior, E., Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions, Water SA, 21, 1995, 61-69
- [130] Nigam, P., Banat, M.I., Singh, D., Marchant,R., Microbial process for the decolourization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes, Process Biochemistry, 31, 5, 1996,435-442
- [131] Bär, J., Untersuchung des anaeroben Abbaus des Textilfarbstoffs Remazol Goldgelb 3R in suspendierter Biomasse, TU Berlin, Diplomarbeit, 1994
- [132] Krull, R., Hemmi, M., Hempel, D. C., Teilstrombehandlung von Abwässern der Textilveredelungsindustrie in einem Sequencing Batch Process, Colloquium Produktintegrierter Umweltschutz, Bremen, 1999, 1023-1039
- [133] Tan, N. C. G., Integrated and sequential anaerobic/aerobic biodegradation of azo dyes, Dissertation Wageningen Universität, Niederlande, 2001
- [134] Döpkens, E., Abwasserbehandlung und Prozesswasserrecycling in der Textilveredelungsindustrie, IBVT-Schriftenreihe, Hersg. D. C. Hempel, Institut für Bioverfahrenstechnik, TU Braunschweig, FIT-Verlag für Innovation und Technologietransfer, Band 19, 2004
- [135] Krull, R., Döpkens, E., Recycling of dyehouse effluents by biological and chemical treatment, Water Science and Technology, 49, 4, 2004, 311-317
- [136] Widmer, M., Industrielle on-line Analytik, GIT Fachz. Lab, 40, 4, 1996, 304-306
- [137] Geisow, M. J., What's cooking? Optimizing bioprocess monitoring, TIBTECH, 10, 1992, 230-232
- [138] Ritzka, A., Sosnitza, P., Ulber, R., Scheper, T., Fermentation monitoring and process control, Current Opinion in Biotechnology, 8, 1997, 160-164
- [139] Olsson, L., Schulze, U., Nielsen, J., Online bioprocess monitoring an academic discipline or an industrial tool?, Trends in analytical chemistry, 17, 2, 1998, 88-94
- [140] Schügerl, K., Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years, Journal of Biotechnology, 85, 2001, 149-173
- [141] N. N., Guidance for industry PAT A framework for innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, DRAFT GUIDANCE, U.S: Department of Healh and Human Service, August 2003

- [142] Stieler, S., Prozessanalytik lohnt Kostenvergleiche zwischen Labor- und Prozessanalyse, CIT plus, 6, 2004, 10
- [143] Stieler, S., Online-Analytik im Kommen, Labor Praxis, 5, 2004, 23-24
- [144] Stieler, S., Prozessanalytik lohnt sich ab einer Messung pro Tag, Chemanager, 9, 2004, 38
- [145] Gunnell, J., Process analysis an overview, Measurement and Control, 27, 1994, 111-114
- [146] Wuthe, S., Prozesse an der Leine führen CT-Trendbericht: Prozessanalytik erschließt Optimierungspotenziale, Chemie Technik, 33, 9, 2004 12-16
- [147] Stieler, S., Definition und Aufgaben der Prozessanalysenmesstechnik, Automatisierungstechnische Praxis atp, 46, 8, 2004, 68-73
- [148] Workman, J., Jr., Veltkamp, D., Doherty, S., Anderson, B. B., Creasy, K. E., Koch, M., Tatera, J. F., Robinson, A. L., Bond, L., Burgess, L. W., Bokerman, G. N., Ullman, A., Darsey, G. P., Mozayeni, F., Bamberger, J. A., Greenwood, M. S., Process Analytical Chemistry, Anal. Chem., 71, 12, 1999, 121-180
- [149] Workman, J., Creasy, K. E., Doherty, S., Bond, L., Koch, M., Ullman, A., Veltkamp, D. J., Process Analytical Chemistry, Anal. Chem., 73, 1999, 2705-2718
- [150] Workman, J. Jr., Koch, M., Veltkamp, D. J., Process Analytical Chemistry, Anal. Chem., 75, 2003, 2859-2876
- [151] Scheper, T.-H., Lammers, F., Fermentation monitoring and process control, Current Opinion in Biotechnology, 5, 1994, 187-191
- [152] Walsh, M. R., La Pack, M. A., In-line measurements using mass spectrometry, ISA Transactions, 34, 1995, 67-85
- [153] Potyrailo, R. A., Process Chemical Analysis, Encyclopedia of Materials: Science and Technology, ed. by R.Cahn and E. Lifshin, Elsevier, 2002
- [154] van de Merbel, N.C., Lingeman, H., Brinkman, U.A.Th., Sampling and analytical strategies in on-line bioprocess monitoring and control, J Chrom A, 725, 1996, 13-27
- [155] Hoch, G., Kok, B., A mass spectrometer inlet system for sampling gases dissolved in liquid phases, Arch. Biochem. Biophys., 101, 1963, 160-170
- [156] Heinzle, E., Furukawa, K., Dunn, I. J., Bourne, J. R., Experimental methods for on-line mass spectrometry in fermentation technology, Bio. Technol., 1, 1983, 181-188
- [157] Degn, H., Cox, R.P., Lloyd, D., Continuous measurements of dissolved gases in biochemical systems in fermentation technology, Meth. Anal. Chem., 57, 1985, 165-194
- [158] Lloyd, D., S. Bohátka, and J. Szilágyi Quadrupole mass spectrometry in the monitoring and control of fermentations, Biosensors, 1, 1985, 179-212
- [159] van de Merbel, N.C, Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis, J Chrom A, 856, 1999, 55-82
- [160] Jönsson, J.A., Mathiasson, L., Membrane-based techniques for sample enrichment, J Chrom A, 902, 2000, 205-225
- [161] Lennemann, F., Membrane Inlet Mass Spectrometry for Bioreactors Modelling and Application for Gases and Liquids, Fortschritts-Berichte VDI, Reihe 8, Meß-, Steuerungs- und Regelungstechnik, 802, 1999, VDI-Verlag, Düsseldorf
- [162] Ulber, R., Hitzmann, B., Scheper, T., Innovative Bioprozessanalytik Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse, Chemie Ingenieur Technik, 73, 1-2, 2001, 19-26
- [163] Edler, B., Frimmel, F. H., Kontinuierliche Probenaufarbeitung durch miniaturisierte Mikrofiltration für die Klärwerksprozessanalytik, GWF Wasser Abwasser, 142, 5, 2001, 361-366

- [164] Kataoka, H., Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction ans its application a review, Analytical & Bioanalytical Chemistry, 373, 1-2, 2002, 31-45
- [165] Dachtler, M., Glaser, T., Kohler, K., Albert, K., Combined HPLC-MS and HPLC-NMR On-Line Coupling for the Separation and Determination of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in Spinach and in Retina, Anal. Chem., 73, 3, 2001, 667-674
- [166] Pretty, J. R., Deng, H., Goeringer, D. E., Van Berkel, G. J., Electrochemically Modulated Preconcentration and Matrix Elimination for Organic Analytes Coupled On-Line with Electrospray Mass Spectrometry, Anal. Chem., 72, 9, 2000, 2066-2074
- [167] Harms, P., Kostov, Y., Rao, G., Bioprocess monitoring, Current Opinion in Biotechnology, 13, 2002, 124-127
- [168] N. N., Nivus GmbH, Eppingen, Online Prozessspektrometer im UV-VIS Bereich, http://www.nivus.de/prozessueberwachung/s\_can/spektrolyser/spektrolyser.htm
- [169] Goos, A., Ein selbstoptimierender Bioreaktor, BioTec, 3, 1993, 8-9
- [170] Rosenthal, W., Schwarz, T., Wolff, E.K., Online-HPLC-Aminosäureanalytik während kontinuielicher Fermentation, GIT Spezial Chromatographie, 2/94, 1994, 76-78
- [171] van de Merbel, N. C., Ruijter, G. J. G., Lingeman, H., Brinkman, U. A. Th., Visser, J., An automated monitoring system using on-line ultrafiltration and column liquid chromatography for Aspergillus niger fermentations, Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 1994, 658-663
- [172] Höttecke, M., Dörrscheidt, F., Krull, R., Hempel, D. C., Automatisierung von Bioreaktoren durch On-line-Hochdruckflüssigkeitschromatograpie, Automatisierungstechnische Praxis, 38, 10, 1996, 43-47
- [173] Liu, Y.-C., Wang, F.-S., Lee, W.-C., On-line monitoring and controlling system for fermentation processes, Biochemical Engineering Journal, 7, 2001, 17-25
- [174] Bouzige, M., Machtalère, G., Legeay, P., Pichon, V., Hennion, M.-C., New methodology for a selective on-line monitoring of some polar priority industrial chemicals in waste water, Waste Management, 19, 1999, 171-180
- [175] Asperger, A., Efer, J., Koal, T., Engewald, W., Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation, J Chromatogr A.; 960 (1-2), 2002, 109-119
- [176] Koal, T., Deters, M., Casetta, B., Kaever, V., Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 805(2), 2004, 215-222
- [177] Klein, J., Alder, L., Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops, J AOAC Int., 2003, 86, 5, 1015-1037
- [178] Wu, N., Dempsey, J., Yehl, P. M., Dovletoglou, A., Ellison, D., Wyvratt, J., Practical aspects of fast HPLC seprarations for pharmaceutical process development using monolithic columns, Analytica Chimica Acta, 523, 2004, 149-156
- [179] N. N., High Efficiency, High Throughput LC and LC/MS Applications Using Zorbax Rapid Resolution HT Columns, eSeparation Times Issue 17 Vol 3, pub no. 5989-0540EN, Agilent,
- [180] Kurz, J., Der Analytiker im industriellen Umweltschutz, 12, Chromatographie-Seminar in Hohenroda, GdCh Arbeitskreis Separation Science, 13.-15. Januar 2002

- [181] Wortberg, M., Ziemer, W., Müller, H., Kugel, M., Neu, J.-H., Monitoring of industrial waste water by on-line GC-MS empolying water injection, 24<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, Leipzig September 15<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> 2002, Abstract-Band
- [182] Larson, T. M., On-line HPLC for Monitoring and Control of Metabolism in Mammalian Cell Cultures, Posterpräsentation, HPLC 2001, Maastricht, The Netherlands
- [183] Scrivens, J. H., Ramage, J. C., Current developments in on-line mass spectrometry, Int. J. Mass Spec. Ion Process, 60, 1984, 299-306
- [184] Heinzle, E., Reuss, M., (Editors), Mass Spectrometry in Bioechnological Orcess Analysis and Control, Plenum Press, New York and London, 1987
- [185] Heinzle, E., Present and potential applications of mass spectrometry for bioprocess research and control, Journal of Biotechnology, 25, 1992, 81-114
- [186] Pollien, P., Lindinger, C., Yeretzian, C., Blank, I., Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry, a Tool for On-line Monitoring of Acrylamide Fromation in the Headspace of Maillard Reaction Systems and Processed Food, Anal. Chem., 75, 2003, 5488-5494
- [187] Rieder J., Prazeller, P., Boehler, M., Lirk, P., Lindinger, W., Amann, A., Online Monitoring of Air Quality at the Postanesthetic Care Unit by Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry, Anesth. Analg., 92, 2001, 389-392
- [188] Custer, T. G., Wagner, W. P., Kato, S., Bierbaum, V. M., Fall, R., Potential of On-line CIMS for Bioprocess Monitoring, Biotechnol. Prog., 19, 2003, 1355-1364
- [189] Cook, K. D., Process Mass Spectrometry: The Move Out of the Lab and Into the Plant, American Pharmaceutical Review, 7, 2, 2004, 42-53
- [190] Ferguson, P. L., Iden, C. R., McElroy, A. E., Brownawell, B. J., Determination of Steroid Estrogens in Wastewater by Immunoaffinity Extraction Coupled withj HPLC-Electrospray-MS, Anal. Chem., 73, 16, 2001, 3890-3895
- [191] Allen, T. M., Falconer, T. M., Cisper, M. E., Borgerding, A. J., Wilkerson, C. W. Jr., Real-Time Analysis of Methanol in Air and Water by Membrane Introduction Mass Spectrometry, Anal. Chem., 73, 2001, 4830-4835
- [192] Wang, J., Kingston, S., Han, Y., Saini, H., McDonald, R., Mui, R., Controlling Wafer Contamination Using Automated On-Line Metrology during Wet Chemical Cleaning, American Institute of Physics, Proceedings from the 2003 Characterisation and Metrology for ULSI Technology Conference, 2003
- [193] Edwards, E., Thomas-Oates, J., Hyphenating liquid phase separation techniques with mass spectrometry: on-line or off-line, The Analyst, 130, 2005, 13-17
- [194] Vardermann, S. B., Wendelberger, J. R., Wang, L., Calibration, Error Analysis, and Ongoing Measurment Process Monitoring für Mass Spectrometry, Technical Report 38/2003 Universität Dortmund, 2003
- [195] Cimander, C., Mandeius, C.-F., Online monitoring of a bioprocess based on a multi-analyser system and multivariate statistical process modelling, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77, 2002, 1157-1168
- [196] N. N., RÖMPP Online, 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004
- [197] Rehorek, A. Urbig, K., Meurer, R., Plum, A., Braun, G., Monitoring of Azo dye bioreactor degradation processes by on-line HPLC, J Chrom. A, 2001
- [198] Braun, G., Plum, A., Rehorek, A., Stofftransport durch NF- und UF-Membranen im MWCO-Bereich bis 10 kDa, 8. Aachener Membran Kongress, Tagungsband, 2001
- [199] Hayer, R., Trenncharakteristik der in Bio-Membran-Reaktoren eingesetzten Membranen am Beispiel von Azofarbstoffen, Diplomarbeit FH Köln, Fachbereich Anlagen- und Verfahrenstechnik, 2000

- [200] Plum, A., Rehorek, A., Emmerich, A., Braun, G., Retention characteristics of low-cut-off ultrafiltration membranes for azo dyes, 9. Aachener Membran Kongreß,18.-20. März 2003, Tagungsband P1.4, ISBN 3-86130-185-7, Aachen
- [201] Kudlich, M., Der Abbau von Azofarbstoffen durch Mikroorganismen: Mechanismus der reduktiven Spaltung und Charakterisierung von Reaktionsprodukten, Dissertation Universität Stuttgart, 1997, Shaker Verlag, Aachen
- [202] Jandera, P., Churácek, J., Bartosová, J., Reversed-Phase Liquid Chromatography of Aromatic Sulfonic and Carboxylic Acids Using Inorganic Elektrolyte Solutions as the Mobile Phase, Chromatographia 13, 1980, 485-492
- [203] Jandera P; Engelhardt H, Liquid chromatography separation of organic acidic compounds, 13, 1, 1980, 18-23
- [204] Jandera, P., Fischer, J., Stanek, V., Kucerová, M., Zvonícek, P., Separation of aromatic sulphonic acid dye intermediates by high-performance liquid chromatography and cappilary zone electrophoresis, J Chrom A, 738, 2, 1996, 201-213
- [205] Streule, U., von Wattenwyl, A., Eine HPLC-Methode zur Trennung sulfonierter und carboxylierter aromatischer Verbindungen, Chromatographia, 12, 1, 1979, 25-28
- [206] Knox, J H., Laird, G. R., Soap Chromatography A New High Performance Liquid Chromatographic Technique for Separation of Ionizable Materials, J. Chromatogr., 122, 1976, 17-34
- [207] Neue. U. D., HPLC Columns Theory, technology, and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997, S. 209-211
- [208] Socher G, R Nussbaumer, K Rissler, E Lankmayr, Analysis of sulfonated compounds by reversed phase ion pair chromatography mass spectrometry with on-line removal of non volatile tetrabutyl ammonium ion pairing agents, Chromatographia, 54, 2001, 65-70
- [209] Socher, G., Nussbaum, R., Rissler, K., Lankmayr, E., Analysis of sulfonated compounds by ion-exchange high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, J Chrom A, 912, 1, 2001. 53-60
- [210] Bauer, K. H., Knepper, T. P., Maes, A., Schatz, V., Voihsel, M., Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography electrospray mass spectrometry, J Chrom A, 837, 1999, 117-128
- [211] Forngren, B. H., Samskog, J., Gustavsson, S. Å., Tyrefors, N., Markides, K. E., Långström, B., Reversed-Phase ion-pair chromatography coupled to electrospray ionisation mass spectrometry by on-line removal of the counter-ions, J Chrom A, 854, 1999, 155-162
- [212] Conboy, J. J., Henion, J. D., Martin, M. W., Zweigenbaum, J. A., Ion Chromatography/Mass Spectrometry for the Determination of Organic Ammonium and Sulfate Compounds, Anal. Chem., 62, 1990, 800-807
- [213] Escott, R. E. A., McDowel, P. G., Porter, N. P., Use of non-volatile lonpairing agents for liquid chromatographic–mass spectrometric analyses with a moving-belt interface. J. Chromatogr. 1991; 554, 281-292
- [214] Storm, T., Reemtsma, T., Jekel, M., Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial wastewater, J Chrom A, 854, 1999, 175-185
- [215] Engelhardt, H., Grüner, R., Scherer, M., The polar selectivities of non-polar reversed phases, Chromatographia Supplement, 53, 2001, 154-161
- [216] Senholdt, M., Charakterisierung des Metrohm Suppressors 753 für den Einsatz im Online-Bioreaktor-LC-MS-System, Masterthesis, FH Köln, F09, Institut für Anlagen- und Verfahrenstechnik, 2004

- [217] Steiner, F., Lamotte, S., HPLC: Entwicklungen bei den Umkehrphasen, Nachrichten der Chemie, 2003 1199-1200
- [218] Chen, M., D. Moir; F. M. Benoit; C. Kubwabo, Purification and identification of several sulphonated azo dyes using reversed-phase preparative high-performance liquid chromatography, J Chrom. A, 825, 1998, 37-44
- [219] N. N., Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, May 2001, BP, http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm
- [220] ISO 5725 Teil 1-6, Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen- Anwendungen in der Praxis, 03/2003
- [221] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M., Strategies for assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, Anal. Chem., 75, 13, 2003, 3019-3030
- [222] Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V., Merkle, K., The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 13, 12, 1999, 1175-1185
- [223] Reemtsma, T., Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants, J Chrom A, 1000, 2003, 477-501
- [224] Stüber, M., Reemtsma, T., Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS, Anal. Bioanl. Chem., 378, 2004, 910-916
- [225] Müller, C., Schäfer, P., Stortzel, M. Vogt, S., Weinmann, W., Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport collision induced dissocoation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries, J Chrom B, 773, 1, 2002, 47-52
- [226] Gangl, E. T., Annan, M., Spooner, N., Vouros, P., Reduction of Signal Suppression Effects in ESI-MS Using a Nanosplitting Device, Anal. Chem., 73, 2001, 5635-5644
- [227] Alder, L., Lüderitz, S., Lindtner, K., Stan, H.-J., The ECHO technique the more effective way of data evaluation in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis, J Chrom A, 1058, 1-2, 2004, 67-79
- [228] Pramanik, B. N., Ganguly, A. K., Gross, M. L., Applied Electrospray Mass Spectrometry, Marcel Dekker, Inc. NY, Basel, Hong Kong, 2002, S. 155
- [229] Betzin, R., Untersuchungen zur Membranfiltration an einer Anaerobstufe zum Abbau von Farbstoffen und zur Wirksamkeit einer aeroben biologischen Nachbehandlungsstufe, Diplomarbeit, FH Köln, Fachbereich Anlagen- und Verfahrenstechnik, 1998
- [230] Freisinger, T., Untersuchungen zum anaeroben biologischen Abbau von Reaktivfarbstoffen, Diplomarbeit, FH Köln, Fachbereich Anlagen- und Verfahrenstechnik, 1998
- [231] Plum, A., Uuntersuchung der Entfärbung eines hochkonzentrierten azofarbstoffhaltigen Textilfärbereiabwassers durch den Einsatz von Bio-Membran-Reaktoren, Diplomarbeit, FH Köln, Fachbereich Anlagen- und Verfahrenstechnik, 1999
- [232] Hayer, R., Trenncharakteristik der in Bio-Membran-Reaktoren eingesetzten Membranen am Besipiel von Azofarbstoffen, Diplomarbeit, FH Köln, Fachbereich Anlagen- und Verfahrenstechnik, 2000
- [233] Pascik, I., Umweltbiotechnologie: Immobilisierung von Mikroorganismen auf adsorbierenden PUR-Trägern, WLB Wasser, Luft und Boden, 1-2, 2001, 30-34
- [234] DIN EN 12880 (S 2a) 2001-02, Charakterisierung von Schlämmen Bestimmung des Trockenückstandes und des Wassergehaltes
- [235] DIN EN 12879 (S 3a) 2001-02, Charakterisierung von Schlämmen Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse

- [236] Sutthivaiyakit, P., Achatz, S., Lintelmann, J., Aungpradit, T., Chanwirat, R., Chumanee, S., Kettrup, A., LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis, Anal. Bioanl. Chem., 381, 2005, 268-276
- [237] Pérez-Urquiza, Prat, M.D., Beltrán, J.L., Determination of sulphonated dyes in water by ioninteraction high-performance liquid chromatography, J Chrom A, 871, 2000, 227-234
- [238] Rafols, C., Barcelo, D., Determination of mono- and disulphonated azo dyes by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry, J Chrom. A, 777, 1997, 177-192
- [239] Edlund, P. O., Lee, E. D., Henion, J. D., Budde, W. L., The determination of sulfonated azo dyes in municipal wastewater by ion spray liquid chromatography tandem mass spectrometry, Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 18, 1989, 233-240
- [240] Smyth, W. F., McClean, S., O'Kane, E., Banat, I., McMullan, G., Application of electrospray mass spectrometry in the detection and determination of Remazol textile dyes, J Chrom. A, 854, 1999, 259-274
- [241] Ballard, J.M., Betowski, L. D., Thermospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry of Dyes, Organic Mass Spectrometry, 21, 1986, 575-588
- [242] Yinon, J., Jones, T. L., Betowski, L. D., High-sensitivity Thermospray Ionization Mass Spectrometry of Dyes, Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 18, 1989, 445-449
- [243] Richardson, S. D., McGuire, J. M., Thurston, A. D., Baughman, G L., Structural Characterization of Sulfonated Azo Dyes Using Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry/Tandem Mass Spectrometry, Organic Mass Spectrometry, 27, 1992, 289-299
- [244] Undheim, K., Thorstad, O., Hvistendahl, G., Mass Spectrometry of onium compounds-IV: Diazonium Salts, Organic Mass Spectrometry, 5, 1971, 73-77
- [245] Thorstad, O., Undheim, K., Hvistendahl, G., Mass Spectrometry of onium compounds XXIII lonisation potentials in the structural assignment of [M-N<sub>2</sub>]-lons from diazo-oxides, Organic Mass Spectrometry, 9, 1974, 548-550
- [246] Ballard, J.M., L. D. Betowski, Thermospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry of Dyes, Organic Mass Spectrometry, 21, 1984, 575-588
- [247] Beukelman, T. E., Chapter 9.4 Mass Spectrometry Azo Dyes, The Analytical Chemistry of Synthetic Dyes, K. Venkataraman (Ed.), Wiley-Interscience, N. Y., 1977, Seite 261
- [248] Straub, R., Voyksner, R.D., Keever, J. T., Thermospray, particel beam and electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of azo dyes, Journal of Chromatography, 627, 1992, 173-186
- [249] Sullivan, A. G., R. Garner, S. J. Gaskell, Structural Analysis of Sulfonated Monoazo Dyestuff Intermediates by Electrospray Tandem Mass Spectrometry and Matrix-assisted laser Desorption/Ionization Post-source Decay Mass Spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 12, 1998, 1207-1215
- [250] Raferty, M. J., Bowie, J. H., The collision-induced dissociations of deprotonated amides in the gas phase, Int. J Mass Spectrom. Ion Proc., 85, 2, 1988, 167-186
- [251] Bowie, J. H., The fragmentations of even-electron organic negative ions, Mass Spectrometry Reviews, 9, 1990, 349-379
- [252] Larsen, B. R., Ion-Trap multiple mass spectrometry in pesticide analysis, Analusis, 28, 10, 2000, 941-946
- [253] Bruins A.P., Covey T.R. and Henion J.D., Ionspray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, Anal. Chem., 59, 1987, 2642-2646

- [254] Monaghan J.J., Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A. N., Fast atom bombardment mass spectra of involatile sulphonated and phosphonated azo dyestuffs, Int. J. Mass Spectro and Ion Physics, 46, 1983, 447-450
- [255] Borgerding, A. J., Hites, R. A., Effect of Tautomerization on the Fast-Atom-Bombardement Tandem Mass Spectra od Azo Dyes, J Am Soc Mass Spectrom, 407-415, 5, 1994, 407-415
- [256] Bootz, K., mündliche Mitteilung, 11. 11. 2004, DyStar GmbH, Leverkusen
- [257] Stüber, M., Vorkommen und Verhalten von Naphthalinsulfonaten in der biologischen Abwasserbehandlung Untersuchung mittels Kopplung von Hochleistungsflüssig-chromatographie und Massenspektrometrie, Dissertation TU-Berlin, 2005
- [258] N. N., Vorlesungsskript Organische Chemie II, Universität Konstanz, http://www.chemie.uni-konstanz.de/www/german/arb/OC\_II.pdf
- [259] Chromá-Keull, H., Haviš, J., Havel, J., Reactiv dye Ostazine Black V-B: determination in the dye-beth and hydrolysis monitoring by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 14, 2000, 40-43
- [260] Kudlich, M., Hetheridge, M.J., Knackmuss, H.-J., Stolz, A.,, Autooxidation Reactions of Different Aromatic o-Aminohydroxynaphthalenes That Are Formed during the Anaerobic Reduction of Sulfonated Azo Dyes, Environ. Sci. Technol., 33, 6, 1999, 896-901
- [261] Stolz, A., schriftliche Mitteilung, 12. 04. 2002
- [262] Reemtsma, T., The Use of LC-MS to Determine Concerted Biotic and Abiotic Transformation Processes, Vortrag, Analytica Konferenz Kolloquium, 2004, München
- [263] Walker, A., The metabolism of azo compounds: A review of the literature, Food Cosmet. Toxicol., 8, 1970, 659-676
- [264] Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M.-L., Strehaiano, P., Microbial decolourization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system, Chemical Engineering Journal, 99, 2004, 169-176
- [265] Chen, B. Y., Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by Pseudomonas luteola: toxicity and kinetics, Process Biochemistry, 38, 3, 2002, 437-446
- [266] Panswad, T., Luangdilok, W., Decolorization of Reactive Dyes with different molecular structure under different environmental conditions, Wat. Res., 34, 17, 2000, 4177-4184
- [267] Strauss, H. S., Is bioremedation green technology?, J. Soil Contam., 6, 1997, 219-225
- [268] Storm, T., Aromatische Sulfonate Untersuchung zum Stoffverhalten in Industrieabwasser und aquatischer Umwelt mit HPLC-MS, Disseration 2002, Technische Universität Berlin
- [269] O'Neill, C., Hawkes, D. W., Lourenco, N. D., Pinheiro, H. M., Delée, W., Colour in textile effluents sources, measurement, discharge consents ans simulation: a review, J. Chem. Technol. Biotechnol., 74, 11, 1999, 1009-1018
- [270] Glässer, A., Entwicklung eines zweistufigen Verfahrens zum Totalabbau von Azofarbstoffen, Universität Paderborn, PhD Thesis, 1992
- [271] Cariell, C. M., Barclay, S. J., Naidoo, N., Buckley, C. A., Mulholland, D. A., Senior, E., Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions, Water SA, 21, 1995, 61-69
- [272] Braun, G., Kohlheb, R., Neue Entwicklung bei Spacern für Wickelelementen, Posterbeitrag, 9. Aachener Membrankolloguium, 03/2003
- [273] Clewe, B. van, Abwasserreinigung mit Kreislaufführung in der Textilveredelung durch Membrantechnik, Preprints Colloquium Produktintegrierter Umweltschutz, Bremen, B3-B12, 1997
- [274] Braun, G., Janitza, J., Desal, M. K. O., Abwasserreinigung und -recycling in der Textilindustrie, Preprints Colloquium Produktintegrierter Umweltschutz, Bremen, B13-B30, 1997

- [275] Oles, V., Hellmann, W., Lazar, D., Abwasseraufbereitungskosten in der Textilveredelungsindustrie, Melliand Textilberichte, 1995, 720-723
- [276] Krull, R., Döpkens, E., Metzen, P., Hempel, D. C., Wasserkreislaufschließung in der Textilveredelung durch anaerobe-aerobe Abwasserbehandlung, 23. Osnabrücker Umweltgespräch - Prozessnahe Massnahmen zum Integrierten Umweltschutz in der Textilverarbeitung, 2003
- [277] Linke, M., Sarsour, J., Janhitza, J., Planck, H., Anaerob gestützte Verfahren, 23. Osnabrücker Umweltgespräch Prozessnahe Massnahmen zum Integrierten Umweltschutz in der Textilverarbeitung, 2003
- [278] Marzinkowski, J. M., Produktionsintegrierte Maßnahmen: Beispiele zur Umsetzung in der Praxis, Stuttgarter Kolloquium Industrieabwasser und Textilveredelung, 2004, 37-40
- [279] Marte, W., Erfahrungen mit der Oxidation von Restflotten und Flottenkonzentraten, Stuttgarter Kolloquium Industrieabwasser und Textilveredelung, 2004, 24-36

# 11 Anhang

## Monitoring-Methode MF-IP-HPLC-DAD-IC-ESI-MS/MS

Methodeneinstellparameter für weitere Reactive Black 5 "Verbindungen" der Monitoring-Methode im MRM-Modus

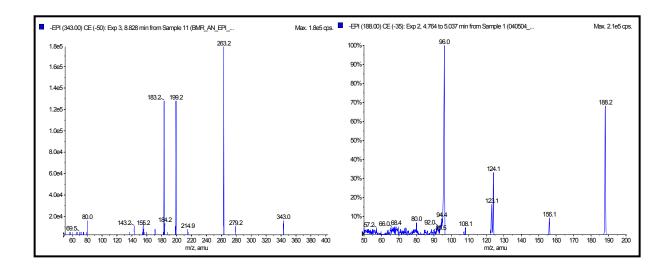
Verbindung	Q1 Mass (amu) [amu]	Q3 Mass (amu) [amu]	DP (V [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
ABSEESA	308	125	-46	-7	-18	-34	-2
ABSESA	264	81	-50	-10	-15	-52	-10
Di-RB5-H Ether	733	236	-50	-10	-26	-52	-10
DPBA	384	275	-50	-10	-18	-52	-10
NDSA	287	143	-80	-10	-15	-50	-4
NSA	207	143	-80	-10	-13	-50	-4
PBSA	280	171	-50	-10	-15	-52	-10
RB5-H -PB	545	264	-50	-10	-22	-52	-10
RB5-H -PB-2H	543	463	-50	-10	-22	-52	-10
RB5-H+DPBE	925	861	-50	-10	-31	-52	-10
RB5-H+SO2	806	236	-50	-10	-28	-52	-10
TAHNDSDP3	348	188	-61	-9	-17	-44	-4
TAHNDSDP4	349	189	-61	-9	-17	-44	-4
UNK188	188	96	-50	-10	-13	-52	-10
UNK358	358	278	-50	-10	-17	-52	-10
UNK371	371	183	-50	-10	-17	-52	-10
UNK373	373	293	-50	-10	-17	-52	-10
UNK584	584	424	-50	-10	-23	-52	-10
UNK661	661	501	-50	-10	-25	-52	-10

Methodeneinstellparameter für weitere Reactive Black 5 "Verbindungen" der Monitoring-Methode im MRM-Modus

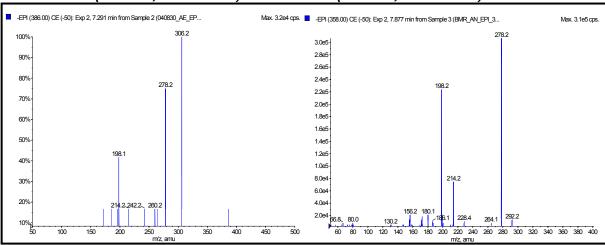
Substanz	DAD	Q1/Q3	Q1 (EMS)		Chromatografische Methode		
		(MRM-Monitoring)		TBAAc	NH₄Ac		
RO16-O	-	572/492	-	+	+		
RO16-H	-	492/278	-	+	+		
RO16-V	-	474/278	-	+	+		
RO16-NA	-	-	450	+	+		
NSA	-	207/143	207	+	+		
NDSA-a	-	287/143	-	+	+		
NDSA-b	-	287/143	-	+	+		
NANSA	-	264/79	-	+	+		
NAHNSA	-	280/237	-	+	+		
SNFC-2	-	213/80	213	+	+		
SNFC-3	-	215/80	215	+	+		
SNFC-4	-	216/80	216	+	+		
SNFC-5	-	217/80	217	+	+		
p-Base	+	-	-	+	-		
s-acid	-	172/80	-	+	-		
NA-DAHNSA <sub>DP2</sub>	-	294/159	294	+	+		
NA-DAHNSA <sub>DP3</sub>	-	295/159	295	-	+		
NA-DAHNSA <sub>DP4</sub>	-	296/159	296	+	+		
NA-DAHNSA <sub>DP5</sub>	-	309/158	309	+	+		
RO16-Derivat	-	492/278	492	+	+		
DAHNSA <sub>DP2</sub>	-	-	252	+	+		
DAHNSA <sub>DP3</sub>	-	-	253	-	+		
DAHNSA <sub>DP4</sub>	-	-	254	-	+		
DAHNSA <sub>DP5</sub>	-	267/187	267	+	+		
UNK 242	-	-	242	+	-		
UNK 225	-	-	225	+	-		
UNK 478	-	-	478	+	-		
UNK 688	-	-	688	+	-		
UNK 871	-	-	871	+	-		
UNK 565	-	-	565	-	-		
UNK 156	-	-	-	-	-		
UNK 214	-	-	_	-	-		
UNK 606	-	-	606	+	+		
UNK 662	-	-	662	+	+		

### Produktionenspektren unbekannter Verbindungen

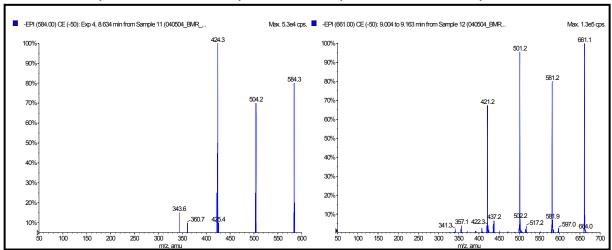
### I. UNK343 (m/z 343, CE = -50 V) und UNK188 (m/z 188, CE = -35 V)



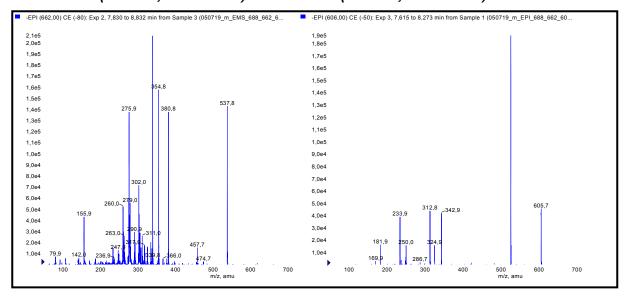
### II. UNK386 (m/z 386, CE = -50 V) und UNK358 (m/z 358, CE = -50 V)



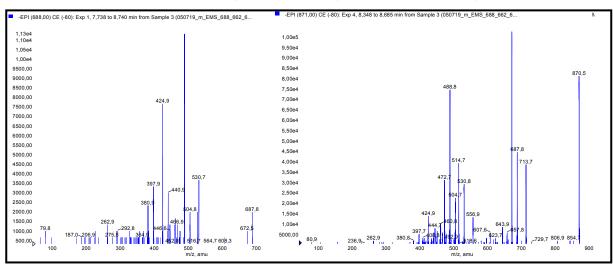
#### III. UNK584 (m/z 584, CE = -50 V) and UNK661 (m/z 661, CE = -50 V)



### IV.UNK662 (m/z 662, CE = -80 V) and UNK608 (m/z 608, CE = -50 V)



### V.UNK688 (m/z 688, CE = -80 V) and UNK871 (m/z 871, CE = -80 V)



### VI.UNK478 (m/z 478, CE = -50 V) and UNK565 (m/z 565, CE = -40 V)

