

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Validierung

4.1.1 Validierung des Festphasen-Extraktionsverfahrens

Die Festphasen-Extraktion stellt das Kernstück der in dieser Arbeit angewandten Analytik dar. Die ermittelten Daten können nur dann aussagekräftig sein, wenn die Festphasen-Extraktion den Anforderungen hinsichtlich Präzision und Richtigkeit genügt.

4.1.1.1 Theoretische Grundlagen zur Validierung

4.1.1.1.1 Präzision und Zufälliger Fehler

Werden die Analyten durch das Sorbens entweder unvollständig gebunden oder nicht wieder vollständig desorbiert und ist der Anteil der Analyten der adsorbiert bzw. desorbiert wird von den Bedingungen speziell an jeder einzelnen Kartusche abhängig, so kommt es zu einer Streuung der Messwerte, die Präzision der Messergebnisse wird vermindert.

Ermittelt man durch lineare Regression eine Gleichung, die den Zusammenhang zwischen theoretischem Wert x und Messwert y beschreibt

$$y = mx + a$$

so äußert sich der zufällige Fehler durch Abweichung der gemessenen Werte von den durch die Regressionsgleichung ermittelten Werte, in der graphischen Darstellung liegen die Messpunkte nicht genau auf der Regressionsgerade. Diese Abweichungen werden Residuen genannt. Der Mittelwert aller Residuen ist stets 0. Die Standardabweichung der Residuen ist ein Maß für den zufälligen Fehler.

4.1.1.1.2 Richtigkeit und systematischer, multiplikativer Fehler, Wiederfindungsrate

Wird, bedingt durch Matrixeinflüsse, nur ein bestimmter, wenn auch konstanter Anteil des Analyten an die Festphase gebunden, zieht das einen systematischen Fehler nach sich: die Messwerte unterliegen dabei keiner Streuung, weichen aber von der tatsächlich vorhandenen Menge des Amins um einen bestimmten Faktor ab, der in der Regel kleiner 1 ist. Dieser Faktor wird häufig als Prozentangabe ausgedrückt und als Wiederfindung bezeichnet.

In der linearen Regressionsgleichung (vgl. Ziffer 4.1.1.1.1) erscheint die Wiederfindung als Koeffizient m , z.B. entspricht $m = 0,8$ einer Wiederfindung von 80%. In der graphischen Darstellung entspricht die Wiederfindung dem Anstieg der Regressionsgerade. Im Idealfall beträgt $m = 1$ bzw. ist die Wiederfindung 100%.

4.1.1.1.3 Richtigkeit und systematischer, additiver Fehler, Blindwerte

Neben den Analyten werden durch die Festphasen-Extraktion noch weitere Substanzen angereichert, so lange diese ausreichend lipophil sind, um an die Umkehrphase des Sorbens gebunden zu werden. Weist eine solche Substanz eine Retentionszeit auf, die der eines Analyten sehr ähnlich ist und absorbiert sie ebenfalls UV-Licht der zur Quantifizierung verwendeten Wellenlänge (vgl. Ziffer 3.8, Tab. 5), so sind die Messwerte, unabhängig von der Anwesenheit (bzw. Menge) des Analyten jeweils um einen Blindwert a erhöht.

Blindwerte sind in der graphischen Darstellung als Ordinatenabschnitt bzw. bei Durchführung einer linearen Regression als Konstante a der $y = mx + a$ erkennbar. Im Idealfall sollte $a = 0$ sein und die Regressionsgerade durch den Nullpunkt verlaufen.

Durch lineare Regression ermittelte Blindwerte lassen sich dahingehend überprüfen, ob sie sich signifikant von 0 unterscheiden. Dazu wird als Nullhypothese angenommen, der Blindwert sei nicht von 0 verschieden:

$$H(0): a = 0$$

Die Nullhypothese wird mit der Testgröße t geprüft, da σ , also die Standardabweichung der Grundgesamtheit nicht bekannt ist, wird sie mit Hilfe von s_y , der Standardabweichung der Residuen, geschätzt²⁵:

$$t = \frac{a}{s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(n-1)(\text{Varianz}_x)}}$$

a	Ordinatenabschnitt bzw. Blindwert
s_y	Standardabweichung der Residuen
n	Stichprobenumfang

\bar{x}	Mittelwert der x-Werte (d.h. der eingesetzten Mengen an Amin)
Varianz _x	Varianz der x-Werte (d.h. der eingesetzten Mengen an Amin)

Die neue Testgröße t gehorcht der Student'schen t -Verteilung, hier mit $n-2$ Freiheitsgraden. Mit ihrer Hilfe wird der Wahrscheinlichkeitswert p ermittelt. Liegt p unterhalb von 0,05, haben also die gemessenen Daten unter der Nullhypothese eine Wahrscheinlichkeit von weniger als 5%, so muss davon ausgegangen werden, dass die Null-Hypothese falsch und der Blindwert signifikant von 0 verschieden ist.

4.1.1.2 Experimentelle Vorgehensweise bei der Validierung

Wie unter Ziffer 3.3 beschrieben wurde eine Reihe von Assays bereitet, jedoch ohne dabei Amine oder Farbstoffe hinzuzufügen. Die Assays wurden für 24 h inkubiert und aufgearbeitet, so wie unter Ziffer 3.4 bis 3.6 beschrieben.

Die so erhaltene Probenlösung stellt eine Matrix dar, wie sie auch bei der Inkubation und Aufarbeitung von Realproben auftritt. Die in der Matrix enthaltenen biogenen Substanzen können für Streuungen, erniedrigte Wiederfindungen oder Blindwerte verantwortlich sein.

Die Probenlösungen wurden mit 1 bis 9 ml einer Lösung dotiert, die jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ jedes Amins (Ausnahme 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 4-Aminoazobenzen) enthielt. Die dotierten Probenlösungen enthielten also 1 bis 9 μg jedes Amins (Sonderfall: 0,5 bis 4,5 μg 4-Aminoazobenzen). Eine Probe wurde nicht dotiert und enthielt nur die matrixbedingten Substanzen. Außerdem wurde eine Kalibrier-Probe gemäß Ziffer 3.7 hergestellt.

Die Proben wurden nach dem unter Ziffer 3.7 beschriebenen Festphasen-Extraktionsverfahren aufgearbeitet und die Eluate mittels HPLC untersucht.

Da die ersten Versuche zur Kalibrierung mit *Micrococcus luteus* durchgeführt wurden, unterschied sich das genaue Vorgehen noch von allen darauf folgenden Versuchen. Es wurden nur 4 Proben mit Amin-Mengen von jeweils 0,5 μg , 2 μg , 5 μg und 15 μg untersucht.

Die jeweils ermittelte Menge jedes Amins wurde der eingesetzten Menge gegenübergestellt. Durch lineare Regression wurde die Gleichung $y = mx + a$ ermittelt, die den Zusammenhang zwischen eingesetzten und wiedergefundenen Mengen an Amin beschreibt. Es wurde geprüft, ob sich der Ordinaten-Abschnitt n signifikant von 0 unterscheidet. Außerdem wurden die

Messergebnisse graphisch ausgewertet. Zwei typische Diagramme sind im Folgenden dargestellt:

4.1.1.3 Auswertung der Validierungsdaten und Ergebnisse

In Tabelle 6 sind die eingesetzten und wiedergefundenen Mengen von o-Tolidin aus aufgearbeiteten Standard-Ansätzen von *Micrococcus roseus* dargestellt.

Tab. 6 Eingesetzte und wiedergefundene Mengen von o-Tolidin
Leerproben aufgearbeitet aus Standard-Ansätzen von *Micrococcus roseus*

Masse	Eingesetzt	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
o-Tolidin [µg]	Wiedergefunden	0,93	2,86	4,77	6,47	8,29

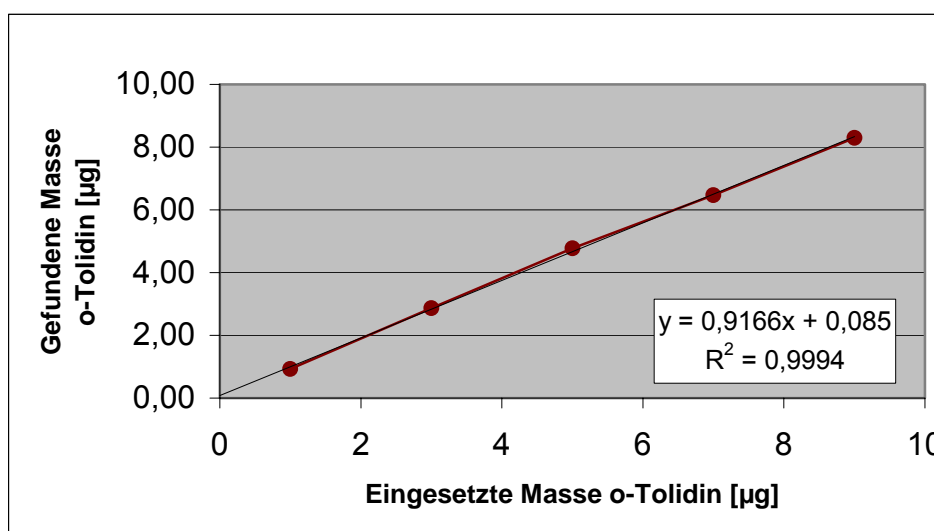


Abb. 4 Eingesetzte und wiedergefundene Mengen von o-Tolidin:
Leerproben aufgearbeitet aus Standard-Ansätzen von *Micrococcus roseus*

Tab. 6 und Abb. 4 sind typisch für die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Amine. Ein etwaiger Blindwert ist vernachlässigbar klein (siehe auch Signifikanzprüfungen in den folgenden Tabellen). Die Wiederfindung liegt bei 91,7% und das Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9994 entspricht einer fast idealen linearen Korrelation zwischen der eingesetzten und der wiedergefundenen Menge an o-Tolidin.

Tab. 7 Eingesetzte und wiedergefundene Mengen von 4-Aminoazobenzen
Leerproben aufgearbeitet aus Standard-Ansätzen von *Micrococcus roseus*

Masse	Eingesetzt	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5
4-Aminoazobenzen [µg]	Wiedergefunden	1,530	2,139	3,191	4,097	4,850

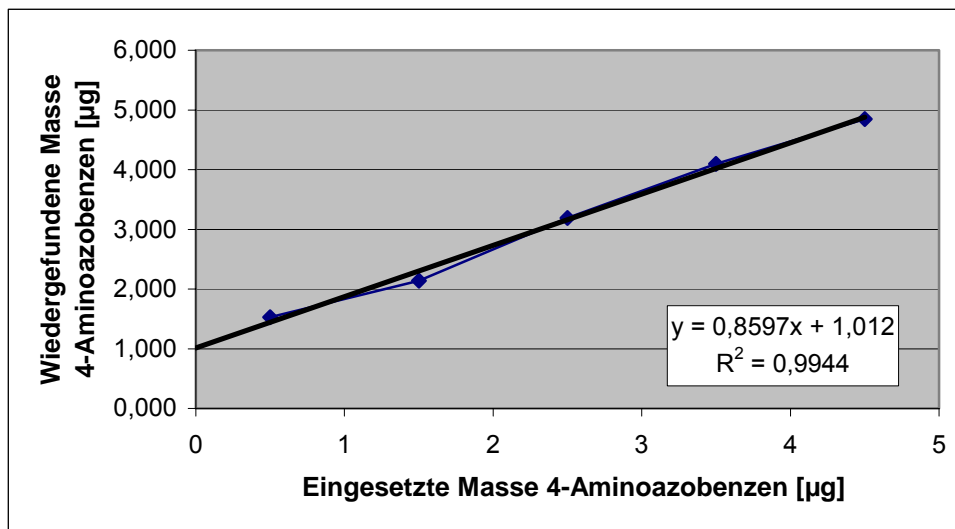


Abb. 5 **Eingesetzte und wiedergefundene Mengen von 4-Aminoazobenzen:
Leerproben aufgearbeitet aus Standard-Ansätzen von *Micrococcus roseus***

Im Fall des 4-Aminoazobenzen (dargestellt in Tab. 7 und Abb. 5) liegt eine mit 85,9% ebenfalls sehr gute Wiederfindungsrate vor, auch die lineare Korrelation ist deutlich ausgeprägt, erkennbar an einem Bestimmtheitsmaß von 0,9944. Auffällig ist jedoch der mit 1 µg vergleichsweise große Blindwert. Aus 2 Gründen ist jedoch anzunehmen, dass der Blindwert nur im Rahmen einer relativ geringen Standardabweichung schwankt: zum einen wurden die 5 Assays aus einer gemeinsamen Population von Bakterien gewonnen, weisen die gleiche Keimzahl auf und wurden nach einem einheitlichen Verfahren behandelt. Ein stark schwankender Blindwert würde sich außerdem in deutlichen Abweichungen der Punkte von der Regressionsgerade und in einer nur schwach ausgeprägten linearen Korrelation (und damit einem erniedrigten Bestimmtheitsmaß) äußern.

Um den Blindwert zu eliminieren, können gemeinsam mit den Realproben Proben zur Erstellung einer Regressionsgerade (wie unter Ziffer 4.1.1.2 beschrieben) gewonnen werden. Angesichts der aufwendigen Anzucht und Aufarbeitung und der nur begrenzt verfügbaren Zell-Suspension wurde ein solches Verfahren nicht in die Praxis umgesetzt. Bei einer zu erwartenden geringen Freisetzung von 4-Aminoazobenzen wurde zusätzlich eine Leerprobe zur Ermittlung und Korrektur des Blindwertes aufgearbeitet. In zahlreichen Fällen jedoch war die freigesetzte Mengen an 4-Aminoazobenzen (vgl. z.B. Ziffer 4.2.3.2 und 4.4.3) so hoch, dass ein Blindwert von 1 µg als vernachlässigbar klein angesehen wurde.

Messbare Blindwerte traten weiterhin bei der Bestimmung von o-Anisidin und o-Toluidin auf. In diesem Fall konnte die für den Blindwert verantwortliche Störsubstanz jedoch durch das unter Ziffer 3.7.2 beschriebene Reinigungsverfahren eliminiert werden.

Als Streuungsparameter wurde die relative Verfahrensstandardabweichung v_{x0} berechnet. Die Verfahrensstandardabweichung ist die Standardabweichung der Residuen im Verhältnis zum Anstieg der Regressionsgerade. Die relative Verfahrensstandardabweichung ergibt sich aus dem Verhältnis der Verfahrensstandardabweichung zum Mittelwert der theoretischen Werte (x-Werte.)²⁶

$$s_{x0} = \frac{s_y}{m} \qquad v_{x0} = \frac{s_{x0}}{x} \cdot 100\% \qquad v_{x0} = \frac{s_y}{x \cdot m} \cdot 100\%$$

Die folgenden Tabellen 8 und 9 fassen die ermittelten Streuungsparameter, Wiederfindungs-Raten und Blindwerte für alle Untersuchungen zur Validierung zusammen.

Tab. 8 Validierungsdaten für Aufarbeitungen aus Assays von *Micrococcus luteus*, Sorbens DSC-18, 500 mg, 4 Punkt-Kalibrierung über 0,5 bis 15 µg Amin¹

Amin	Wiederfindung [%]	Blindwert [µg]	Bestimmtheits-Maß R ²	v _{x0} ^{**} [%]	p ^{***}
2,4-Diaminotoluol	58,3	0,71	0,9874	19,3	0,45128
o-Anisidin	92,5	1,01	0,9990	5,4	0,16568
o-Toluidin	84,0	1,60	0,9982	7,3	0,12950
2,4-Xylidin	96,5	0,19	0,9994	3,4	0,26153
4,4'-Thioanilin	97,4	0,04	0,9999	1,6	0,60431
4-Aminoazobenzen	97,6	0,72	1,0000	0,2	0,00323
Benzidin	88,0	0,10	0,9997	2,5	0,40740
o-Tolidin	94,6	0,01	1,0000	0,3	0,35266
o-Dianisidin	92,3	0,07	0,9999	1,7	0,39617

* Im Fall von 2,4-Diaminotoluol , o-Anisidin und o-Toluidin wurde für 0,5 µg Amin kein auswertbarer Peak mehr beobachtet, hier wurde eine 3-Punkt-Kalibrierung mit den Werten für 2, 5 und 15 µg Amin durchgeführt.

** v_{x0} – relative Verfahrensstandardabweichung

*** p – Wahrscheinlichkeitswert, ermittelt wie unter Ziffer 4.1.1.1.3 beschrieben. Bei p<0,05 muss angenommen werden, dass sich n signifikant von 0 unterscheidet. Entsprechende Werte sind fett hervorgehoben.

Tab. 9 Validierungsdaten für Aufarbeitungen aus Assays von *Micrococcus luteus*, Sorbens Oasis MCX, 15 mg, 4-Punkt Kalibrierung* über 0,5 bis 15 µg Amin

Amin	Wiederfindung [%]	Blindwert [µg]	Bestimmtheits-Maß R^2	V_{x0} [%]	p
2,4-Diaminotoluol ^{1*}	26,3	4,73	0,6625	101,4	0,04656
o-Anisidin ^{2*}	59,6	0,34	0,9802	8,2	0,16305
o-Toluidin ^{2*}	75,6	0,09	0,9949	4,1	0,26721
2,4-Xylidin	96,5	-0,08	0,9999	1,5	0,30198
4,4'-Thioanilin	97,4	-0,14	0,9999	1,5	0,13075
4-Aminoazobenzen	99,0	0,85	0,9999	0,5	0,00055
Benzidin	88,0	0,05	0,9997	2,3	0,59665
o-Tolidin	94,6	0,00	1,0000	0,6	0,45312
o-Dianisidin	92,3	0,00	1,0000	0,7	0,99208

^{1*} Die Werte für 2,4-Diaminotoluol sind nur zur Veranschaulichung angegeben. Die niedrige Wiederfindung und die extrem hohe relative Verfahrensstandardabweichung lassen erkennen, dass das hier verwendete Sorbens zur Bestimmung dieses Analyten vollkommen ungeeignet ist.

^{2*} Im Fall des o-Anisidin und des o-Toluidin blieben die Werte der Proben mit jeweils 15 µg Amin außer Betracht, da die Wiederfindungsrate drastisch eingebrochen war. Mögliche Erklärungen und Konsequenzen unter Ziffer 4.1.1.4.

Die Validierungsdaten, die bei der Aufarbeitung von Assays der übrigen Mikroorganismen erhoben wurden, sind in Anhang B wiedergegeben.

4.1.1.4 Bewertung der Validierungsdaten, Eignung der Methode

Die vorliegenden Validierungsdaten belegen, dass das angewandte Verfahren der Festphasen-Extraktion hohen Ansprüchen hinsichtlich der Präzision und Richtigkeit genügt.

Es besteht grundsätzlich eine ausgeprägte lineare Korrelation zwischen den in der Lösung vorhandenen und im Extrakt wiedergefundenen Mengen an Amin. Zufällige Abweichungen (Streuungen) davon liegen in einem Rahmen, wie er bei manuellen Arbeiten mit Laborglasgeräten zu erwarten ist. Zum Vergleich: DIN 53314 fordert bei der photometrischen Bestimmung von Chrom(VI) in Leder für die aufzustellende Kalibriergerade, die nicht durch Matrixeinflüsse oder Extraktionsschritte beeinflusst wird, einen Korrelationskoeffizienten R von 0,99, dies entspricht einem R^2 von 0,9801.

Nimmt man diesen Wert als Mindestanforderung an die lineare Korrelation bei einer quantitativen analytischen Bestimmung, so wurde die Forderung bei den durchgeführten Festphasen-Extraktionen mit nur wenigen Ausnahmen (Bestimmung von 4-Amino-Azobenzen aus Assays von *Staphylococcus aureus* und *St. epidermidis*) erfüllt.

Typische Wiederfindungsraten liegen zwischen 85 und 95% und entsprechen damit den Erwartungen an eine optimierte Festphasen-Extraktion. Ausnahme ist das relativ polare 2,4-Diaminotoluol, dessen Wiederfindungsraten im Bereich von 60 bis 70% liegen.

Die relativen Verfahrensstandardabweichungen liegen in der Mehrzahl der Fälle unterhalb von 5% und mit nur 2 Ausnahmen unterhalb von 10%. Mehr als 10% relative Verfahrensstandardabweichung treten in 2 Fällen beim polaren Analyten 2,4-Diaminotoluol auf.

Die durch Regression ermittelten Blindwerte (Ordinaten-Abschnitte) a unterscheiden sich in den allermeisten Fällen nicht signifikant von 0. Ausnahmen treten auf bei den Aminen *o*-Anisidin, *o*-Toluidin und 4-Aminoazobenzen. Ursache für den Blindwert können biogene Substanzen der Matrix sein, die eine nahezu gleiche Retentionszeit und bei der zur Quantifizierung dienenden Wellenlänge von 240 nm ebenfalls eine UV-Absorption aufweisen. Bei den beiden erstgenannten Aminen ist es jedoch möglich, den Anteil dieser Störsubstanzen deutlich abzusenken, so dass der Blindwert nicht länger signifikant von 0 verschieden ist: das unter Ziffer 3.7.2 beschriebene Verfahren der sauren Aufreinigung eliminiert die Störsubstanzen nahezu vollständig. Problematischer sind die matrix-bedingten Störungen im Fall des 4-Aminoazobenzen, da sich die Störsubstanz auch durch variierte Vorgehensweise bei der Festphasen-Extraktion nicht eliminieren ließ. Vergleicht man jedoch die Blindwerte, sofern sie sich signifikant von 0 unterscheiden, mit den aus Crocein Scharlach freigesetzten Mengen an 4-Aminobenzen (z.B. Ziffer 4.5.3, Tab. 24), so ist ein Blindwert von 1 bis 2 μg Amin nahezu bedeutungslos.

Insgesamt stellt das angewandte Verfahren eine geeignete Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung primärer aromatischer Amine dar im Bereich von $>1 \mu\text{g}$ Amin/Assay dar.

Die Festphasen-Extraktion an Säulen mit dem polymeren Sorbens Oasis MCX hat den Vorteil, dass eine kleinere Menge an Elutionsmittel (0,5 ml statt 2,0 ml) benötigt wird, was zu stärker konzentrierten Proben und im Bereich $< 1 \mu\text{g}$ Amin/Assay zu besser quantifizierbaren Peaks führt. Die verwendeten Säulen sind jedoch wegen ihrer geringen Sorbens-Masse weniger robust gegen Störeinflüsse, außerdem bricht bei Vorliegen größerer Mengen an

mäßig polaren Aminen (z.B. o-Toluidin, o-Anisidin) deren Wiederfindungsrate ein. Für 2,4-Diaminotoluol ist das Sorbens nicht verwendbar, da dieser Analyt nur zu einem geringen und zudem schwankenden Anteil zurückgehalten wird, so dass die Aufnahme einer Kalibriergerade praktisch unmöglich wird. Oasis MCX Kartuschen wurden nur in einigen Fällen zum Nachweis kleiner Mengen an Aminen, z.B. nach aerober Inkubation eingesetzt.

Der überwiegende Anteil der Messwerte, speziell bei den Versuchen zu quantitativen, parametrischen und kinetischen Aspekten der Azospaltung wurde durch Festphasen-Extraktion an DSC-18 500 mg Kartuschen gewonnen.

4.1.2 Prüfung der Farbstoffe auf Reinheit

Anders als die Amine waren die in dieser Arbeit untersuchten Azofarbstoffe in der Regel nicht als analysenreine Standards erhältlich. Es war also erforderlich, die Farbstoffe auf Reinheit zu überprüfen. Dabei müssen folgende Arten von Verunreinigungen betrachtet werden:

4.1.2.1 Prüfung der Farbstoffe auf Verunreinigungen mit dem entsprechenden Amin

4.1.2.1.1 Theoretische Überlegungen

Der Farbstoff könnte mit Spuren des Amins verunreinigt sein, aus dem er ursprünglich synthetisiert wurde und das durch reduktive Spaltung erneut aus dem Farbstoff gebildet werden kann. Solche Verunreinigungen wären sehr problematisch, da sie evtl. eine azospaltende Aktivität der Bakterien vortäuschen könnten. Sie mussten daher sicher ausgeschlossen werden bzw. ein positiver Nachweis würde zusätzliche Arbeitsschritte zur Reinigung des Farbstoffs erforderlich machen.

4.1.2.1.2 Durchführung

Jeweils 5 mg Farbstoff wurden in einer Mischung aus 20 ml Simulanz und 20 ml 0,1 M HCl gelöst bzw. im Fall unlöslicher Farbstoffe mit Hilfe eines Ultraschallbads dispergiert. Die Lösung wurde über ein Polycarbonatfilter gegeben und gemäß Ziffer 3.7 durch Festphasen-Extraktion (Standard-Verfahren) aufgearbeitet und das Eluat gemäß Ziffer 3.8 am HPLC untersucht.

4.1.2.1.3 Ergebnisse

Im Fall der meisten Farbstoffe war in den Chromatogrammen kein Peak mit einer Retentionszeit entsprechend des jeweiligenamins erkennbar. Das Amin gilt damit als nicht nachgewiesen (Konzentration < 0,1 µg Amin in 5 mg Farbstoff).

Einzige Ausnahme bildete der Farbstoff Sudan III (C.I.26.100, CAS 85-86-9). Hier war ein Peak entsprechend 2 µg Amin in 5 mg Farbstoff erkennbar.

4.1.2.1.4 Bewertung

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können Störungen der Experimente, insbesondere falsch positive Ergebnisse, die durch eine Verunreinigung des Farbstoffs mit dem entsprechenden Amin bedingt sein könnten, weitgehend ausgeschlossen werden. Die Farbstoffe wurden daher ohne vorherige Reinigungsschritte für die mikrobiellen Inkubationen eingesetzt.

Um den Farbstoff Sudan III dahingehend zu bewerten, ob die bisweilen bei der Inkubation nachgewiesenen Spuren an 4-Aminoazobenzen aus einer mikrobiellen Freisetzung stammen oder durch Verunreinigungen des Farbstoffs begründet sind, hätte eine Aufreinigung des Farbstoffs, z.B. durch Dispergieren des unlöslichen Farbstoffs in Salzsäure, Zentrifugation und anschließende Trocknung, durchgeführt werden müssen. Ein solcher Verfahrensschritt wäre jedoch nur dann sinnvoll gewesen, wenn gleichzeitig die Möglichkeit bestanden hätte, Spuren des 4-Aminoazobenzen unabhängig von einer Störung durch eine biogene Matrix-Substanz zu detektieren. Da die bisher ermittelten Daten jedoch darauf hindeuten, dass eine mikrobielle Spaltung von Sudan III nur von untergeordneter Bedeutung ist, wurde innerhalb dieser Arbeit auf entsprechende Untersuchungen verzichtet.

4.1.2.2 Prüfung der Farbstoffe auf verwandte Substanzen

4.1.2.2.1 Theoretische Überlegungen

Neben dem definierten Farbstoff können Verbindungen mit ähnlicher Struktur (z.B. als Nebenprodukte bei der Synthese entstanden) vorliegen. Die anderen Verbindungen könnten:

- Bevorzugt durch die Azoreduktasen abgebaut werden,
- zusätzliche Spaltprodukte freisetzen,

- im ungünstigsten Fall die Azospaltung stören, z.B. durch kompetitive Hemmung der Enzyme.

Eine Reinigung des evtl. vorliegenden Farbstoff-Gemischs ist theoretisch durch präparative HPLC möglich, jedoch mit einem enormen Aufwand (z.B. an Lösungsmitteln) verbunden und wurde innerhalb dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen. Weiterhin ist zu bedenken, dass auch bei einer evtl. Umsetzung auf der Haut in der Praxis fast immer ein Farbstoff-Gemisch vorliegen wird: zum einen ist nicht zu erwarten, dass zum Färben von Leder und Textilien bzw. zur Verwendung in Kosmetika Farbstoffe von höherer Reinheit verwendet werden als diese für die Verwendung im Labormaßstab verfügbar sind, zum anderen werden für praktische Anwendungen häufig ganz gezielt Gemische von Farbstoffen eingesetzt.

Dessen ungeachtet ist es wünschenswert, wenn innerhalb dieser Arbeit zumindest einige der eingesetzten Farbstoffe hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer mikrobiellen Azospaltung unbeeinflusst durch verwandte Substanzen beurteilt werden können.

Da keine Referenz-Standards zur Verfügung stehen, konnte mit der vorhandenen Ausrüstung der absolute Gehalt des Farbstoffs in seinem Gemisch nicht ermittelt werden. Ein mögliches Verfahren zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Azofarbstoffen in ihrem Gemisch wäre die HPLC mit elektrochemischer Detektion (Titration mit elektrochemisch erzeugtem Ti^{3+}) Zur Quantifizierung wurde hier die Absorption bei 240 nm verwendet, ausgehend von der Überlegung, dass die meisten organischen Verbindungen (mit Ausnahme einiger Lösungsmittel) im kurzwelligen UV-Bereich relativ starke Absorptionsbanden aufweisen.

Die Untersuchung soll möglichst alle organischen Verbindungen erfassen, unabhängig von ihrer Löslichkeit in Wasser oder von ihrem Verhalten während der Festphasen-Extraktion. Daher wurde bei den im Folgenden aufgeführten Arbeitsschritten Methanol als Lösungsmittel verwendet und die Lösung direkt der HPLC zugeführt.

4.1.2.2.2 Durchführung

Jeweils 5 mg jedes Farbstoffs wurden in 10 ml Methanol gelöst, 1 ml dieser Lösung wurde in ein Vial gegeben und direkt der HPLC zugeführt.

Es wurden alle Peaks mit einer Fläche von mindestens 1 mAU·s (Milli-Absorptionseinheit mal Sekunde) integriert, die Gesamtzahl der Peaks und der Anteil des größten Peaks an der Gesamtfläche bestimmt.

4.1.2.2.3 Ergebnisse

Die folgende Tabelle 10 fasst für alle Farbstoffe Anzahl der Peaks, Retentionszeit und Anteil des größten Peaks zusammen:

Tab. 10 Untersuchungen zur Reinheit der Farbstoffe

Farbstoff	Neben-Peaks		Haupt-Peak	
	Anzahl	Davon > 1%	Retentionszeit (min)	Anteil in %
Sudanrot G	36	-	50,55	95,48
Sudan III	20	9	49,37	70,84
Crocein Scharlach	19	2	23,03	94,7
Acid Orange 24	30	7	35,05	49,8
Acid Red 114	15	5	38,87	73,9
Bismarck Braun	18	8	42,18	47,2
Direkt Blau 1	14	3	22,02	89,8
Direkt Blau 14	22	13	19,77	32,2
Direkt Blau 14 NEU	26	2	17,235	85,3
Direkt Rot 2	29	2	31,1	91,2
Congorot	7	-	28,17	98,7
Scharlach R	8	-	53,48	97,9
Oil Red EGN	Kein Haupt-Peak beobachtet			

4.1.2.2.4 Bewertung

Keiner der untersuchten Farbstoffe ist frei von Verunreinigungen. Die meisten Begleit-Substanzen sind jedoch nur in Kleinstmengen < 1 % enthalten.

Zu den Farbstoffen mit dem höchsten Reinheitsgrad gehören das wasserlösliche Congorot und das wasserunlösliche Scharlach R. In beiden Fällen wird nur eine geringe Zahl von Neben-Peaks beobachtet, von denen außerdem keiner mehr als 1% der gesamten Peak-Fläche ausmacht. Der Haupt-Peak repräsentiert 98,7 bzw. 97,9% der Gesamtfläche.

In den Farbstoffen Sudanrot G, Sudan III, Crocein Scharlach, Acid Red 114, Direkt Blau 1, Direkt Rot 2 und einer später erworbenen Charge von Direkt Blau 14 sind zwar deutliche Anteile an Verunreinigungen nachweisbar, jedoch nimmt der Haupt-Peak noch immer über 50% der Gesamtfläche ein. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich bei der

beobachteten Azospaltung im Wesentlichen um die Umsetzung der durch die CAS-Nummer definierten Leitsubstanz handelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die vorhandenen Verunreinigungen Einfluss z.B. auf Zellstoffwechsel oder Membran-Permeabilität und damit auch auf die Azospaltung nehmen.

Die Farbstoffe Acid Orange 24, Bismarck Braun und Direkt Blau 14 (ursprüngliche Charge) waren nur als Stoffgemische mit einem hohen Anteil an Begleitsubstanzen (>50%) erhältlich. Die für diese Stoffe ermittelten Freisetzungsmengen müssen daher kritisch bewertet werden. Ermittelt werden kann in diesem Fall nur die Freisetzung eines Amins aus einer oder mehreren strukturverwandten Azo-Verbindungen, deren Gemisch kommerziell unter dem genannten Namen gehandelt wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Farbstoffe sich hinsichtlich ihrer Reinheit stark unterscheiden und innerhalb dieser Arbeit sowohl nahezu chemisch reine Azofarbstoffe als auch ausgeprägte Stoffgemische untersucht wurden.

Da jedoch auch in der Praxis Stoffgemische, evtl. sogar von ähnlicher Zusammensetzung zum Einsatz kommen, haben auch Freisetzungsmengen von Aminen aus solchen Farbstoff-Gemischen eine praktische Relevanz.

Das Fehlen eines Haupt-Peaks bei dem Farbstoff Oil Red EGN ist wahrscheinlich in der extremen Lipophilie dieses Farbstoffs begründet. Um ihn in überschaubarer Zeit zu eluieren, müsste der methanolische Anteil weiter, ggf. bis auf 100 % erhöht werden. Da für den genannten Farbstoff jedoch in den bisherigen Versuchen keine oder eine nur geringfügige Freisetzung von Aminen gezeigt wurde, ist er für weiterführende Experimente mit einem gereinigten Farbstoff ohnehin von geringerem Interesse.

4.1.3 Gehaltsbestimmung durch chemisch-reduktive Spaltung

4.1.3.1 Theoretische Überlegungen

Als Gehalt wird der prozentuale Anteil eines definierten Stoffes an einem Stoffgemisch verstanden. Wie unter Ziffer 4.1.2.2.1 geschildert, kann mit der hier verwendeten Messtechnik und in Ermangelung eines Referenz-Standards kein absoluter Gehalt angegeben werden. Möglich ist jedoch eine chemische Umsetzung des Farbstoffs bzw. des Gemisches zu den entsprechenden Spaltprodukten und die anschließende Quantifizierung der primären aromatischen Amine, für die analysenreine Standards vorhanden sind.

Als Gehalt definiert werden soll die Masse an Amin, gebildet bei vollständiger Umsetzung des Gemisches im Verhältnis zur berechneten Masse, wie es bei stöchiometrischer Umsetzung des reinen Farbstoffs gebildet würde.

Die Untersuchungen stellen eine Ergänzung zu den Reinheitsbestimmungen unter Ziffer 4.1.2.2 dar. Außerdem ist die Kenntnis, welche Mengen an Amin bei vollständiger Umsetzung des Farbstoffs gebildet werden können, Voraussetzung für Überlegungen zur Bilanzierung, wie sie unter Ziffer 5.5 wiedergegeben sind.

4.1.3.2 Durchführung

Jeweils 5 mg der wasserlöslichen Farbstoffe wurden in 16 ml Citratpuffer gelöst und die Lösungen im Wasserbad auf 70 °C erwärmt. Als Reduktionsmittel wurden 3 ml Natriumdithionit-Lösung ($c = 200 \text{ mg/ml}$) hinzugefügt. Der Farbstoff wurde dabei innerhalb von Sekunden umgesetzt, erkennbar an der Entfärbung der Lösung. Nach 5 min wurde jedem Reagenzglas 1 ml 20%iger Salzsäure hinzu gegeben. Überschüssiges Natriumdithionit wurde durch Zugabe der Säure zerstört, gleichzeitig wurden die Amine in eine protonierte, gegenüber oxidativer Zersetzung unempfindliche Form gebracht. Die Lösungen wurden noch für etwa 60 min auf 70 °C thermostatiert. !

Zur Vermeidung von Verlusten der teilweise flüchtigen Amine wurde die Umsetzung in Reagenzgläsern mit Normschliff-Stopfen durchgeführt. Die Stopfen wurden dabei nur für einige Sekunden angehoben, um die Reagenzien zuzugeben und im Anschluss daran sofort wieder verschlossen. Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen gemäß Ziffer 3.6 filtriert, es wurde jeweils 1 ml Innerer Standard hinzugesetzt und der pH-Wert auf 10,0 eingestellt. Festphasen-Extraktion und chromatographische Untersuchung erfolgten gemäß Ziffer 3.7.1 und 3.8.

Die Kalibrierprobe wurde wie folgt aufgearbeitet:

16 ml Citratpuffer, ohne Zusatz von Aminen oder Farbstoffen, wurde auf 70 °C erwärmt. Es wurden 3 ml Natriumdithionit-Lösung zugesetzt, weitere 10 min später wurde 1 ml 20%iger Salzsäure zugegeben. Die Lösung wurde noch 60 min auf 70 °C gehalten. Nach dem Abkühlen wurden 0,5 ml einer sauren Stammlösung, die alle Amine enthielt ($c = 100 \text{ µg/ml}$) zugesetzt. Die weitere Behandlung erfolgte analog der Realproben.

Um evtl. Verluste an Aminen während der Umsetzung zu erkennen, wurden außerdem die folgenden Wiederfindungsproben aufgearbeitet: 16 ml Citratpuffer wurden 0,5 ml

Stammlösung aller Amine ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Durch tropfenweise Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung wurde erneut ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die Lösungen wurden im Weiteren wie Kalibrier- und Realproben behandelt.

4.1.3.3 Ergebnisse der reduktiven Spaltung

Tabelle 11 gibt die molaren Massen der Farbstoffe und ihrer jeweiligen Spaltprodukte sowie den stöchiometrischen Faktor an. Der stöchiometrische Faktor ist dimensionslos, kann aber definiert werden als die Masse Amin (in Gramm) die bei der vollständigen Umsetzung von 1 Gramm reinem Farbstoff zu erwarten wäre.

Tab. 11 Bei vollständiger Umsetzung aus reinen, löslichen Farbstoffen zu erwartende Mengen an Amin

Farbstoff	$M_{\text{Farbstoff}}$	Amin	M_{Amin}	stöchiometrischer Faktor
Acid Orange 24	448,43	2,4-Xylidin	121,18	0,270
Acid Red 114	830,81	o-Tolidin	212,3	0,255
Bismarck Braun	461,4	2,4-Diaminotoluol	122,17	0,265
Direkt Blau 1	992	o-Dianisidin	244,3	0,246
Direkt Blau 14	960,81	o-Tolidin	212,3	0,221
Direkt Rot 2	724,72	o-Tolidin	212,3	0,293
Congorot	696,67	Benzidin	121,18	0,264

In Tabelle 12 werden die erwarteten mit den gefundenen Mengen an Amin verglichen und mit den durch HPLC (Ziffer 4.1.2.2) ermittelten Werten gegenübergestellt.

Tab. 12 Durch chemisch-reduktive Spaltung aus 1 mg löslichem Farbstoff freigesetzte Mengen an Amin

Farbstoff	Amin	Masse an Amin			Reinheit nach HPLC
		erwartet	gefunden	%	
Acid Orange 24	2,4-Xylidin	270,0	19,3	7,1	49,8
Acid Red 114	o-Tolidin	255,2	131,6	51,6	73,9
Bismarck Braun	2,4-Diaminotoluol	264,8	107,4	40,6	47,2
Direkt Blau 1	o-Dianisidin	246,3	206,9	84,0	89,8
Direkt Blau 14	o-Tolidin	221,0	36,1	16,3	32,2
Direkt Rot 2	o-Tolidin	292,9	117,6	40,2	85,3
Congorot	Benzidin	264,5	257,8	97,5	98,7

4.1.3.4 Bewertung der Ergebnisse

Die Menge der bei der chemisch-reduktiven Spaltung freigesetzten Amine bleibt in den meisten Fällen deutlich hinter dem stöchiometrisch erwarteten Wert zurück.

Vergleicht man den mittels chemisch-reduktiver Spaltung ermittelten Gehalt mit dem durch die HPLC ermittelten Wert, ergibt sich für einige Farbstoffe (Bismarck Braun, Direkt Blau 1, Congorot) eine zumindest näherungsweise Übereinstimmung. Der deutliche Unterschied im Fall des Direkt Rot 2 und des Acid Orange 24 kann darin begründet liegen, dass das kommerziell erhältliche Produkt eine Verreibung des Farbstoffs und seiner Begleitsubstanzen mit einem Salz darstellt. Letzteres wird bei der unter Ziffer 4.1.2.2 beschriebenen Prüfung auf organische Verunreinigungen nicht erfasst. Eine „definitive“ Gehaltsbestimmung ist mit den hier verwendeten Materialien und Methoden nicht möglich. Benötigt würde entweder eine Referenz-Substanz oder die Stoffmenge des eluierten Farbstoffs könnte durch elektrochemische Detektion, z.B. Reduktion mit in situ erzeugtem Ti^{3+} ermittelt werden.

Sowohl HPLC als auch reduktive Spaltung bestätigen, dass Congorot der reinste der verfügbaren löslichen Farbstoffe ist. Somit bietet sich die Möglichkeit, wenigstens bei den Umsetzungen dieses Farbstoffs den Verlauf der Azospaltung nahezu unbeeinflusst durch evtl. störende Begleitsubstanzen zu betrachten.

Die Bestimmung der durch chemisch-reduktive Spaltung freigesetzten Menge an Amin liefert gleichzeitig die Grundlage für Berechnungen zur Bilanzierung unter Ziffer 5.5.1.

4.2 Möglichkeit der mikrobiellen Azospaltung unter aeroben und anaeroben Bedingungen

4.2.1 Ziel der Untersuchung / Theoretische Überlegungen

Bevor im Folgenden verschiedene quantitative Aspekte der Azospaltung beleuchtet werden sollen, mussten zunächst Experimente durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass eine Spaltung des jeweiligen Farbstoffs durch die verschiedenen Stämme von Mikroorganismen prinzipiell möglich ist. Platzek und Lang²¹ hatten die Freisetzung von o-Tolidin aus dem wasserlöslichen Farbstoff Direkt Blau 14 durch etwa 20 Stämme von Mikroorganismen nachgewiesen.

In dieser Arbeit ist die Zahl der verwendeten Stämme von Mikroorganismen auf 5 begrenzt (vgl. Ziffer 3.1.1 zu den Kriterien der Auswahl). Das Spektrum der untersuchten Farbstoffe ist hier allerdings erheblich umfangreicher (Ziffer 3.1.2) und die Farbstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit, der möglicherweise freigesetzten Amine und hinsichtlich ihrer Bedeutung für den vorbeugenden Verbraucherschutz: während die meisten der Farbstoffe lediglich Vertreter einer Substanzgruppe sind, für die bereits ein Verkehrs- und Verwendungsverbot besteht, dürfen Sudanrot G, Sudan III, Crocein Scharlach MOO und Acid Orange 24 weiterhin als Kosmetik-Farbstoffe verwendet werden.

Welchen Einfluss hat die chemische Struktur eines Azofarbstoffs auf seine enzymatische Spaltung? Damit der Farbstoff an das Enzym gebunden werden kann, muss er zunächst gelöst werden. Es ist anzunehmen, dass die von sich aus wasserlöslichen Farbstoffe potentiell schneller zum Enzym gelangen und damit auch umgesetzt werden können.

Ein entscheidender Schritt der enzymatischen Umsetzung ist die Bindung des Enzyms an das Substrat. Hierbei kann die Stereochemie eine entscheidende Rolle spielen: eine funktionelle Gruppe an geeigneter Position kann eine starke Bindung an das Enzym vermitteln und damit die Umsetzung begünstigen – oder aber eine sterische Blockade verursachen, die eine Bindung und Umsetzung am Enzym erschwert oder sogar unmöglich macht.

Schließlich bleibt die reduktive Spaltung, auch wenn sie enzymatisch vermittelt wird, eine Redox-Reaktion, bei der die elektrochemischen Gesetze Anwendung finden. Je stabiler die oxidierte Form, d.h. der Farbstoff ist, desto größer ist die Potential-Differenz, die überwunden werden muss, um zur reduzierten Form, d.h. zu den Aminen zu gelangen. Auf diese Potential-Differenz hat das Enzym als Katalysator keinen Einfluss: es vermittelt lediglich die Reaktion,

verändert aber nicht ihre Energiebilanz. Auch ein Farbstoff, der aufgrund seines sterischen Aufbaus hervorragend an ein Enzym bindet, wird evtl. nicht umgesetzt, wenn die Potentialdifferenz nicht überwunden wird.

Die Umsetzung der Azofarbstoffe zu Aminen ist eine Reaktion, die sich nicht im Gleichgewichtszustand befindet, daher kann die Nernst-Gleichung, die einen statischen Zustand beschreibt, nicht angewendet werden. Richtig bleibt jedoch die Aussage, dass nicht allein die Redox-Potentiale von Edukten und Produkten über den Ablauf einer Redox-Reaktion entscheiden, auch die Konzentration der an der Reaktion beteiligten Stoffe spielt eine Rolle. Auf die reduktive Azospaltung bezogen bedeutet das: je unfreiwilliger die Reaktion im elektrochemischen Sinne abläuft, je größer die zu überwindende Potential-Differenz ist, desto stärker hängt sie vom Angebot an reduzierenden Coenzymen ab.

Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff auf eine etwaige Azospaltung hat. Sugiura et al. hatten anhand von lysierten Bakterienzellen nachgewiesen, dass die Aktivität der azo-spaltenden Enzyme bei Zugabe von reduzierenden Coenzymen wie NADH bzw. NADPH stark zunahm. Da Sauerstoff der natürliche Akzeptor für den durch diese Coenzyme gebundenen Wasserstoff ist, liegt die Annahme nahe, dass er mit den Azoreduktasen konkurriert und dass ein Mangel an Sauerstoff die Azospaltung beschleunigen würde.

Allerdings werden hier kein Lysate, sondern lebende Zellen untersucht und so wäre es denkbar, dass die Anwesenheit von Sauerstoff den Stoffwechsel der Zellen insgesamt und damit auch die Umsetzung der Azofarbstoffe beschleunigen könnte.

4.2.2 Durchführung der Experimente

Der Ablauf des Experiments wurde bereits unter Ziffer 3.2 bis 3.8 beschrieben. Die Mengen von Farbstoff, mit denen die Assays dotiert wurden, wurden dabei zunächst aus pragmatischen Gründen gewählt: bei löslichen Farbstoffen wurde jeweils eine Menge von 1 mg, gelöst in 10 ml Simulanz hinzugegeben, u.a. weil größere Mengen einiger Farbstoffe (z.B. Acid Red 114 und Direkt Rot 2) nicht oder nur schwer in 10 ml Simulanz-Lösung löslich waren. Es waren jeweils mindestens 50 ml einer entsprechenden Lösung bereitet worden.

Im Fall der wasserunlöslichen Farbstoffe wurden jeweils 5 mg eingewogen, um die durch die Einwaage bedingten zufälligen Fehler zu minimieren.

4.2.3 Ergebnisse

4.2.3.1 Visuelle Betrachtung

Bevor im Folgenden auf die quantitativen Ergebnisse der Untersuchungen eingegangen wird, sollen die Abbildungen 6 bis 9 die Möglichkeit der mikrobiellen Azospaltung verdeutlichen:



Abb. 6 und 7 Ansätze von *Micrococcus luteus* mit 1, 2 und 3 mg Direkt Blau 1, vor (Abb. 6) und nach (Abb. 7) 24 h anaerober Inkubation

Im Verlauf von 24 h wurden 1 und 2 mg Direkt Blau vollständig abgebaut, erkennbar an der Entfärbung der Assays (vgl. Abb. 6 und 7). Im Assay der ursprünglich 3 mg Direkt Blau 1 enthielt, sind am Ende der Inkubation noch Spuren des Farbstoffs erkennbar.



Abb. 8 und 9 Ansätze von *Micrococcus luteus* mit 1, 2 und 3 mg Crocein Scharlach, vor (Abb. 8) und nach (Abb. 9) 4 h anaerober Inkubation

Bereits nach 4 Stunden anaerober Inkubation wurde 1 mg Crocein Scharlach vollständig abgebaut (vgl. Abb. 8 und 9). Die Konzentration des Farbstoffs in den Assays mit ursprünglich 2 und 3 mg Crocein Scharlach wurde deutlich erniedrigt.

4.2.3.2 Quantitative Ergebnisse

Die folgende Tabelle 13 führt beispielhaft die Mengen an Amin auf, die bei der Inkubation von *Micrococcus luteus* durch Azospaltung verschiedener Farbstoffe freigesetzt wurden. Neben den Ergebnissen einer Doppelbestimmung ist der Mittelwert angegeben:

Tab. 13 Azospaltung durch *Micrococcus luteus*

Farbstoff	Masse [mg]	Bedingung	Nachgewiesenes Amin [μg]		
			Wert 1	Wert 2	MW
Sudanrot G	5	aerob	6,37	6,55	6,46
		anaerob	14,10	15,39	14,74
Sudan III ^{1*}	5	aerob	1,12	1,13	1,13
		anaerob	1,90	1,53	1,72
Crocein Scharlach	1	aerob	10,70	9,12	9,91
		anaerob	231,03	269,06	250,04
Acid Orange 24	1	aerob	0,42	0,44	0,43
		anaerob	19,23	18,12	18,68
Acid Red 114	1	aerob	n.n.	n.n.	-
		anaerob	35,22	37,71	36,46
Bismarck Braun	1	aerob	1,28	1,33	1,31
		anaerob	45,60	51,91	48,75
Direkt Blau 1	1	aerob	0,05	0,05	0,05
		anaerob	153,90	162,16	158,03
Direkt Blau 14	1	aerob	n.n.	n.n.	-
		anaerob	31,22	32,98	32,10
Direkt Rot 2	1	aerob	n.n.	n.n.	-
		anaerob	12,64	12,92	12,78
Congorot	1	aerob	0,05	0,05	0,05
		anaerob	65,37	76,36	70,86
Scharlach R	5	aerob	2,23	2,24	2,24
		anaerob	7,17	6,34	6,75
Oil Red EGN	5	aerob	n.n.	n.n.	-
		anaerob	1,45	1,41	1,43

1* In diesem Versuchsgang wurde kein Blindwert für 4-Aminoazobenzen ermittelt, dieser lag jedoch bei früheren Versuchen (vgl. Tabelle 8 und 9) bei ca. 0,8 μg Amin. Die freigesetzten Mengen an 4-Aminoazobenzen liegen somit niedriger, für die Zwecke der folgenden Tabelle 14 sollen sie als „schwach positiv“ bezeichnet werden.

Die bei der Inkubation der übrigen 4 Bakterienstämme ermittelten Ergebnisse sind im Anhang C wiedergegeben. Tabelle 14 bietet jedoch eine halbquantitative Zusammenfassung der beobachteten Freisetzung. Dabei bezeichnet „schwach positiv“ eine Freisetzung von 0,1-1,0 μg Amin je Assay, als „positiv“ gelten Assays mit 1,0-10,0 μg freigesetztem Amin, darüber liegenden Werte werden als „stark positiv“ bezeichnet:

Tab. 14: Halbquantitative Zusammenfassung der Azospaltung durch 5 untersuchte Bakterienstämme

	Masse [mg]	Bedingungen	<i>Micrococcus Luteus</i>	<i>Micrococcus Varians</i>	<i>Micrococcus roseus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Sudanrot G	5	aerob	positiv	positiv	schwach positiv	schwach positiv	nicht getestet
		anaerob	stark positiv	positiv	positiv	stark positiv	nicht getestet
Sudan III	5	aerob	schwach positiv	negativ	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
		anaerob	schwach positiv	negativ	schwach positiv	nicht getestet	nicht getestet
Crocein Scharlach	1	aerob	stark positiv	stark positiv	nicht getestet	positiv	positiv
		anaerob	stark positiv	stark positiv	positiv	positiv	positiv
Acid Orange 24	1	aerob	schwach positiv	schwach positiv	nicht getestet	schwach positiv	nicht getestet
		anaerob	stark positiv	stark positiv	positiv	stark positiv	nicht getestet
Acid Red 114	1	aerob	negativ	negativ	nicht getestet	nicht getestet	negativ
		anaerob	stark positiv	positiv	positiv	stark positiv	negativ
Bismarck Braun	1	aerob	positiv	schwach positiv	nicht getestet	schwach positiv	nicht getestet
		anaerob	stark positiv	stark positiv	stark positiv	stark positiv	nicht getestet
Direkt Blau 1	1	aerob	negativ	negativ	nicht getestet	negativ	schwach positiv
		anaerob	stark positiv	stark positiv	stark positiv	stark positiv	positiv
Direkt Blau 14	1	aerob	negativ	negativ	nicht getestet	negativ	negativ
		anaerob	stark positiv	stark positiv	positiv	stark positiv	positiv
Direkt Rot 2	1	aerob	negativ	negativ	nicht getestet	schwach positiv	schwach positiv
		anaerob	stark positiv	positiv	schwach positiv	stark positiv	schwach positiv
Congorot	1	aerob	schwach positiv	schwach positiv	nicht getestet	Schwach positiv	schwach positiv
		anaerob	stark positiv	stark positiv	positiv	stark positiv	stark positiv
Scharlach R	5	aerob	positiv	negativ	nicht getestet	schwach positiv	nicht getestet
		anaerob	positiv	positiv	stark positiv	stark positiv	nicht getestet
Oil Red EGN	5	aerob	negativ	negativ	nicht getestet	negativ	nicht getestet
		anaerob	positiv	schwach positiv	schwach positiv	positiv	nicht getestet

Eine vergleichende Bewertung der halbquantitativen Ergebnisse ist unter den Ziffer 4.2.4.2 und 4.2.4.3 wiedergegeben.

4.2.4 Diskussion

4.2.4.1 Allgemeines

Das offensichtlichste Resultat, das sich aus den vorliegenden Daten ableiten lässt, ist, dass die mikrobielle Azospaltung, wie sie in den Vorarbeiten erstmals beschrieben wurde, kein isoliertes Phänomen, sondern eine verbreitete metabolische Fähigkeit der untersuchten Hautbakterien darstellt: Bei den meisten der hier untersuchten Farbstoffe kam es zu einer reduktiven Spaltung, die sich anhand des gebildeten Spaltprodukts, des Amins nachweisen ließ.

4.2.4.2 Möglichkeit der Azospaltung bei den verschiedenen Farbstoffen

Die Farbstoffe lassen sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber azo-spaltenden Enzymen anhand der vorliegenden Ergebnisse in 3 Gruppen einteilen:

Gruppe A: Azospaltung im aeroben Milieu deutlich nachweisbar,
unter anaeroben Bedingungen weitere Steigerung der Umsetzung

Vertreter: **Sudanrot G, Crocein Scharlach, Acid Orange 24**, Congorot,
Scharlach R

Gruppe B: Azospaltung im aeroben Milieu nicht nachweisbar,
aber deutliche (z.T. quantitative) Umsetzungen im anaeroben Milieu

Vertreter: Acid Red 114, Direkt Blau 1, Direkt Blau 14, Direkt Rot 2

Gruppe C: unter aeroben und anaeroben Bedingungen keine Azospaltung nachweisbar

Vertreter: **Sudan III**, Oil Red EGN

Die nach Kosmetik-Verordnung zugelassenen Farbstoffe sind fett markiert. Drei dieser Farbstoffe setzen bereits unter aeroben, d.h. den Gegebenheiten auf der menschlichen Haut sehr ähnlichen Bedingungen ein Amin frei, das im Verdacht steht, krebsauslösend zu wirken. Im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes lassen die Ergebnisse durchaus Handlungsbedarf erkennen: Ihre Zulassung zur Anwendung in Kosmetik-Farbstoffen sollte daher dringend überdacht werden.

4.2.4.3 Möglichkeit der Azospaltung durch verschiedene Mikroorganismen

Die 5 untersuchten Bakterienstämme verhalten sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Azospaltung zumindest ähnlich. Farbstoffe der Gruppe A erwiesen sich bei keiner der durchgeführten Untersuchungen als inert. Für Farbstoffe der Gruppe B wurde unter aeroben Bedingungen das Spaltprodukt nur in Spuren oder überhaupt nicht nachgewiesen, anaeroben Bedingungen waren auch hier alle Stämme, soweit untersucht zur Umsetzung des Farbstoffs zum Amin in der Lage. Letztlich findet sich unter den unter den durchgeführten Freisetzungen kein Beispiel einer deutlichen Freisetzung von Aminen aus Farbstoffen der Gruppe C. Qualitativ lassen sich die Beobachtungen, die an einem Testkeim gemacht werden also auf die übrigen Stämme übertragen. Es ist daher möglich, *Micrococcus luteus*, der sich experimentell gut handhaben lässt, als Repräsentanten der Mikroflora der menschlichen Haut und als Testkeim für die folgenden quantitativen Untersuchungen einzusetzen.

4.2.4.4 Bedeutung der Zufuhr von Sauerstoff

Deutlich ist erkennbar, dass es unter anaeroben Bedingungen zu einer starken Beschleunigung der Azospaltung kommt. Da die reduzierenden Coenzyme nicht mit ihrem natürlichen Substrat Sauerstoff umgesetzt werden können, stehen sie in größeren Mengen für die Azospaltung zur Verfügung, die Reaktion wird beschleunigt bzw. auch bei einigen Farbstoffen, bei denen Spaltprodukte unter aeroben Bedingungen nicht nachweisbar waren, kommt nunmehr eine nachweisbare Umsetzung in Gang. Besonders auffällig ist hierbei der Farbstoff Direkt Blau 1, für den unter aeroben Bedingungen nur Spuren bzw. keine Spaltprodukte nachweisbar sind, der jedoch unter anaeroben Bedingungen vollständig abgebaut wird, so dass der Assay im Anschluss an die Inkubation vollständig entfärbt ist.

Die große Bedeutung des Sauerstoffangebots (bzw. Sauerstoffmangels) für den Verlauf der Azospaltung erklärt auch ein Phänomen, das bereits bei den Arbeiten von Platzek und Lang beobachtet worden war: hier hatte eine Verdoppelung der Keimzahl von *Staphylococcus aureus* zur Freisetzung der 8-fachen Menge an o-Tolidin aus Direkt Blau 14 geführt. Ähnlich wie bei den hier zu Beginn durchgeführten Versuchen war der Sauerstoff nicht entfernt worden, die Inkubation wurde in geschlossenen Gefäßen (in etwa vergleichbar den 40 ml Vials mit Schraubverschluss) durchgeführt. Der Sauerstoff wurde dabei durch die Stoffwechsellätigkeit der Bakterien verbraucht, unter den Bedingungen des Sauerstoffmangels kam nun eine beschleunigte Azospaltung in Gang.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, in wie weit die in vitro herrschenden Bedingungen, insbesondere hinsichtlich des Sauerstoffs-Angebots die realen in vivo Bedingungen auf der menschlichen Haut wiedergeben. Sicher stellt das aerobe Modell die bessere Annäherung an die Realität dar, gerade deswegen verdienen die oben aufgezeigten Ergebnisse (Freisetzung der Amine aus Farbstoffen z.T. auch unter aeroben Bedingungen) eine besondere Beachtung. Andererseits ist das Angebot an Sauerstoff für die Bakterien im aeroben in-vitro-Modell vermutlich besser als auf der Haut: die fortgesetzte Schüttelbewegung von 120 Hüben pro Minute verhindert nicht nur eine Sedimentation der Bakterienzellen, sie begünstigt auch die Absorption von Sauerstoff aus der umgebenden Gasphase in die Lösung, die Zellen sind auf diese Weise nahezu optimal mit Sauerstoff versorgt. Welche Bedingungen herrschen auf der menschlichen Haut? Ein Großteil der menschlichen Hautflora existiert unmittelbar auf der Hautoberfläche, d.h. unter eindeutig aeroben Bedingungen. Allerdings befinden sich Hautbakterien auch in den tieferen Schichten des Stratum corneum, wo zumindest kein freier Zugang von Sauerstoff herrscht und es bei stärkerer Vermehrung der Bakterienzellen evtl. zu einem regelrechten Sauerstoff-Mangel kommen kann. Daher hat auch die Inkubation unter anaeroben Bedingungen als worst-case-Versuch eine gewisse Berechtigung.

Kommt es auch unter anaeroben Bedingungen nicht zu einer Freisetzung des Amins, so kann man davon ausgehen, dass der Farbstoff einer Azospaltung nicht zugänglich ist. Ein solcher worst-case-Versuch eignet sich auch, um Farbstoffgemische, die z.B. aus echten Proben von Bedarfsgegenständen isoliert wurden, auf die Möglichkeit einer reduktiven Spaltung zu primären aromatischen Aminen zu untersuchen.

Weiterhin ist die anaerobe Inkubation ein gutes Modell-System, bei dem die Farbstoffe häufig unter Freisetzung von gut quantifizierbaren Mengen von Aminen gespalten werden. Somit ist dieses Modell für weitere Versuche zum Einfluss bestimmter Parameter wie der Menge des angebotenen Substrats oder der Keimzahl sowie für Untersuchungen zur Kinetik bestens geeignet.

4.2.4.5 Mechanismus: Enzymatische oder nicht-enzymatische Umsetzung?

In der Literatur wurde die mikrobielle Azospaltung sowohl über enzymatische als auch über nicht-enzymatische Mechanismen beschrieben. Auf welche Weise kommt die bei diesen Bakterien-Stämmen beschriebene Azospaltung zustande?

Obwohl eine enzymatische Spaltung erst dann eindeutig nachgewiesen ist, wenn das dafür verantwortliche Enzym isoliert wurde, so deuten doch die vorliegenden Daten eindeutig darauf hin. Sangkil und Renganthan²⁷ hatten festgestellt, dass nicht-enzymatische Umsetzungen langsam und wenig substrat-spezifisch sind. Im Gegensatz dazu verlaufen die hier beobachteten Freisetzungen mit solch einer Geschwindigkeit ab, dass z.T. mehrere Milligramm des Farbstoffs abgebaut werden (vgl. Abb. 6 und 7). Außerdem ist die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Maße substratspezifisch: so weisen Scharlach R und Oil Red EGN bzw. Direkt Blau 1 und Direkt Blau 14 sehr ähnliche Strukturen auf. Scharlach R unterliegt schon unter aeroben Bedingungen einer Azospaltung, während Oil Red EGN selbst unter anaeroben Bedingungen nahezu inert ist. Direkt Blau 1 und 14 werden zwar beide nur unter anaeroben Bedingungen gespalten, jedoch erfolgt die Spaltung von Direkt Blau 1 ungleich schneller (vgl. hierzu auch die Tab. und Abb. E-1 und E-5 im Anhang).

4.2.4.6 Streuung der Ergebnisse bei Doppelbestimmungen

Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen stimmen in vielen Fällen gut miteinander überein und weichen um weniger als 10% vom Mittelwert ab. Ausnahmen davon finden sich häufig bei den Versuchen, in denen noch 40 ml Vials mit Schraub-Verschluss verwendet wurden: hierbei lässt sich nicht ausschließen, dass es doch zu einem geringfügigen Zutritt von Sauerstoff in das Gefäß kommt, was die Freisetzung des Amins entsprechend verlangsamt.

Die Verwendung von Reagenzgläsern (und schließlich Erlenmeyer-Kolben) mit Normschliff-Verschluss anstelle von Vials mit Schraubverschluss trug dazu bei, die Abweichung zwischen den einzelnen Ergebnissen von Doppelbestimmung unter anaeroben Bedingungen deutlich zu verringern. Als Beispiel seien hier die Doppelbestimmungen bei der Inkubation von 4 Farbstoffen, sowohl in Kolben als auch in Vials aufgeführt:

Tab. 15 Doppelbestimmung der Freisetzung von Aminen durch anaerobe Inkubation in Kolben und Vials

Amin und Farbstoff	Gefäß	Wert 1 [µg]	Wert 2 [µg]	Mittelwert [µg]	+/- ^{1*} [%]
2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun	Vial	33,79	38,33	36,06	6,3
	Kolben	45,60	51,91	48,76	6,5
o-Dianisidin aus Direkt Blau 1	Vial	161,56	6,70	84,13	92,0
	Kolben	153,90	162,16	158,03	2,6
o-Tolidin aus Direkt Blau 14	Vial	17,39	22,29	19,84	12,4
	Kolben	31,22	32,98	32,10	2,7
Benzidin aus Congorot	Vial	5,20	8,74	6,97	25,4
	Kolben	65,37	76,36	70,87	7,8

^{1*} Abweichung der Messwerte vom Mittelwert, angegeben in Prozent, bezogen auf den Mittelwert

Besonders auffällig ist die Abweichung zwischen den beiden Werten bei der Inkubation von Direkt Blau 1 in Vials. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Inkubation in Vial 2 durch das Eindringen von Sauerstoff gestört wurde und der ermittelte Wert als nicht valide anzusehen ist. Für die übrigen Farbstoffe soll die Schwankungsbreite auch graphisch noch einmal verglichen werden:

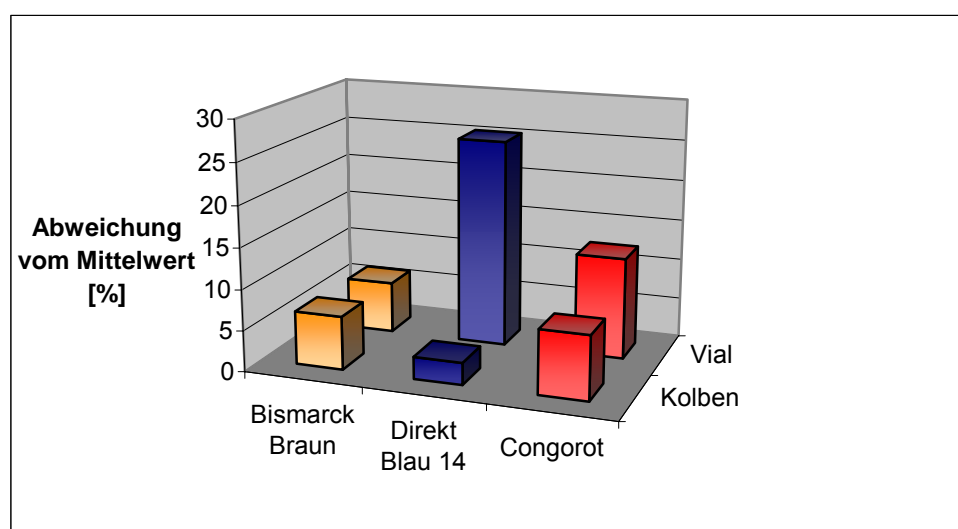


Abb. 10 Streuung bei der Doppelbestimmung der Freisetzung von Aminen durch anaerobe Inkubation in Kolben und Vials

Bei der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun sind die Abweichungen der Messergebnisse vom jeweiligen Mittelwert miteinander vergleichbar. Anders bei den Farbstoffen Congorot, Direkt Blau 14 und (dem hier nicht graphisch dargestellten) Direkt Blau 1. Hier differieren die bei der Inkubation in Vials ermittelten Werte weitaus stärker von einander als das bei der Inkubation in Kolben der Fall ist. Anders ausgedrückt: hier wird besonders deutlich, wie die Verwendung von Kolben mit Normschliff-Stopfen zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Messwerte bei der anaeroben Inkubation beigetragen hat. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden daher alle anaeroben Inkubation in den zuletzt genannten Gefäßen durchgeführt. Eine statistische Absicherung der Reproduzierbarkeit von Messwerten muss jedoch durch Sechsfach-Bestimmung und Ermittlung der Standardabweichung erfolgen, beschrieben unter Ziffer 4.4.

4.2.4.7 Umsetzung wasserunlöslicher Farbstoffe

Auch wasserunlösliche Farbstoffe, z.B. Sudanrot G und Scharlach R können durch Azoreduktasen umgesetzt werden. Wie ist der Farbstoff zum Enzym gelangt? Selbst wenn sich dieses in der extrazellulären Flüssigkeit befindet (eine Annahme, die aufgrund anderer Beobachtungen als unwahrscheinlich erscheint, vgl. Ziffer 5.6.3), muss ein Teil des Farbstoffs gelöst worden sein, um an das Enzym zu binden: auch bei Stoffen, die als „praktisch unlöslich“ bezeichnet werden, geht ein geringer Anteil in das Lösungsmittel über. Werden diese durch Adsorption an eine organische Matrix (entweder das Enzym selbst oder die Zellwände und Membranen der Bakterien) aus dem Gleichgewicht entfernt, so können erneut geringe Anteile des ungelösten Stoffes in Lösung gehen.

Ausgehend von der Annahme, dass sich die Azoreduktasen im Inneren der Zelle befinden (vgl. Ziffer 5.3.6), erscheint auch folgende Erklärung denkbar: berühren Bakterienzellen die Partikel des im Assay suspendierten Farbstoffs, so kann es zu einer direkten Adsorption der Farbstoff-Moleküle durch die lipophile Wand/Membran der Zellen kommen. Von dort können sie an das Innere der Zellen weitergegeben und schließlich von den Azoreduktasen gebunden werden.

4.2.4.8 Struktur der Farbstoffe und Azospaltung

Bzgl. der Korrelation zwischen der Struktur der Azofarbstoffe und ihrer Umsetzung durch Azoreduktasen lassen sich einige Beobachtungen und Überlegungen anstellen, die zwar plausibel, anhand der bislang vorliegenden Daten nicht mit Sicherheit zu bestätigen sind. Die entsprechenden Beobachtungen sind daher unter Ziffer 5.1 im Ausblick wiedergegeben.

4.3 Untersuchungen zur Stabilität der Amine im Assay

4.3.1 Theoretische Überlegungen

Nach seiner Freisetzung durch reduktive Spaltung kann das entstehende Amin einer weiteren Metabolisierung unterliegen. Vor allem die folgenden Reaktionen sind denkbar und wurden von Platzek und Lang bereits am Beispiel des o-Tolidins beschrieben:

- Oxidation der primären Amino-Gruppe zur Hydroxyamino-Gruppe,
- Austausch der Amino-Gruppe gegen eine Hydroxy-Gruppe,
Desaminierung (Entfernung der Amino-Gruppe, an deren Stelle ein Wasserstoff-Atom tritt).

Weitergehende Oxidationen, die mit Öffnung des aromatischen Rings verbunden sind, wie von Parris beschrieben, führen in der Regel zu Verbindungen, die sich einem Nachweis mittels Festphasenextraktion entziehen: Eine Kohlenstoffverbindung, die vollständig desaminiert und deren aromatischer Ring geöffnet wurde, kann letztlich sogar in den Citrat-Zyklus eingeschleust und so bis hin zu anorganischen Produkten abgebaut werden²⁸. Tatsächlich sind Bakterien in der Lage, aromatische Amine als Kohlenstoff-Quelle zu verwenden²⁹

Liegt im Assay bzw. in der Zelle eine hohe Konzentration an Aminen und deren Oxidationsprodukten vor, so ist nach Parris auch die Bildung neuer Kopplungsprodukte zwischen diesen Stoffen möglich.²⁹

Platzek und Lang hatten nachgewiesen, dass das gebildete o-Tolidin teilweise einer Desaminierung bzw. einem Austausch einer Amino-Gruppe gegen eine Hydroxy-Gruppe unterliegt. Nach einer 72stündigen Inkubation wurde außerdem ein desaminiertes, N-acteyliertes Produkt nachgewiesen.

Einen Sonderfall stellt das 4-Aminoazobenzol dar (vgl. Abb. A-21 in Anhang A). Es handelt sich hierbei nicht nur um ein aus einem Azofarbstoff freigesetztes Amin, sondern gleichzeitig um eine Azo-Verbindung, die möglicherweise selbst einem reduktiven Abbau durch die entsprechenden Enzyme unterliegt.

Der Abbau von Aminen während der Inkubation kann zur Folge haben, dass die nachgewiesene Menge an Aminen erniedrigt wird, (im zeitlichen Verlauf) rückläufig ist – oder im Extremfall, obwohl ein Farbstoff sehr wohl einer Azospaltung unterliegt, das

Spaltprodukt nicht nachgewiesen werden kann (falsch negatives Ergebnis). Die folgenden Versuche sollen zumindest einen Anhaltspunkt zur Empfindlichkeit der Amine gegenüber weiteren Abbaureaktionen liefern. Dazu werden Assays, die keinen Farbstoff enthalten, mit einer Mischung von Aminen dotiert und wahlweise unter aeroben und anaeroben Bedingungen inkubiert.

4.3.2 Durchführung

Zwischen 10 und 100 µg eines oder mehrerer Amine wurden in Simulanz-Lösung gegeben und soweit erforderlich der pH-Wert wieder auf 6,8 eingestellt. Durch Zugabe von 10 ml Keimsuspension, bereitet gemäß Ziffer 3.2 und 3.3, wurde ein Assay bereitet, der keine Farbstoffe enthielt, hinsichtlich seiner sonstigen Zusammensetzung den übrigen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten entsprach. Inkubationen wurden sowohl unter aeroben und anaeroben Bedingungen als auch mit begrenztem Sauerstoff-Angebot (Verwendung von 40 ml Vials, vgl. Ziffer 3.3.2) durchgeführt. Die Entnahme und Aufarbeitung der Probe erfolgten entweder nach 24 Stunden oder auch mehrfach während eines Experiments (vgl. Durchführung der Experimente zur Kinetik, Ziffer 4.7.2). Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Experimente und ihre jeweiligen Bedingungen:

Tab. 16 Experimente zur Stabilität der Amine im Assay

KW	Amin	Masse [µg]	Bedingungen	Probenahme
37/02	Mischung von 2,4-Diaminotoluol, o-Anisidin, Benzidin, 4,4'-Thiodianilin, o-Tolidin, o-Dianisidin	10	aerob	nach 24 h
38/02	2,4-Diaminotoluol, Benzidin, 4,4'-Thiodianilin, o-Tolidin, jeweils als Einzelsubstanzen	Jeweils 10 und 20	O ₂ -Mangel	nach 24 h
30/03	Mischung aller Amine	100	anaerob	nach 4 h, 8 h, 16 h und 21 h

4.3.3 Ergebnisse

Tab. 17 Wiederfindung nach 24 h aerober Inkubation, KW 37/02

Amin	Wiederfindung [%]
2,4-Diaminotoluol	62,4
o-Anisidin	71,4
2,4-Xylidin	70,6
4,4'-Thiodianilin	60,8
4-Aminoazobenzen	84,8
Benzidin	67,9
o-Tolidin	75,1
o-Dianisidin	76,8

Wie die Wiederfindungsraten in Tabelle 17 zeigen, unterliegen alle hier untersuchten Amine unter aeroben Bedingungen einem gewissen Abbau. Dieser ist am ausgeprägtesten für 2,4-Diaminotoluol und 4,4'-Thiodianilin. Etwas langsamer verläuft der Abbau von 2,4-Xylidin und o-Anisidin.

Die Wiederfindung ist für o-Tolidin und o-Dianisidin etwas höher als für Benzidin.

Tab. 18 Wiederfindung nach 24 h Inkubation unter O₂-Mangel, KW 38/02

Amin	Wiederfindung [%] von	
	10 µg	20 µg
2,4-Diaminotoluol	67,3	57,3
o-Anisidin	102,5	98,8
4,4'-Thiodianilin	84,1	82,2
4-Aminoazobenzen	0,0	13,8
Benzidin	85,2	85,9
o-Tolidin	95,5	91,9

Auch bei nur begrenztem Sauerstoff-Angebot (Tab. 18) unterliegt 2,4-Diaminotoluol noch immer einem deutlichen Abbau. Im Gegensatz dazu wird das eingesetzte o-Anisidin zu nahe 100% wiedergefunden. 4-Aminoazobenzen ist nach 24 h Inkubation nicht mehr oder nur in Restmengen nachweisbar. Die Wiederfindung ist für Benzidin etwas geringer als sein Derivat o-Tolidin.

Tab. 19 Wiederfindung nach 4, 8, 16 und 21 h Inkubation anaerober Inkubation, KW 30/03

Amin	Wiederfindung [%] nach			
	4 h	8 h	16 h	21 h
2,4-Xylidin	88,90	84,49	79,45	77,09
4,4'-Thiodianilin	91,11	91,35	90,91	94,81
4-Aminoazobenzen	10,31	0,00	0,00	0,00
Benzidin	91,89	92,27	91,68	95,90
o-Tolidin	92,20	92,39	91,99	96,44
o-Dianisidin	94,54	95,29	94,66	99,71

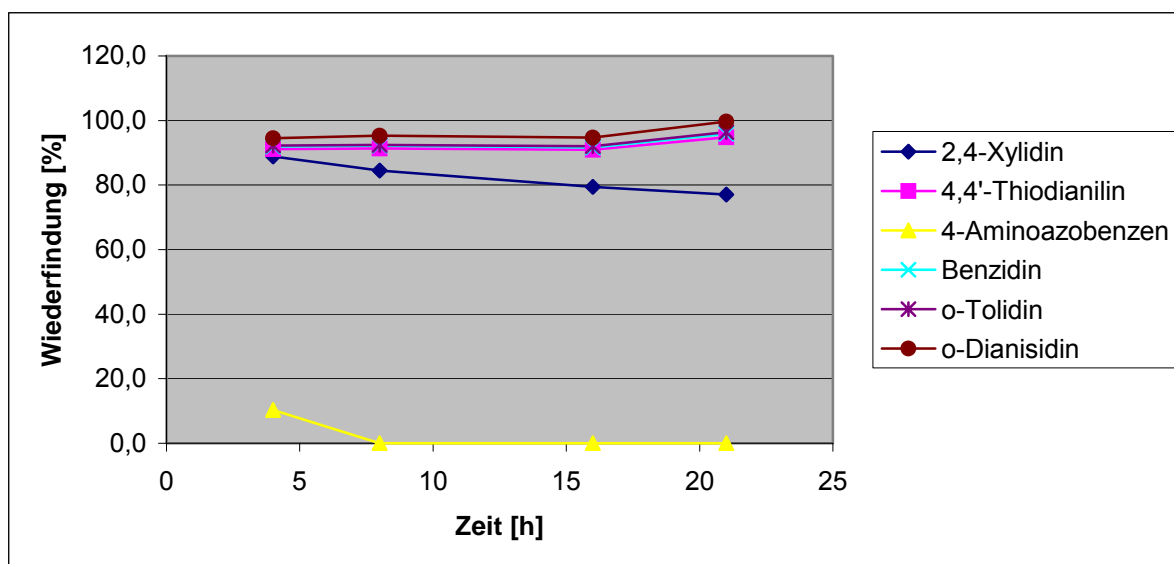


Abb. 11 Wiederfindung nach 4, 8, 16 und 21 h Inkubation anaerober Inkubation, KW 30/03

Unter streng anaeroben Bedingungen (dargestellt in Tab. 19 und Abb. 11) unterliegen extrazellulär zugegebene Benzidin-Derivate keinem signifikanten Abbau. Der langsame, aber stetige Rückgang der Konzentration des 2,4-Xylidin kann durch enzymatischen Abbau, aber auch durch das notwendige Spülen des Assays mit Stickstoff bedingt sein (2,4-Xylidin ist ein relativ flüchtiger Analyt). Auffällig ist der rasche Abbau des 4-Aminoazobenzens, das bereits nach 4 h nur noch zu 10%, bei allen weiteren Proben nicht mehr nachweisbar ist.

4.1.1 Diskussion

Das offensichtlichste Ergebnis der Versuche zum Abbau extrazellulär zugesetzter Amine ist, dass 4-Aminoazobenzen einem gänzlich anderen Abbau unterliegt als die übrigen Analyten:

Die meisten Amine werden unter aeroben Bedingungen am ehesten abgebaut, Sauerstoff-Mangel oder streng anaerobe Bedingungen verlangsamen diesen Abbau oder bringen ihn gänzlich zum Erliegen. Im Gegensatz ist die Wiederfindung von 4-Aminoazobenzol unter aeroben Bedingungen höher als für alle anderen Amine (85%), bei Sauerstoff-Mangel sind nach 24 h höchstens Restmengen nachweisbar, unter streng anaeroben Bedingungen wird die Substanz binnen 8 h vollständig abgebaut.

Die wahrscheinlichste Erklärung dafür liegt in der Struktur des 4-Aminoazobenzols (Abb. A-21 im Anhang A), das nicht nur ein Amin sondern gleichzeitig eine Azo-Verbindung und somit ein Substrat für Azoreduktasen darstellt. Wie unter Ziffer 4.2.4.4 erläutert, verläuft die Azospaltung unter anaeroben Bedingungen ungleich schneller als bei ausreichendem Sauerstoff-Angebot.

Derivate des Benzidins unterliegen nach extrazellulärer Zugabe unter aeroben Bedingungen einem oxidativen Abbau. Steht Sauerstoff nur begrenzt zur Verfügung bzw. wird dieser aus dem Assay entfernt, erfolgt ein solcher Abbau weitaus langsamer bzw. lässt sich nicht mehr nachweisen. Unter aeroben Bedingungen lässt sich eine abgestufte Oxidations-Empfindlichkeit erkennen: Benzidin wird stärker abgebaut als seine Derivate o-Tolidin und o-Dianisidin. Mögliche Erklärung ist eine sterische Blockade durch die Methyl- bzw. Methoxy-Gruppen, die die Amino-Gruppe vor dem Angriff oxidativer Enzyme schützt.

Für Anilin-Derivate lässt sich ein ähnlicher Zusammenhang erkennen: 2,4-Diaminotoluol wird stärker abgebaut als o-Anisidin, das eine Methoxy-Gruppe in Nachbarschaft (ortho-Stellung) zur Amino-Gruppe aufweist. Bei begrenztem Sauerstoff-Angebot wird immer noch eine deutliche Menge des 2,4-Diaminotoluols abgebaut, während o-Anisidin unter diesen Bedingungen fast inert ist.

Die unter aeroben Bedingungen, aber auch bei begrenztem Sauerstoff-Angebot erkennbare Oxidationsempfindlichkeit von 2,4-Diaminotoluol³⁰ und 4,4'-Thiodianilin³¹ stimmt gut mit den Literaturangaben überein, die auf die geringe Stabilität dieser Stoffe hinweisen.

4.4 Reproduzierbarkeit des Experimentes

4.4.1 Theoretische Überlegungen

Voraussetzungen für alle folgenden Versuche zu den quantitativen Aspekten der Azospaltung ist die Reproduzierbarkeit des Experimentes. Nur wenn, zumindest innerhalb eines wöchentlichen Arbeitsgangs gleiche Voraussetzungen bei der Inkubation eines Assays auch zu (innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite) vergleichbaren Ergebnissen führen, machen zusätzliche Experimente mit mehreren Assays, bei denen ein Parameter gezielt variiert wird, Sinn.

Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist eine gleich hohe Keimzahl in allen mit einander verglichenen Ansätzen und eine gleichförmige An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff, vgl. Ziffer 4.2.4.4.

4.4.2 Durchführung

Um die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Arbeitsgangs zu prüfen, wurden 6 Standard-Assays mit jeweils 1 mg eines löslichen Farbstoffs bzw. 5 mg eines unlöslichen Farbstoffs unter definierten Bedingungen (aerob bzw. anaerob) für 24 h inkubiert. Abweichend davon wurde für Crocein Scharlach die aerobe Inkubation nach 8 Stunden und die anaerobe Inkubation nach 4 Stunden beendet, indem der Assay auf Kühlschranktemperatur (4 °C) abgekühlt wurde. Aufarbeitung und Analyse erfolgten wie unter Ziffer 3.5 bis 3.9 beschrieben.

4.4.3 Ergebnisse

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sechsfach-Bestimmungen, den Mittelwert der Menge des freigesetzten Amins sowie die relative Standard-Abweichung.

Tab. 20 **Versuche zur Reproduzierbarkeit der freigesetzten Amin-Menge**

Amin aus Farbstoff	Bedingungen	Mittelwert [μg]	RSD [%]	Arbeitsgang
2,4-Xylidin aus Acid Orange 24	aerob	1,04	3,58	KW 32/03
	anaerob	11,17	1,15	KW 5/03
	anaerob	17,5	7,41	KW 32/03
o-Tolidin aus Acid Red 114	anaerob	54,91	4,52	KW 32/03
2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun	aerob	1,78	5,15	KW 27/03
	anaerob	38,2	4,49	KW 27/03
o-Tolidin aus Direkt Blau 1	anaerob	138,3	1,38	KW 27/03
o-Tolidin aus Direkt Blau 14	anaerob	28,74	4,78	KW 32/03
Benzidin aus Congorot	aerob	0,41	5,59	KW 5/03
	anaerob, Reagenzglas	48,59	4,98	KW 5/03
	anaerob, Vorkultur 1	79,51	7,23	KW 33/03
	anaerob, Vorkultur 2	86,34	5,75	KW 33/03
	anaerob	74,8	5,03	KW 27/03
o-Tolidin aus Direkt Rot 2	anaerob	7,76	7,5	KW 28/03

4.4.4 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den innerhalb eines Arbeitsganges inkubierten und untersuchten Assays. Eine relative Standardabweichung um 5 %, jedoch in jedem Fall unterhalb 10% ist für ein biologisches Testsystem bemerkenswert niedrig.

Voraussetzung für diese Ergebnisse ist eine präzise Arbeitsweise wie unter Ziffer 3.3 geschildert. Auffällig ist die mit 1,38 % außerordentlich niedrige relative Standardabweichung bei der Freisetzung von o-Dianisidin aus Direkt Blau 1. Dieser Wert ist dadurch erklärbar, dass der Farbstoff vollständig durch die Mikroorganismen umgesetzt wurde, vgl. hierzu die Abb. 7. Im Fall einer solchen Freisetzung spielt es keine Rolle mehr, ob

diese in 24 h oder bereits einer kürzeren Zeit erfolgte, die verbleibende Standardabweichung entspricht im wesentlichen den methodischen Schwankungen, die bei der Festphasen-Extraktion zu erwarten ist.

Stellt man die in gleichartigen Versuchen, jedoch in unterschiedlichen Kalenderwochen (z.B. anaerobe Inkubation von Acid Orange 24 in KW 5 und 32) ermittelten Ergebnisse gegenüber, so wird deutlich, dass die Mittelwerte aus verschiedenen Arbeitsgängen nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Der guten intra-day-Reproduzierbarkeit steht somit eine mangelnde inter-day-Reproduzierbarkeit gegenüber. Die Ursachen hierfür werden unter Ziffer 5.1 diskutiert.

4.5 Korrelation zwischen der Substratkonzentration und der Menge des freigesetzten Amins

4.5.1 Theoretische Überlegungen

Die mikrobielle Spaltung von Azofarbstoffen zu primären aromatischen Aminen ist eine enzymatische Reaktion. Der Farbstoff ist dabei das Substrat, das Amin das gebildete Reaktionsprodukt. In den Ansätzen, innerhalb oder außerhalb der Bakterienzellen, ist nur eine begrenzte Menge an Enzym vorhanden.

Bezüglich einer Korrelation zwischen der Substratkonzentration und der Menge des gebildeten Reaktionsprodukts gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

Reicht die Substrat-Menge nicht aus, um das an der Umsetzung beteiligte Enzym vollständig zu binden, besteht also keine Substratsättigung, dann besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration des vorhandenen Substrats und dem Anteil des Enzyms, das tatsächlich Substrat an sich bindet und umsetzt. Die gleiche Proportionalität besteht dann auch zur Reaktionsgeschwindigkeit und zur Menge des gebildeten Produkts.

Im zweiten Fall ist das Substrat in einer so hohen Konzentration vorhanden, dass praktisch das gesamte verfügbare Enzym durch das Substrat gebunden ist und dieses umsetzt. Dieser Zustand wird als Substratsättigung bezeichnet. Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration beeinflusst daher die Menge des gebildeten Produkts nicht mehr.

4.5.2 Durchführung

Es wurden 5 Standard-Assays von *Micrococcus luteus* bereitet, mit linear ansteigenden Mengen an Farbstoff dotiert und unter anaeroben Bedingungen für 24 h inkubiert. Abweichend davon wurde für Crocein Scharlach die Inkubation nach 4 Stunden beendet, indem der Assay auf Kühlschranktemperatur abgekühlt wurde. Tab. 21 gibt eine Übersicht der eingesetzten Farbstoffmengen

Tab. 21

Übersicht der Experimente mit variiertes Substratmenge

Farbstoff	Eingesetzte Mengen [mg]	Arbeitsgang	OD ⁶¹⁰ 1*
Crocein Scharlach	1 – 5	KW 14/03	35,2
	4 – 20	KW 19/03	42,1
Acid Orange 24	1 – 5	KW 14/03	35,2
	2 – 10	KW 19/03	42,1
	4 – 10	KW 25/03	48,7
Acid Red 114	1 – 5	KW 18/03	50,6
	0,2 – 1,0	KW 19/03	42,1
Bismarck Braun	1 – 5	KW 14/03	35,2
	4 – 20	KW 15/03	Kein Wert
Direkt Blau 1	1 – 5	KW 14/03	35,2
	2 – 10	KW 18/03	50,6
	4 – 20	KW 19/03	42,1
Direkt Blau 14	1 – 5	KW 15/03	Kein Wert
	2 – 10	KW 18/03	50,6
	4 – 20	KW 19/03	42,1
	8 – 40	KW 25/03	48,7
Direkt Rot 2	1 – 5	KW 18/03	50,6
	0,2 – 1,0	KW 19/03	42,1
Congorot	0,2 – 1,0	KW 19/03	42,1
	1 – 5	KW 15/03	Kein Wert
Scharlach R	2 – 10	KW 25/03	48,7

^{1*} Optische Dichte (Synonym: Absorption) bei einer Wellenlänge von 610 nm, gemessen in der nach Ziffer 3.3 bereiteten Keimsuspension

Aufarbeitung und Analyse erfolgten wie unter Ziffer 3.4 bis 3.9 geschildert.

4.5.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse für die einzelnen Farbstoffe sind in den folgenden Diagrammen dargestellt:

Tab. 22 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun in Abhängigkeit von der Substratmenge, 1 bis 5 mg, KW 14/03

Eingesetztes Bismarck Braun [mg]	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [μg]	56,2	109,7	168,8	216,7	262,1

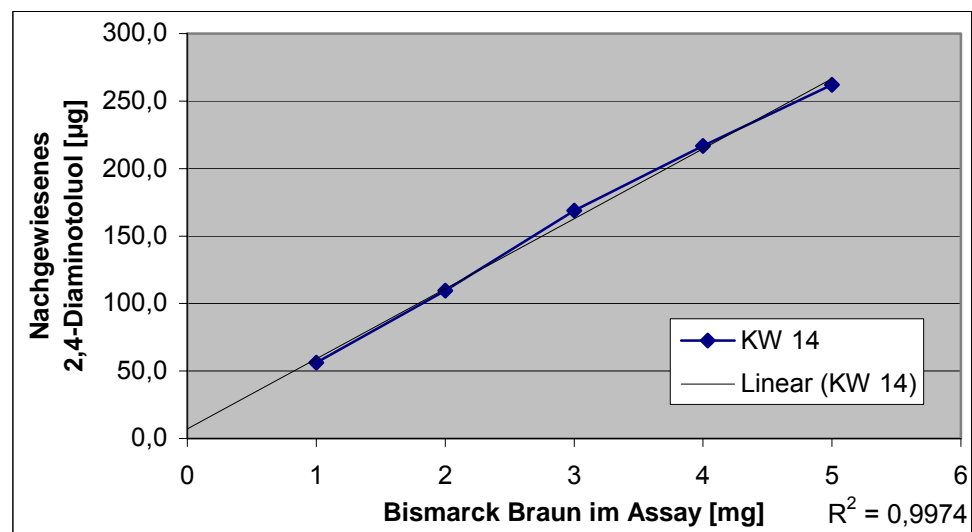


Abb. 12 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun in Abhängigkeit von der Substratmenge, 1 bis 5 mg, KW 14/03

Im Bereich von 1 bis 5 mg Bismarck Braun je Assay steht die freigesetzte Menge an Amin in nahezu idealer linearer Korrelation mit der Menge des eingesetzten Substrates. Im folgenden Versuch wurde daher die Menge an Farbstoff in den Assays deutlich erhöht:

Tab. 23 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun in Abhängigkeit von der Substratmenge, 4 bis 20 mg, KW 15/03

Eingesetztes Bismarck Braun [mg]	4	8	12	16	20
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [μg]	156,4	238,2	344,8	339,7	339,9

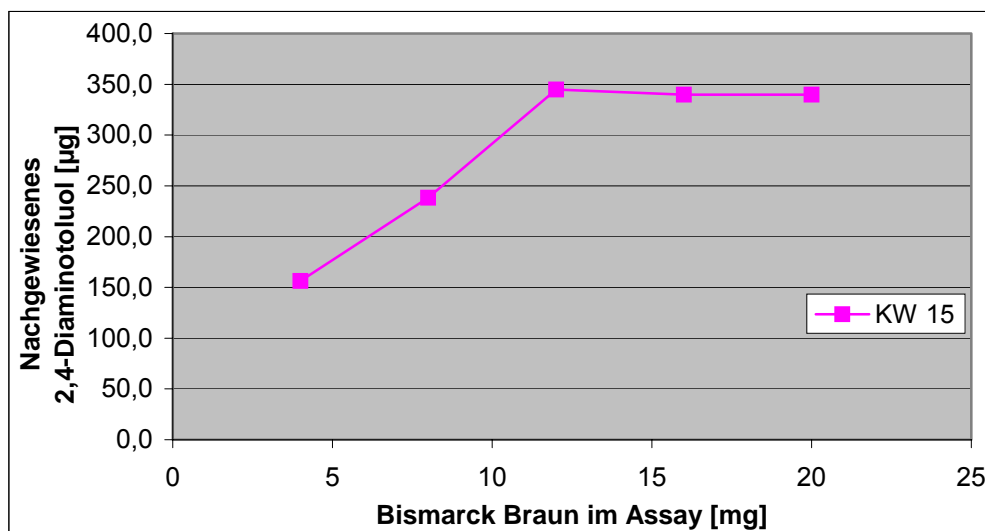


Abb. 13 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun in Abhängigkeit von der Substratmenge, Bereich 4 bis 20 mg

Wiederum steigt im unteren Konzentrationsbereich die Menge des freigesetzten 2,4-Diaminotoluols nahezu linear mit der Menge des eingesetzten Substrats. Ab etwa 12 mg ist eine Sättigung erreicht und die Menge des freigesetzten Amins bleibt bei Einsatz noch höherer Substratmengen nahezu konstant.

In analoger Weise wurden Untersuchungen mit Crocein Scharlach durchgeführt.

Tab. 24 Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus Crocein Scharlach in Abhängigkeit von der Substratmenge

Eingesetztes Crocein Scharlach [mg]	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Nachgewiesenes 4-Aminoazobenzen [µg]	203,76	518,42	697,76	809,30	904,55

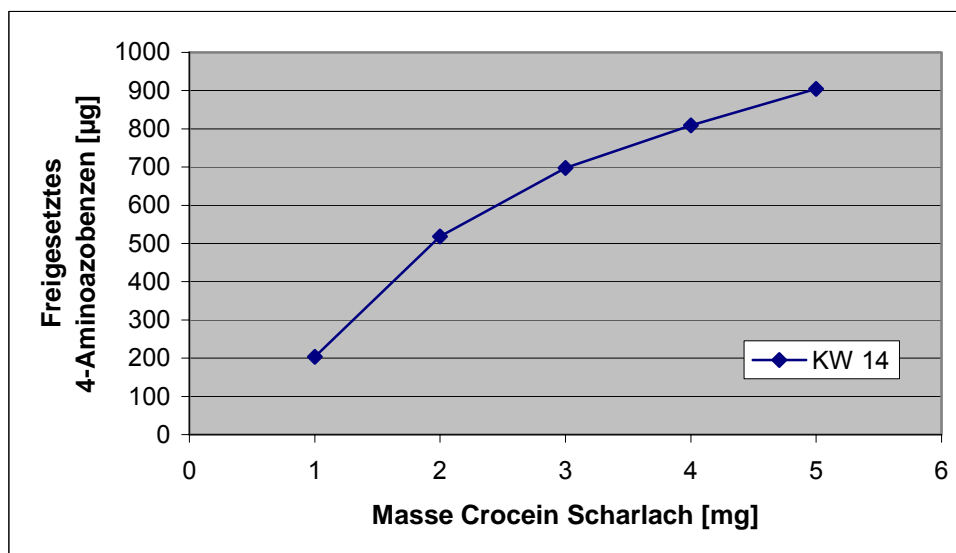


Abb. 14 Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus Crocein Scharlach in Abhängigkeit von der Substratmenge

Wie die Daten in Tab. 24 und Abb. 14 zeigen, steigt mit der Menge an Substrat im Assay auch die Masse des freigesetzten Amins deutlich an, bei weiterer Erhöhung der Substratmenge verläuft der Anstieg aber zunehmend flacher.

Eine solche Annäherung an die Substratsättigung, bei der das Plateau – d.h. eine von einer weiteren Steigerung der Farbstoffmenge weitgehend unabhängige Freisetzung des Amins mit den eingesetzten Farbstoff-Mengen nicht erreicht wurde, findet sich auch bei den Farbstoffen: Acid Orange 24, Direkt Blau 1 und Direkt Blau 14. Die Ergebnisse sind im Anhang D, Tab. D-1 bis D-9, Abb. D-1 bis D-8 wiedergegeben. Auf eine weitere Erhöhung der Farbstoffmenge wurde aus unterschiedlichen Gründen verzichtet: Acid Orange 24 und die ursprünglich verwendete Charge von Direkt Blau 14 standen nur in begrenzter Menge zur Verfügung, bei Direkt Blau 1 kam es bei sehr hohen Einwaagen an Farbstoff zu einer überraschenden Beobachtung, dargestellt in Tab. 25 und Abb. 15:

Tab. 25 Freisetzung von o-Dianisidin aus Direkt Blau 1 in Abhängigkeit von der Substratmenge, Bereich 4 bis 20 mg, KW 18/03

Eingesetztes Direkt Blau 1 [mg]	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
Nachgewiesenes o-Dianisidin [µg]	278,8	513,1	557,2	376,9	156,4

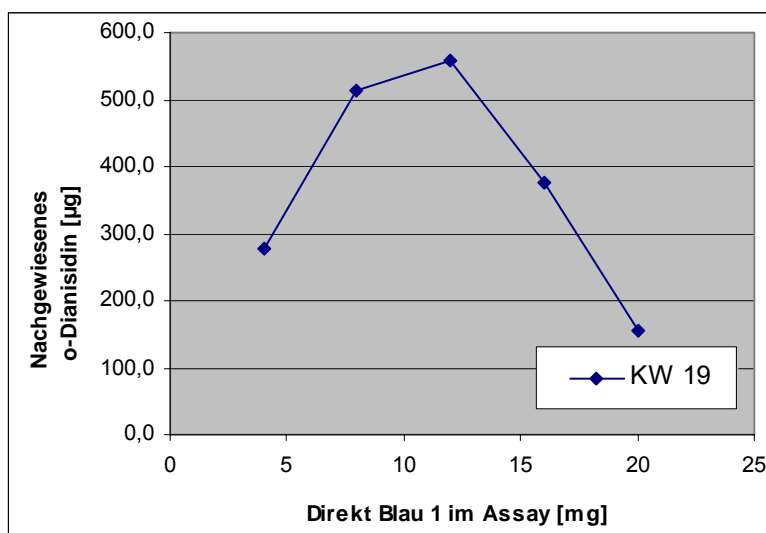


Abb. 15 Freisetzung von o-Dianisidin aus Direkt Blau 1 in Abhängigkeit von der Substratmenge, Bereich 4 bis 20 mg, KW 19/03

Bis zur Menge von 8 Milligramm Farbstoff steigt die Menge des freigesetzten Amins noch deutlich an, bei 12 Milligramm ist die freigesetzte Amin-Menge jedoch nur noch geringfügig höher. Bei weiterer Erhöhung der Farbstoff-Menge bleibt die Menge freigesetzten Amins jedoch nicht etwa konstant, sondern bricht dramatisch ein. Mögliche Gründe dafür werden unter Ziffer 4.5.4 diskutiert. Bei hohen Einwaagen von Crocein Scharlach wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet, dass unter Tab. D-10 und Abb. D-9 in Anhang D wiedergegeben ist.

Auch im Fall des Congorot wurden zur Prüfung auf eine Korrelation zwischen eingesetzter Substratmenge und Menge des freigesetzten Amins zunächst Ansätze mit 1 bis 5 mg Farbstoff bereitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 26 und Abb. 16 dargestellt:

Tab. 26 Freisetzung von Benzidin aus Congorot in Abhängigkeit von der Substratmenge, 1 bis 5 mg, KW 15/03

Eingesetztes Congorot [mg]	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Nachgewiesenes Benzidin [µg]	53,5	51,7	49,9	59,0	52,4

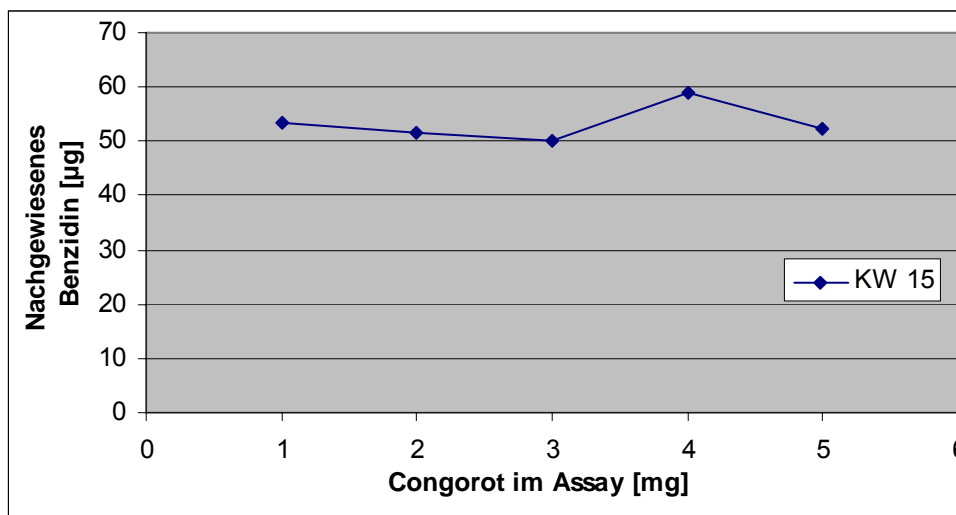


Abb. 16 Freisetzung von Benzidin aus Congorot in Abhängigkeit von der Substratmenge, Bereich 1 bis 5 mg

Im Bereich von 1 bis 5 mg Congorot je Assay blieb die freigesetzte Menge an Benzidin im Wesentlichen konstant (relative Standardabweichung 6,4%). Daher lag die Vermutung nahe, dass bei einer Einwaage von 1 mg und höher für diesen Farbstoff die Substratsättigung bereits erreicht war. In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher Farbstoffmengen von 0,2 bis 1,0 Milligramm eingesetzt (Tab. 27 und Abb. 17):

Tab. 27 Freisetzung von Benzidin aus Congorot in Abhängigkeit von der Substratmenge, 0,2 bis 1,0 mg, KW 18/03

Eingesetztes Congorot [mg]	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Nachgewiesenes Benzidin [µg]	38,7	75,2	98,3	113,1	115,4

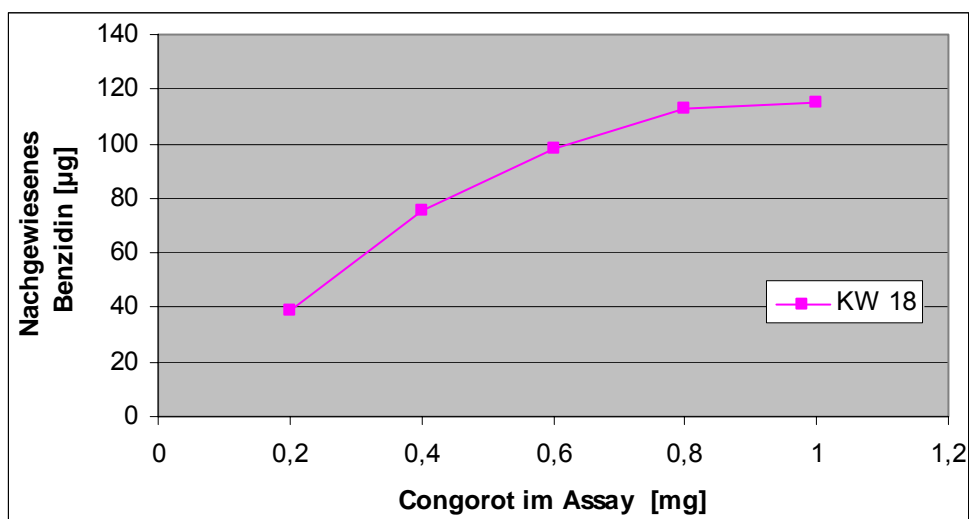


Abb. 17 Freisetzung von Benzidin aus Congorot in Abhängigkeit von der Substratmenge, 0,2 bis 1,0 mg, KW 18/03

Es ist deutlich zu erkennen, wie der Anstieg der Freisetzung flacher wird und im Bereich von 1,0 Milligramm Farbstoff in die Sättigung übergeht. Die Farbstoffe Acid Red 114 und Direkt Rot 2 wiesen ein sehr ähnliches Verhalten auf. Auch hier wurde Substratsättigung schon ab 1 mg Farbstoff im Assay erreicht, bei weiteren Experimente mit Einwaagen von 0,2 bis 1,0 mg Farbstoff je Assay bestand zunächst lineare Korrelation zwischen Substratmenge und Menge an freigesetztem Amin und schließlich Annäherung an die Sättigung. Erkennbar an einem Abflachen der Kurve. Die Ergebnisse sind in Anhang D, Tab. D-11 bis D-14 und Abb. D-10 bis D-13 ff. wiedergegeben.

Am Beispiel des Scharlach R sollte auch für wasserunlösliche Farbstoffe überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen Farbstoff-Menge und Freisetzung des Amins besteht.

Tab. 28 Freisetzung von o-Toluidin aus Scharlach R in Abhängigkeit von der Substratmenge, 2 bis 8 mg, KW 25/03

Eingesetztes Scharlach R [mg]	2,0	4,0	6,0	8,0
Nachgewiesenes o-Toluidin [µg]	3,1	5,6	9,1	11,6

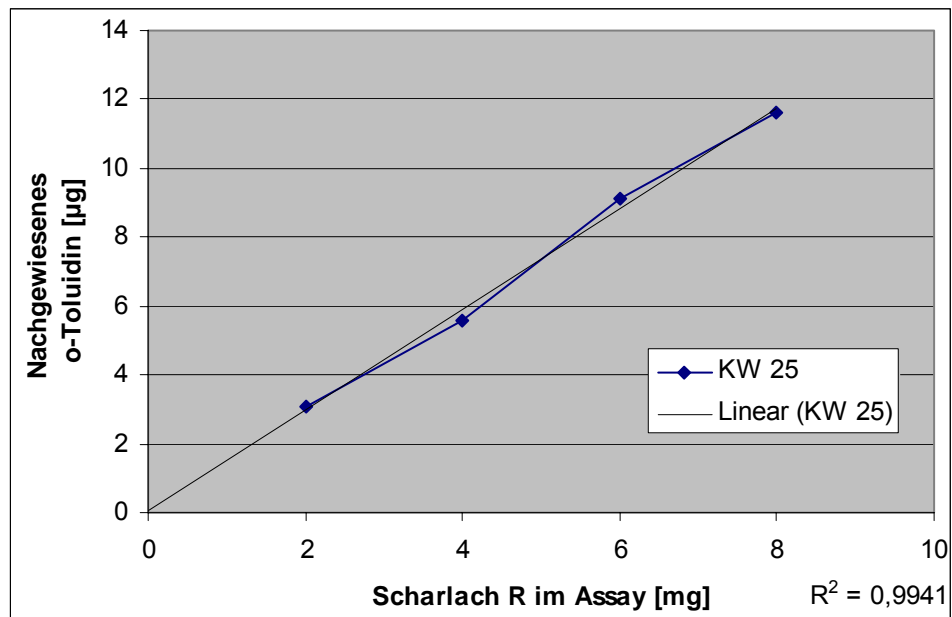


Abb. 18 Freisetzung von o-Toluidin aus Scharlach R in Abhängigkeit von der Substratmenge, Bereich 2 bis 8 mg

Auch für den unlöslichen Farbstoff Scharlach R kann im Bereich von 2 bis 8 mg Farbstoff je Assay eine lineare Korrelation zur Menge des freigesetzten Amins nachgewiesen werden.

4.5.4 Diskussion

Die bei der Inkubation von Assays mit variiertem Farbstoffgehalt erhaltenen Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen den aus den theoretischen Vorbetrachtungen hergeleiteten Erwartungen. Ist nur eine geringe Menge an Farbstoff im Assay vorhanden, die nicht für eine Substratsättigung der Azoreduktasen ausreicht, so besteht eine lineare Korrelation zwischen der Menge des Substrats und der Menge des freigesetzten Amins. Bei der Untersuchung von 8 löslichen und einem wasserunlöslichen Farbstoff konnte im unteren Konzentrationsbereich jeweils ein solches Verhalten gezeigt werden.

Auffällig ist, dass die Farbstoffe Acid Red 114, Direkt Rot 2 und Congorot schon in relativ geringer Konzentration (ca. 1 mg Farbstoff je Assay) die Substratsättigung erreichen: die Kurve, die die Menge des freigesetzten Amins in Abhängigkeit von der Menge des Farbstoffs im Assay darstellt, wird zunehmend flacher, bei weiterer Erhöhung der Farbstoffmenge schwankt die Menge des freigesetzten Amins nur noch im Rahmen einer relativen Standardabweichung, wie sie auch bei der Inkubation mehrerer identischer Ansätze beobachtet wird.

Außer für diese 3 Farbstoffe konnte auch im Fall des Bismarck Braun demonstriert werden, wie sich die Freisetzung des Amins (in diesem Fall: 2,4-Diaminotoluol) bei weiterer Erhöhung der Farbstoff-Konzentration praktisch nicht mehr ändert.

Bei den Farbstoffen Crocein Scharlach, Acid Orange 24, Direkt Blau 1 und Direkt Blau 14 liegt die zur Erreichung einer Substratsättigung notwendige Menge so hoch, dass das Erreichen eines solchen Plateaus, bei dem die Menge freigesetzten Amins von der Farbstoff-Konzentration unabhängig wäre, nicht mehr demonstriert werden konnte:

Im Fall des Acid Orange 24 und des Direkt Blau 14 war der Farbstoff nur in relativ geringen Mengen vorhanden, so dass von weiteren Experimenten mit noch höheren Einwaagen an Farbstoff abgesehen wurde, um auch nach Abschluss der Arbeiten eine Restmenge des verwendeten Farbstoffs als Referenz verfügbar zu haben. Im Fall des Crocein Scharlach und des Direkt Blau 1 wurde eine weitere Beobachtung gemacht: Bei extrem hohen Mengen an eingesetztem Farbstoff kann die Menge des daraus durch Spaltung freigesetzten Amins auch drastisch zurückgehen.

Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass extrem hohe Konzentrationen an Farbstoff evtl. toxisch für die Bakterien sind, ihren Stoffwechsel und somit auch die Azospaltung hemmen. Zwar gibt es keine Literaturangaben, die besagen, dass der ursprüngliche Azofarbstoff (nicht das freigesetzte Amin) für Prokaryonten toxisch sei. Allerdings ist für alle Xenobiotika bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration ein toxischer Effekt zu erwarten. Angesichts der Verunreinigungen der Farbstoffe kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Farbstoff selbst oder eine mögliche Verunreinigung für eine toxische Wirkung auf die Bakterien verantwortlich ist.

4.6 Korrelation der Azospaltung mit der Keimzahl

4.6.1 Theoretische Überlegungen

Werden Bakterien eines Stammes aus einer identischen Vorkultur angezüchtet und die Zellen, die in unterschiedlichen Hauptkulturen gewachsen sind, zu einer homogenen Suspension vereinigt, so kann man erwarten, dass sie sich hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten gleich verhalten. In den unter Ziffer 4.4 beschriebenen Versuchen wurde dokumentiert, dass Assays, die aus der gleichen Zellpopulation bereitet wurden und die gleiche Keimzahl enthielten, zu einer (innerhalb von 5 bis 10 %) Schwankungsbreite gleichen Menge an freigesetztem Amin führen.

Proportional zur Konzentration des Enzyms im Assay sollte auch die Reaktions-Geschwindigkeit steigen, sofern sie nicht durch andere Faktoren, wie zum Beispiel eine Abreicherung des Substrats im Assay beeinflusst wird. Gleichgültig, ob die Azoreduktasen von den Bakterien produziert und an die Umgebung abgesondert werden oder sie sich innerhalb der Zellen befinden, so lange die Bakterien eine einheitliche Stoffwechsel- und Enzymaktivität aufweisen, sollte die Konzentration der Azoreduktasen proportional zur Keimzahl sein.

4.6.2 Durchführung

Abweichend vom unter Ziffer 3.3 angegebenen Standard-Verfahren wurden die aus 2 Hauptkulturen in einem Zentrifugengefäß stammenden Bakterienzellen nicht in 40 ml, sondern lediglich in 20 ml Simulanz aufgenommen. Wiederum wurden alle in diesem Arbeitsgang bereiteten Suspensionen in einem Erlenmeyerkolben vereinigt. Die so erhaltene Suspension wies also ungefähr die doppelte Keimzahl je Volumeneinheit auf, im Vergleich zum standardgemäßen Verfahren.

Es wurden jeweils 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml und 10 ml der Keimsuspension in einen Kolben mit Normschliffstopfen pipettiert. Anschließend wurde die Menge Simulanz zugesetzt, um das Volumen im Kolben auf 10 ml zu erhöhen, dann wurden jeweils 10 ml Farbstoff-Lösung zugesetzt. Das Endvolumen der Assays betrug also wiederum 20 ml.

Bei einigen Versuchen wurde ein Teil der Keimsuspension im Verhältnis 1:10 mit Simulanz verdünnt. Zur Bereitung der Assays wurden 1 ml, 3 ml, 5 ml, 7 ml und 9 ml der verdünnten Keimsuspension eingesetzt. Die Volumina im Assay wurden erneut auf 10 ml ergänzt, bevor 10 ml der Farbstoff-Lösung zugesetzt wurden. Die so erhaltenen Keimzahlen im Assay entsprechen dem Einsatz von 0,1 bis 0,9 ml der konzentrierten Keimsuspension. Tab. 29 gibt einen Überblick über die Experimente mit variierten Keimzahlen, Art und Menge der jeweils eingesetzten Farbstoffe:

Tab. 29 Experimente mit variierten Keimzahlen

Farbstoff,	Volumina der Keimsuspension	Arbeitsgang	Optische Dichte
1 mg Congorot	2 – 10 ml	KW 06/03	36,6
1 mg Congorot	0,1 – 10 ml	KW 07/03	10,44
2 mg Congorot	0,1 – 10 ml	KW 25/03	48,7

4.6.3 Ergebnisse

Tab. 30 Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 06/03

Keimsuspension [ml]	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Nachgewiesenes Benzidin [μg]	24,0	55,6	83,6	98,1	100,4

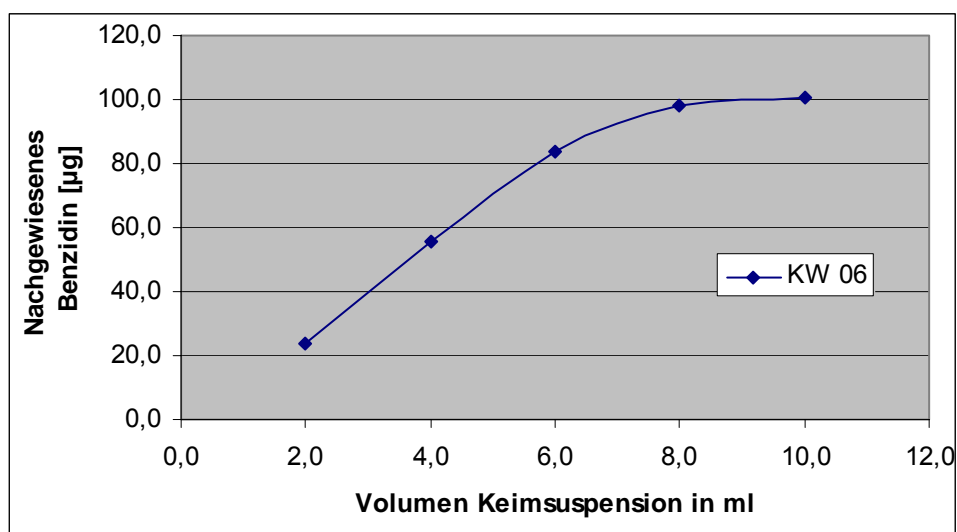


Abb. 19 Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 06/03

Tab. 31 Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 07/03

Keimsuspension [ml]	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Nachgewiesenes Benzidin [μg]	0,71	1,00	14,0	23,7	34,4	40,7	84,9	104,1	105,0	106,1

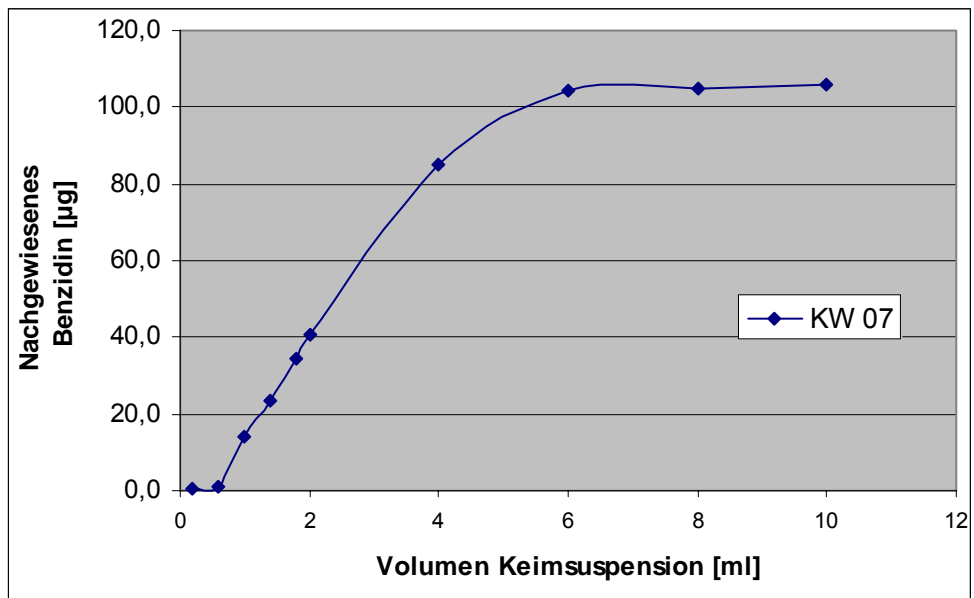


Abb. 20 Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 07/03

Tab. 32 Freisetzung von Benzidin aus 2 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 07/03

Volumen Keim-Suspension [ml]	0,6	1,0	1,4	1,8	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Nachgewiesenes Benzidin [µg]	1,00	14,0	23,7	34,4	40,7	84,9	104,1	105,0	106,1

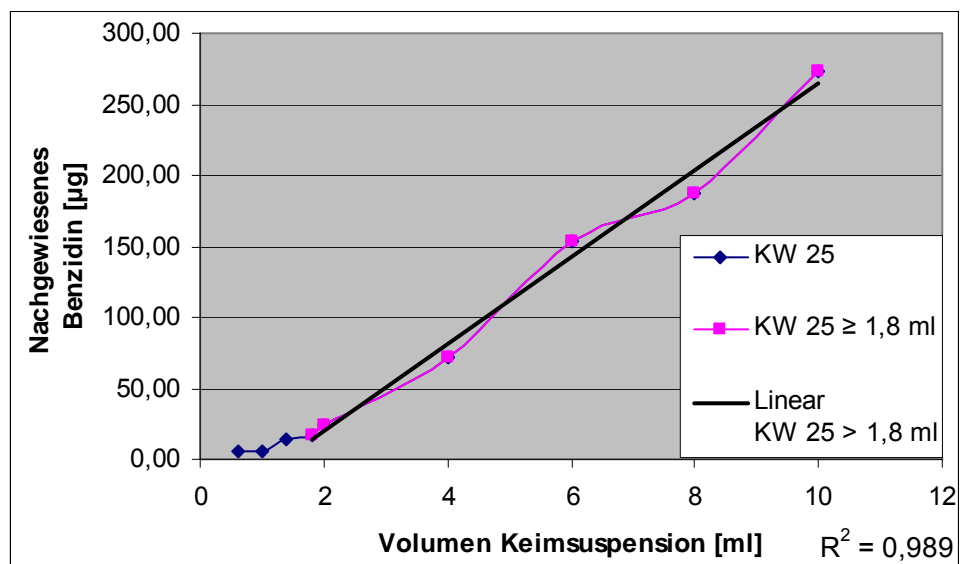


Abb. 21 Freisetzung von Benzidin aus 2 mg Congorot in Abhängigkeit von der Keimzahl, anaerobe Inkubation, KW 25/03

4.6.4 Diskussion

Betrachtet man die Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot im Arbeitsgang KW 06/03, so erkennt man, dass die Menge des freigesetzten Amins zunächst sehr deutlich, evtl. linear mit der Keimzahl ansteigt. Anschließend verflacht die Kurve zunehmend und ab einem Zusatz von 8 ml Keimsuspension hat eine weitere Erhöhung der Keimzahl praktisch keinen Einfluss mehr auf die Menge des nachgewiesenen Amins. Da nur 3 Messpunkte im ungefähr linearen Abschnitt der Kurve lagen, ist eine lineare Korrelation zwischen der Keimzahl und der Menge des freigesetzten Amins noch nicht nachgewiesen.

Daher wurden im darauf folgenden Arbeitsgang KW 07/03 zusätzliche Assays bereitet, die (über einen Vor-Verdünnungsschritt) nur kleine Mengen der ursprünglichen Keimsuspension enthielten. In den Assays mit 0,2 ml und 0,6 ml Keimsuspension wurden nur sehr geringe Mengen des Amins nachgewiesen. Vermutlich waren im Assay Restmengen von Sauerstoff vorhanden, die entweder durch 1 min Stickstoff-Spülung nicht vollständig entfernt wurden oder es diffundieren im Lauf des Versuchs trotz Verwendung eines Normschliff-Stopfens Kleinstmengen von Sauerstoff in den Kolben.

Während sich Spuren von Sauerstoff bei allen bisher durchgeführten Versuchen kaum auf das Ergebnis auswirkten, weil sie von den in großer Zahl anwesenden Bakterien sofort wieder verbraucht wurden, reichen sie bei sehr geringen Keimzahlen aus, um die Bakterien in einer teilweise aeroben Stoffwechsel-Lage zu belassen. Wie unter Ziffer 4.2.4.4 diskutiert, verläuft die Azospaltung entsprechend langsam.

Bei größeren Keimzahlen (von 1,0 ml Keimsuspension an aufwärts) werden evtl. Sauerstoff-Spuren zügig verbraucht, die Bakterien geraten in eine anaerobe Stoffwechsel-Lage und über 6 Messpunkte besteht eine deutliche lineare Korrelation zwischen der Keimzahl im Assay (entsprechend auch der Menge der Azoreduktasen), bevor dieser Anstieg erneut abflacht und ab einem Einsatz von 6 ml Keimsuspension eine weitere Erhöhung der Keimzahlen keinen Einfluss mehr auf die Menge des freigesetzten Amins hat.

Zu einer möglichen Erklärung für das Abflachen der Kurve führt die Beobachtung, dass der 10 ml Keimsuspension enthaltene Assay nach 24 Stunden vollständig entfärbt ist. Bei vollständigem Verbrauch des Substrats Congorot ist aber eine Sättigung der Azoreduktasen mit dem Substrat ganz sicher nicht mehr gegeben:

Zwangsläufig ändert sich im Verlauf einer Inkubation die Menge des im Assay vorhandenen Azofarbstoffs, da dieser durch die Azoreduktasen abgebaut wird. Eine lineare Korrelation zwischen der Keimzahl und der Menge des freigesetzten Amins kann nur dann bestehen, wenn die Menge des Substrats im Assay keinen Einfluss auf den Verlauf der Spaltung hat. Das ist nur bei Substratsättigung der Fall (vgl. Ziffer 4.5). Wird die Sättigungsgrenze unterschritten, sind die Azoreduktasen nicht mehr vollständig mit Substrat beladen und die Azospaltung verlangsamt sich in dem Maß, wie die Konzentration des Substrats im Assay weiter abnimmt.

Die unter Ziffer 4.5.3, Tab. 27 wiedergegebenen Messdaten hatten gezeigt, dass in einem Standard-Assay für Congorot zwischen 0,8 bis 1,0 Milligramm Farbstoff je Assay eine Substratsättigung eintritt. Der Standard-Assay allerdings enthält eine Keimzahl, die dem Einsatz von 5 ml der hier verwendeten konzentrierten Keimsuspension ungefähr vergleichbar wäre, da die Zellen hier in der Hälfte der sonst üblichen Menge Simulanz aufgenommen wurden. Bei höheren Keimzahlen ist damit zu rechnen, dass aufgrund der höheren Menge an vorhandenen Azoreduktasen die Farbstoff-Menge unter die Sättigungsgrenze erniedrigt wird und die Reaktionsgeschwindigkeit im Laufe der Inkubation abnimmt.

Weiterhin muss man berücksichtigen, dass neben der Azospaltung, die das Amin aus dem Farbstoff freisetzt, auch noch weitere Reaktionen stattfinden, innerhalb dessen das Benzidin wieder abgebaut werden kann.

Congorot war nach den unter Ziffer 4.1.2.2 und 4.1.3 geschilderten Untersuchungen als zu 98% rein eingestuft worden. Bei einer vollständigen Umsetzung von 1 mg Congorot wären 250 µg Benzidin zu erwarten. Da jedoch auch der mit 10 ml Keimsuspension inkubierte Assay, der praktisch völlig entfärbt ist, in dem also höchstens Spuren des ursprünglich vorhandenen Farbstoffs vorhanden sind, weit davon entfernt ist, muss offensichtlich eine weitere Reaktion stattgefunden haben, im Verlauf derer das Benzidin zu anderen Verbindungen umgesetzt wird. Ein mikrobieller Abbau von Aminen wurde mehrfach beschrieben, entsprechende Literaturstellen sind unter Ziffer 4.3.1 aufgeführt.

Obwohl Nachweis und Quantifizierung von Metaboliten der aromatischen Amine nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, lassen sich folgende Aussagen über eine solche Metabolisierung treffen:

- sie ist mit hoher Wahrscheinlichkeit enzymatisch vermittelt, da die Amine unter den angewandten Bedingungen (28 °C, wässrige Lösung, pH 6,8) stabil sind,

- als enzymatische Reaktion läuft sie beschleunigt ab, wenn eine größere Anzahl Bakterien und damit auch ein Konzentration an Enzymen präsent ist,
- die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit der Konzentration des Substrats, in diesem Fall Benzidin, im Assay bis sie evtl. ein Maximum erreicht (Substratsättigung).

In den Assays mit hoher Keimzahl verlangsamt sich im Verlauf der Inkubation also nicht nur die Freisetzung des Benzidins, das Amin wird auch zunehmend schneller abgebaut. Laufen beide Reaktionen mit gleicher Geschwindigkeit, wird die Menge bzw. Konzentration des Amins im Assay nicht mehr verändert. Es stellt sich allerdings die Frage, warum bei sehr hohen Keimzahlen die Konzentration des Amins nicht zurückgeht. Eine mögliche Erklärung dafür wird unter Ziffer 5.6 diskutiert.

In einer späteren Versuchsreihe (KW 25/03) wurden Assays mit vergleichbaren Keimzahlen bereitet (Einsatz von 0,2 bis 10,0 ml konzentrierter Keimsuspension), es wurde dabei aber die doppelte Menge an Congorot, nämlich 2 mg eingesetzt. Ausgehend von der Überlegung, dass zur Substratsättigung eines Standard-Assays etwa 1 mg Congorot erforderlich ist und mit 10 ml der konzentrierter Keimsuspension eine Keimzahl in etwa der doppelten Höhe des Standard-Assays erreicht wird, müsste in dieser Versuchsreihe für alle Assays eine Substratsättigung gegeben sein.

Tatsächlich steigt die Menge des freigesetzten Benzidins linear mit der eingesetzten Keim-Suspension an. Aus dieser Betrachtung ausgenommen sind wiederum die Assays mit sehr niedrigen Keimzahlen, die wie bereits geschildert, von Sauerstoff-Spuren beeinflusst werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei fortwährender Substratsättigung eine lineare Korrelation zwischen der Keimzahl und der Menge des freigesetzten Amins besteht. Wird die Sättigungsgrenze unterschritten, verlangsamt sich im Verlauf der Inkubation die Freisetzung des Amins. Zusätzliche, das freie Amin metabolisierende Reaktionen können dazu führen, dass auch vor dem vollständigen Verbrauch des Substrats der Anstieg der Amin-Konzentration zum Stillstand kommt, da während der späteren Zeitabschnitte die gleiche Menge an Amin freigesetzt und wieder abgebaut wird.

4.7 Kinetische Untersuchungen

4.7.1 Theoretische Überlegungen

Die unter Ziffer 4.5 geschilderten Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei der Azospaltung um eine enzymatische Reaktion handelt, die, abhängig von der Substratkonzentration entweder

- unter Substratsättigung verlaufen kann, d.h. bei einer ausreichend hohen Substratkonzentration wird der Fortgang der Reaktion von der begrenzten Menge an Verfügbarkeit des Enzyms begrenzt oder
- ohne Substratsättigung verlaufen kann, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur Menge des vorhandenen Eduktes ist.

Aufgrund der Nährstoffarmut der Simulanz-Lösung kann sowohl eine Vermehrung der Bakterienzellen als auch eine Synthese zusätzlicher Enzyme weitgehend ausgeschlossen werden.

Davon ausgehend lässt sich für die kinetischen Untersuchungen die Erwartung formulieren, dass, vorausgesetzt die Ausgangskonzentrationen an Farbstoff werden hoch genug gewählt, die Freisetzung des Amins mit gleich bleibender Geschwindigkeit, entsprechend einer Kinetik 0. Ordnung erfolgen müsste.

Andererseits liegt bei den hier durchgeführten Experimenten das Enzym nicht frei vor, sondern befindet sich vermutlich innerhalb der Bakterienzelle (vgl. hierzu Ziffer 5.6.3). Das bedeutet, dass der Verlauf der Azospaltung nicht allein durch die Konzentration des Farbstoffs im Assay beeinflusst wird, sondern die folgenden Vorgänge können ebenfalls Einfluss auf die Azospaltung nehmen:

- Diffusion des Farbstoffs durch die Zellwand und Zellmembran bis zum Ort der Umsetzung,
- Freisetzung des Amins aus der Bakterienzelle in das extrazelluläre Medium,
- Änderung der Permeabilität der Membran, dadurch evtl. Beschleunigung der beiden o.g. Vorgänge.

Alle diese Vorgänge können zu einer Abweichung von der Kinetik 0. Ordnung führen. Welcher Art diese Auswirkungen sind, muss anhand der Ergebnisse diskutiert werden.

Hinsichtlich des konkreten Versuchsaufbaus flossen folgende Überlegungen mit ein:

- Da die Konzentration sowohl des Substrats als auch der Enzyme im Assay nachweislich einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Azospaltung hat, darf sie durch die Probeentnahme nicht beeinflusst werden: die Probenahme musste also aus einem homogenen Assay erfolgen – nur wenn Zellen, Flüssigkeit und Farbstoff im gleichen Verhältnis aus dem Assay entfernt werden, bleiben die Konzentrationen im Assay gleich, so dass die Kinetik der Umsetzung nicht durch die wiederholte Probenahme beeinflusst wird,
- wie unter Ziffer 4.2.4.4 diskutiert, hat die Anwesenheit von Sauerstoff einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf der Azospaltung, daher müssen während der Inkubation eines Assays entweder konstant aerobe oder anaerobe Bedingungen herrschen, ein im Versuchsverlauf eintretender Sauerstoffmangel könnte entscheidenden Einfluss auf die Kinetik haben und alle anderen Einflussgrößen überlagern,
- ebenso muss sichergestellt werden, dass bei anaerober Inkubation entweder kein Sauerstoff in den Assay gelangt oder dieser wiederum gründlich entfernt wird.

4.7.2 Durchführung

Die Assays für die kinetischen Untersuchungen wurden gemäß den unter Ziffer 3.2 und 3.3 aufgeführten Arbeitsschritten vorbereitet. Aus den Zellen einer Hauptkultur von *Micrococcus luteus* wurden jeweils 2 Assays vorbereitet.

Die folgenden Tabellen 33 und 34 geben einen Überblick über die Dotierung der Assays mit Farbstoffen. Das Gesamtvolumen der Assays betrug jeweils 20 ml.

Tab. 33 Übersicht über die Dotierung der Assays für kinetische Bestimmungen, Kalenderwoche 45/02

Farbstoff	Menge	Bedingungen
Crocein Scharlach	1 mg	aerob
Crocein Scharlach	1 mg	anaerob
Bismarckbraun	1 mg	aerob
Bismarckbraun	1 mg	anaerob
Congorot	1 mg	anaerob
Direkt Blau 1	1 mg	anaerob
Direkt Blau 14	1 mg	anaerob
Sudanrot G	5 mg	aerob
Sudanrot G	5 mg	anaerob
Scharlach R	5 mg	aerob

Tab. 34 Übersicht über die Dotierung der Assays für kinetische Bestimmungen, Kalenderwoche 30/03

Farbstoff	Menge	Bedingungen
Bismarckbraun	2 mg	aerob
Bismarckbraun	2 mg	anaerob
Bismarckbraun	10 mg	anaerob
Direkt Blau 1	2 mg	anaerob
Direkt Blau 1	10 mg	anaerob
Direkt Blau 14	1 mg	anaerob
Congorot	1 mg	anaerob

Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 4 ml Suspension aus dem Assay entnommen, in ein Zentrifugengefäß überführt und sofort im Eisbad gekühlt.

Bei den ersten kinetischen Untersuchungen wurden die anaeroben Inkubationen noch in 40 ml Vials mit Schraubverschluss durchgeführt. Ein Vorteil hierbei war, dass die Probe mit Hilfe einer Kanüle, die durch das Septum gestochen wurde, entnommen werden konnte, ein Öffnen des Gefäßes also nicht notwendig war. Allerdings kam es trotz reziproker Schüttlung im Verlauf der Inkubation zur Sedimentation der Zellen.

Bei weiteren Untersuchungen zur Kinetik wurden die anaeroben Inkubationen in Erlenmeyerkolben mit Normschliff-Stopfen durchgeführt. Eine Sedimentation der Mikroorganismen wurde auf diese Weise vermieden, die anaeroben Versuchsbedingungen mussten nach Entnahme der Probe durch erneutes 1minütiges Spülen mit Stickstoff wiederhergestellt werden. Tabelle 35 gibt einen Überblick über die Zeiten der Probenahme in beiden Arbeitsgängen:

Tab. 35 Zeitpunkt der Probenahme bei den kinetischen Untersuchungen

Arbeitsgang	Probenahme # nach Stunden			
	#1	#2	#3	#4
KW 45/02	2	4	8	24
KW 30/03	4	8	16	21

4.7.3 Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen

Tab. 36 Verlauf der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeit [h]		2	4	8	24
Nachgewiesenes o-Anisidin [μg]	Kolben 1	0,94	1,80	4,18	11,52
	Kolben 2	0,83	1,46	2,96	7,92

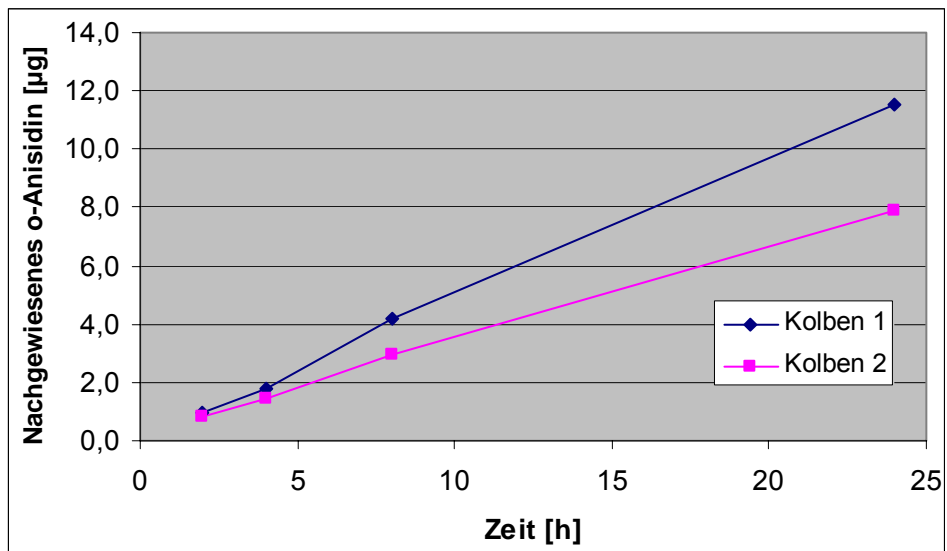


Abb. 22 Verlauf der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Tab. 37 Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 2	2 - 4	4 - 8	8 - 24
Freigesetztes o-Anisidin [µg/h]	Kolben 1	0,471	0,428	0,595	0,459
	Kolben 2	0,413	0,317	0,375	0,310

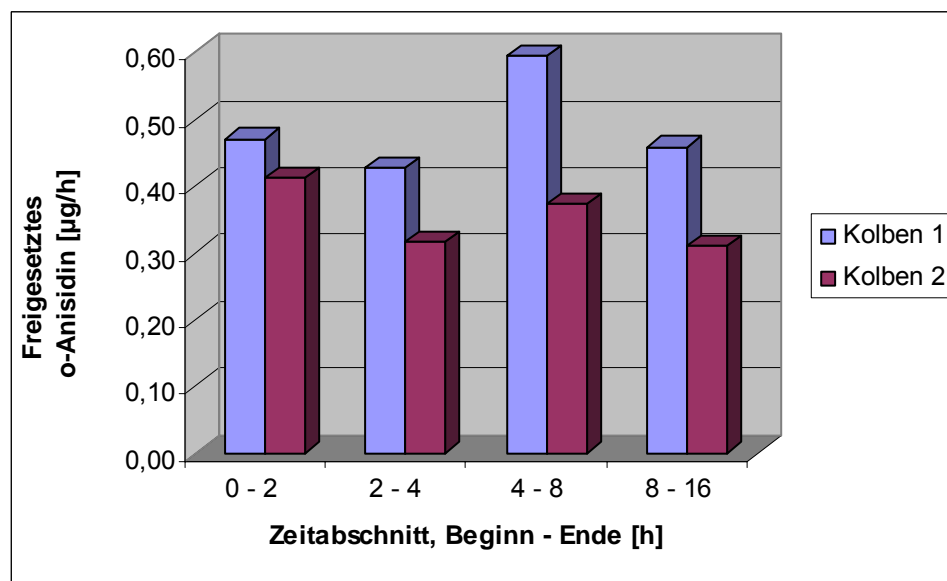


Abb. 23 Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Die Freisetzung von o-Anisidin aus Sudanrot G unter aeroben Bedingungen verläuft offenbar nach einer Kinetik 0. Ordnung, die Geschwindigkeit bleibt im Wesentlichen über den gesamten Zeitraum konstant.

Tab. 38 Verlauf der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeit [h]		2	4	8	24
Nachgewiesenes o-Anisidin [μg]	Kolben 1	0,25	1,73	6,55	40,5
	Kolben 2	0,37	1,53	8,16	35,6

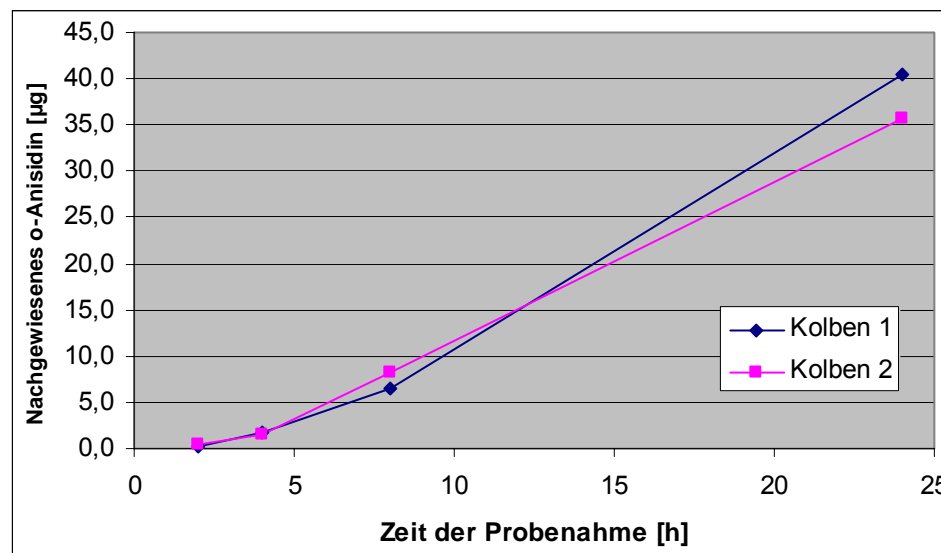


Abb. 24 Verlauf der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Tab. 39 Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 2	2 - 4	4 - 8	8 - 24
Freigesetztes o-Anisidin [$\mu\text{g/h}$]	Kolben 1	0,124	0,740	1,206	2,125
	Kolben 2	0,187	0,576	1,658	1,715

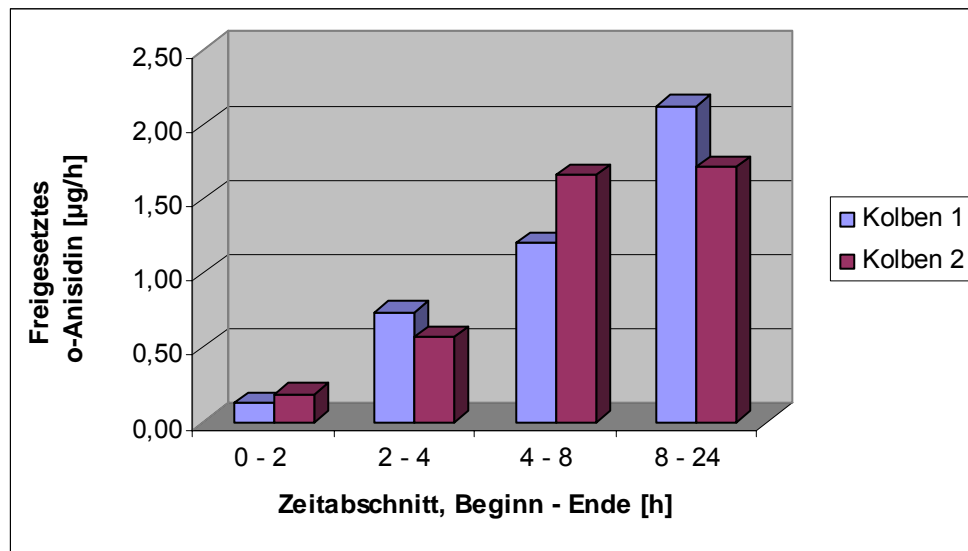


Abb. 25 **Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Anisidin aus 5 mg Sudanrot G, anaerobe Bedingungen, KW 45/02**

Unter anaeroben Bedingungen werden bei der Inkubation von Sudanrot G nicht nur deutlich größere Mengen an o-Anisidin freigesetzt – die Geschwindigkeit der Freisetzung nimmt im Verlauf der Inkubation auch deutlich zu.

Weitere Beispiele für eine entsprechende Kinetik sind:

- anaerobe Freisetzung von o-Dianisidin aus 1 mg Direkt Blau 1, KW 45/02
- anaerobe Freisetzung von o-Dianisidin aus 10 mg Direkt Blau 1, KW 30/03
- anaerobe Freisetzung von o-Tolidin aus 1 mg Direkt Blau 14, KW 45/02
- anaerobe Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot, KW 45/02
- anaerobe Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot, KW 30/03

Die entsprechenden Daten und Diagramme sind in Anhang E wiedergegeben.

Voraussetzung für einen entsprechenden Verlauf scheint eine ausreichend hohe Menge an Substrat zu sein, d.h. die Konzentration des Substrats im Assay sollte entweder nicht signifikant abnehmen bzw. nicht unter die Sättigungsgrenze erniedrigt werden.

Ist keine dieser Bedingungen erfüllt, so sinkt die Geschwindigkeit, mit der das Amin freigesetzt wird. Ein Beispiel dafür ist die anaerobe Freisetzung von o-Dianisidin aus Direkt Blau 1, durchgeführt in der 30. Kalenderwoche 2003:

Tab. 40 Verlauf der Freisetzung von o-Dianisidin aus 2 mg Direkt Blau 1, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeit [h]		4	8	16	21
Nachgewiesenes o-Dianisidin [μg]	Kolben 1	14,1	66,5	277,4	338,2
	Kolben 2	9,3	39,1	256,1	321,3

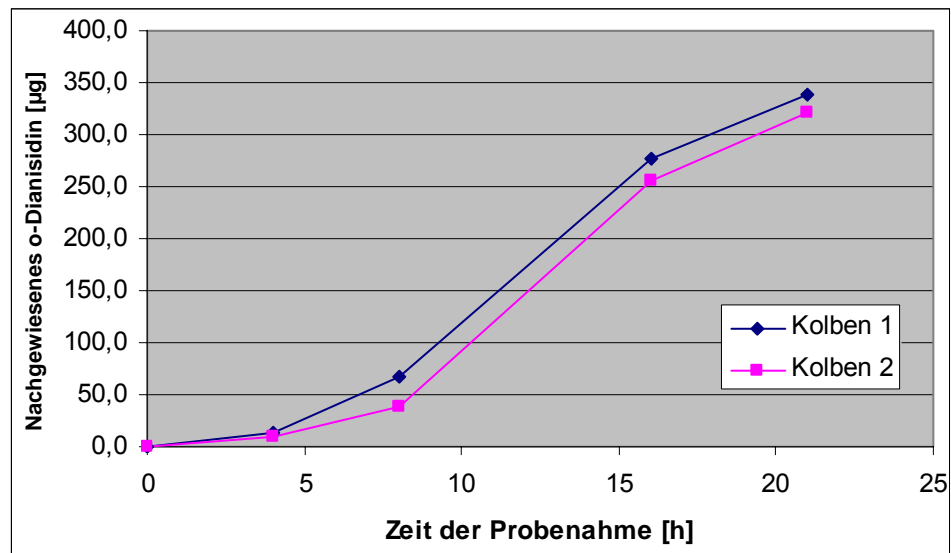


Abb. 26 Verlauf der Freisetzung von o-Dianisidin aus 2 mg Direkt Blau 1, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Tab. 41 Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Dianisidin aus 2 mg Direkt Blau 1, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 4	4 - 8	8 - 16	16 - 21
Freigesetztes o-Dianisidin [$\mu\text{g}/\text{h}$]	Kolben 1	3,53	13,09	26,36	12,17
	Kolben 2	2,34	7,43	27,13	13,04

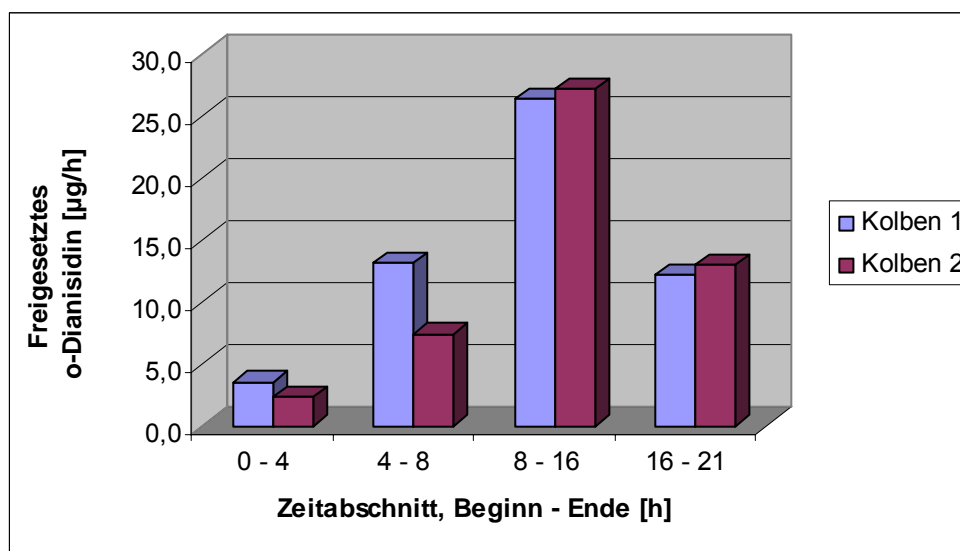


Abb. 27 **Geschwindigkeit der Freisetzung von o-Dianisidin aus 2 mg Direkt Blau 1, anaerobe Bedingungen, KW 30/03**

Bei dem eben gezeigten Experiment nimmt gegen Ende des Versuchs zwar die Reaktions-Geschwindigkeit ab, die Konzentration des Amins steigt aber bis zuletzt an.

o-Dianisidin ist, wie unter Ziffer 4.3 gezeigt, relativ inert gegen eine weitere Metabolisierung. Wie aber verhalten sich oxidationsempfindliche Amine wie das 2,4-Diaminotoluol?

Tab. 42 **Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 1 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 45/02**

Zeit [h]		2	4	8	24
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [µg]	Kolben 1	0,10	1,29	1,55	1,59
	Kolben 2	0,28	1,22	1,73	1,10

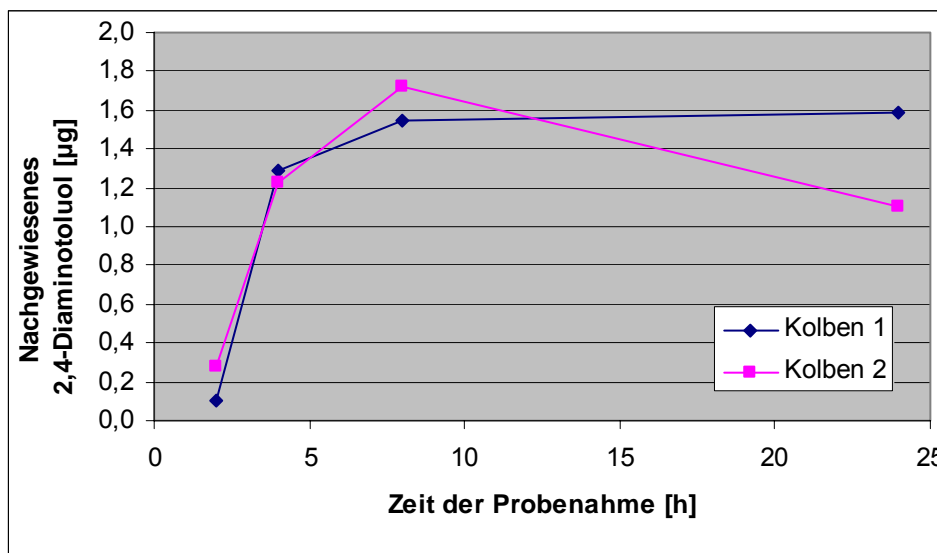


Abb. 28 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 1 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Tab. 43 Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 1 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 2	2 - 4	4 - 8	8 - 24
Freigesetztes 2,4-Diaminotoluol [µg/h]	Kolben 1	0,052	0,591	0,065	0,002
	Kolben 2	0,138	0,473	0,126	-0,039

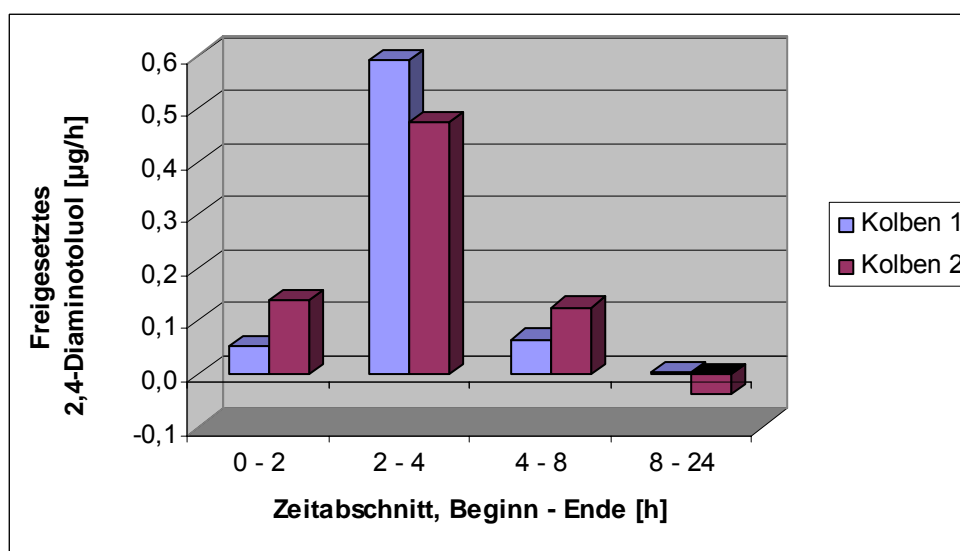


Abb. 29 Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 1 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 45/02

Bei der aeroben Inkubation von Bismarckbraun steigt die Geschwindigkeit der Freisetzung des oxidationsempfindlichen 2,4-Diaminotoluols zunächst an, im weiteren Verlauf nähert sich die Konzentration des Amins im Assay einem Fließgleichgewicht bzw. ist in Kolben 2 sogar leicht rückläufig. Mögliche Erklärung dafür ist, dass mit der Zunahme der Amin-Konzentration auch die Geschwindigkeit des oxidativen Abbaus zunimmt. Laufen im Idealfall die Freisetzung des Amins aus dem Farbstoff und der oxidative Abbau mit gleicher Geschwindigkeit ab, so ist das Fließgleichgewicht erreicht.

In der KW 30/03 wurden weitere kinetische Untersuchungen zur aeroben Inkubation von Bismarck Braun durchgeführt, jedoch mit anderen Zeiten der Probenahme und einer Menge von 2 mg Farbstoff im Assay.

Tab. 44 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeit [h]		4	8	16	21
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [μg]	Kolben 1	2,647	3,225	4,383	4,991
	Kolben 2	2,025	3,163	4,339	3,741

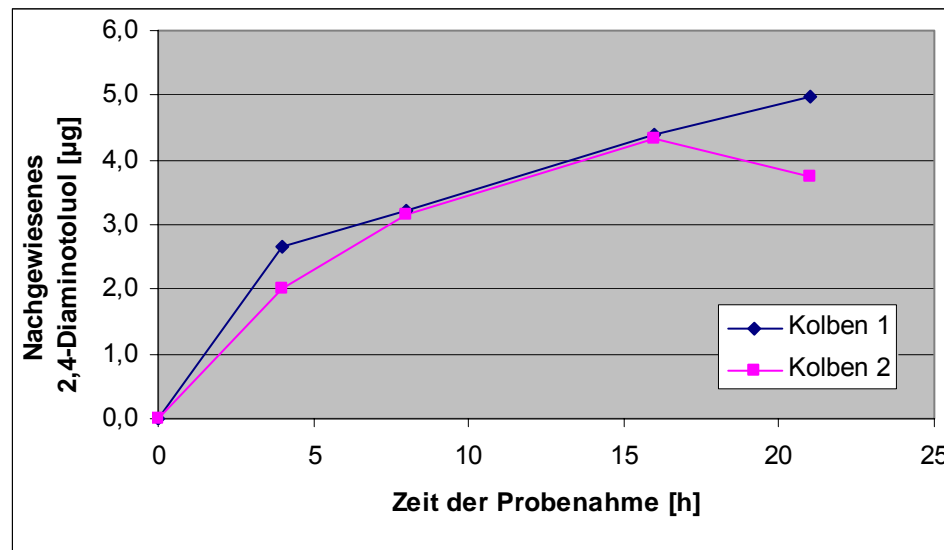


Abb. 30 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 30/03

Tab. 45 **Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 30/03**

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 – 4	4 – 8	8 - 16	16 - 21
Freigesetztes 2,4-Diaminotoluol [$\mu\text{g/h}$]	Kolben 1	0,662	0,145	0,145	0,122
	Kolben 2	0,506	0,284	0,147	-0,120

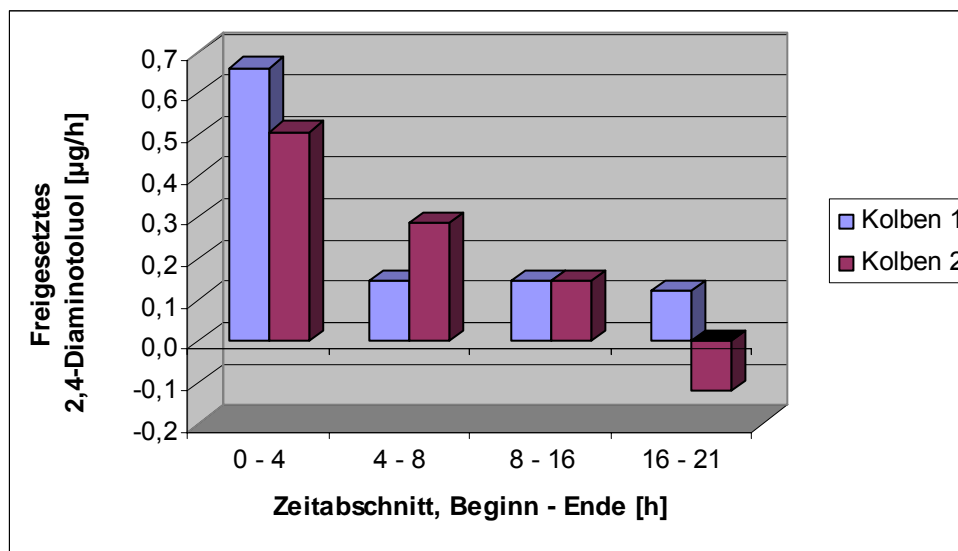


Abb. 31 **Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, aerobe Bedingungen, KW 30/03**

Vergleicht man die aeroben Inkubationen von KW 45/02 und 30/03, so fällt auf, dass die Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol in KW 30/03 zu höheren Mengen des Amins im Assay am Ende der Inkubation führte (4,9 μg und 3,7 μg in KW 30/03 im Vergleich zu 1,6 μg und 1,1 μg in KW 45/02). Das kann einerseits Folge der höheren (doppelten) Menge an Substrat zu Beginn der Inkubation sein, zum anderen wiesen die Mikroorganismen in KW 30/03 eine insgesamt stärkere Aktivität ihrer Azoreduktasen auf (das wird aus dem Vergleich bei weiteren Inkubationen deutlich: kein vollständiger Abbau von 1 mg Direkt Blau in KW 45/02, aber vollständiger Abbau von 2 mg des gleichen Farbstoffs in KW 30/03). Dennoch lässt die Kinetik der aeroben Inkubationen des Bismarck Brauns auch Gemeinsamkeiten erkennen:

Die Menge des 2,4-Diaminotoluols im Assay nimmt jeweils im Zeitraum zwischen 0 und 4 Stunden am stärksten zu, anschließend verläuft der Anstieg langsamer, im letzten Zeitabschnitt wird jeweils in einem der Assays auch ein Rückgang der Menge des Amins beobachtet.

Die Anwesenheit von Sauerstoff hat, nach den unter Ziffer 4.2 und 4.3 geschilderten Untersuchungen die Freisetzung des 2,4-Diaminotoluols aus dem Farbstoffs verlangsamt, den weiteren Abbau des Amins jedoch beschleunigt. Welcher Kinetik folgt die Freisetzung des gleichen Amins unter anaeroben Bedingungen?

Tab. 46 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeit [h]		4	8	16	21
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [μg]	Kolben 1	51,8	114,9	170,5	136,3
	Kolben 2	41,7	80,1	136,8	132,2

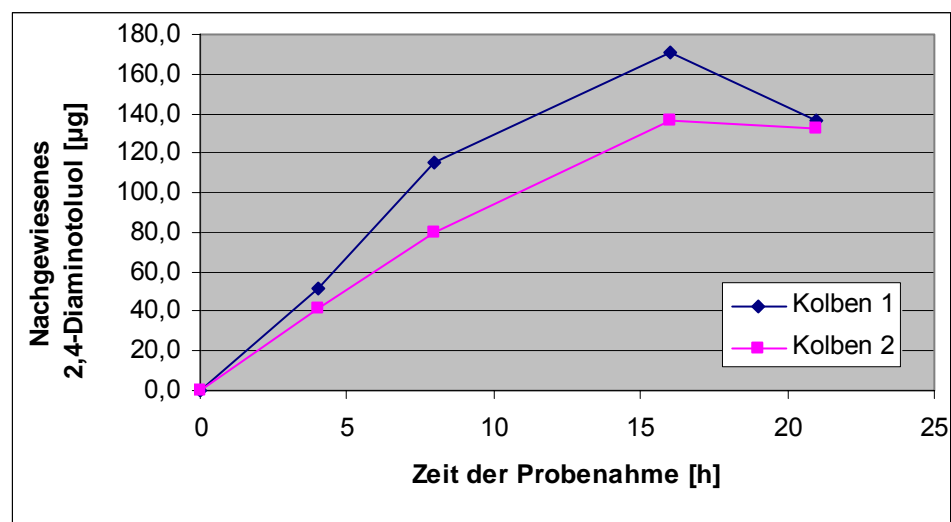


Abb. 32 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Tab. 47 Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 1 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 4	4 - 8	8 - 16	16 - 21
Freigesetztes 2,4-Diaminotoluol [$\mu\text{g}/\text{h}$]	Kolben 1	12,94	15,79	6,95	-6,85
	Kolben 2	10,41	9,61	7,09	-0,91

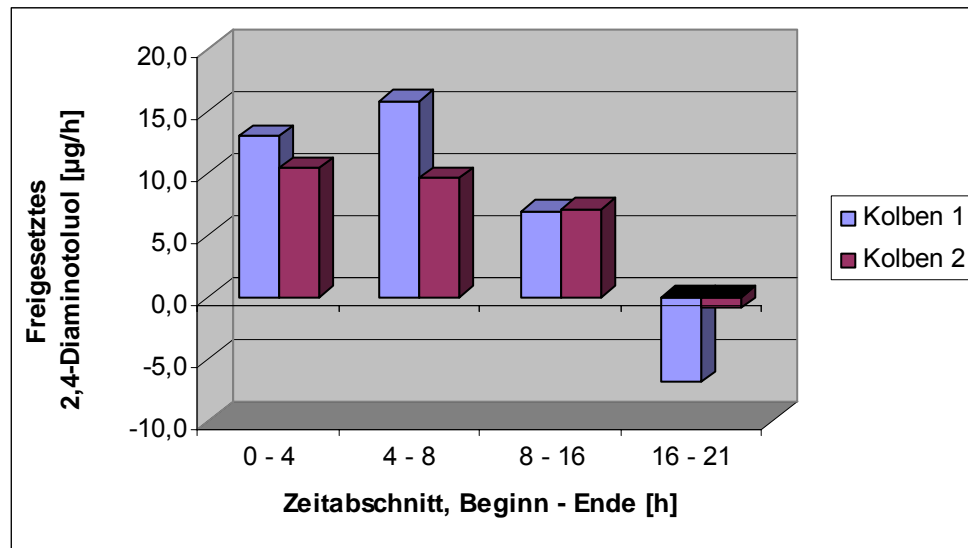


Abb. 33 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 2 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Bei der anaeroben Inkubation von 2 mg Bismarck Braun in KW 30/03 wurde über die ersten 8 Stunden keine signifikante Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet. Deutlich ist jedoch, dass im Zeitraum der zwischen 8 und 16 Stunden die Freisetzung bereits deutlich verlangsamt ist und nach 16 Stunden die Menge an Amin im Ansatz sogar rückläufig ist. Da ein Großteil des Farbstoffes umgesetzt war (erkennbar an der Entfärbung des Assays) ging die Geschwindigkeit der Freisetzung zurück. Gleichzeitig ist damit zu rechnen, dass die Geschwindigkeit des Abbaus des vergleichsweise oxidationsempfindlichen 2,4-Diaminotoluols mit der Konzentration des Amins zunimmt. Gegen Ende der Inkubation wurde im gleichen Zeitabschnitt eine größere Menge an Amin abgebaut als noch freigesetzt wurde, das Ergebnis ist eine rückläufige Konzentration im Assay.

Was aber, wenn die Ausgangsmenge an Substrat so hoch gewählt wird, dass während der gesamten Inkubation Substratsättigung besteht? Im Fall des Direkt Blau 1, das zu o-Dianisidin gespalten wird, wurde während der gesamten Inkubation eine unvermindert schnelle bzw. sich beschleunigende Freisetzung des Amins beobachtet. Welche Kinetik wird beobachtet, wenn es sich bei dem freigesetzten Amin um das oxidationsempfindliche 2,4-Diaminotoluol handelt?

Tab. 48 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 10 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeit [h]		4	8	16	21
Nachgewiesenes 2,4-Diaminotoluol [μg]	Kolben 1	72,5	133,2	319,7	275,3
	Kolben 2	59,3	119,3	316,7	306,2

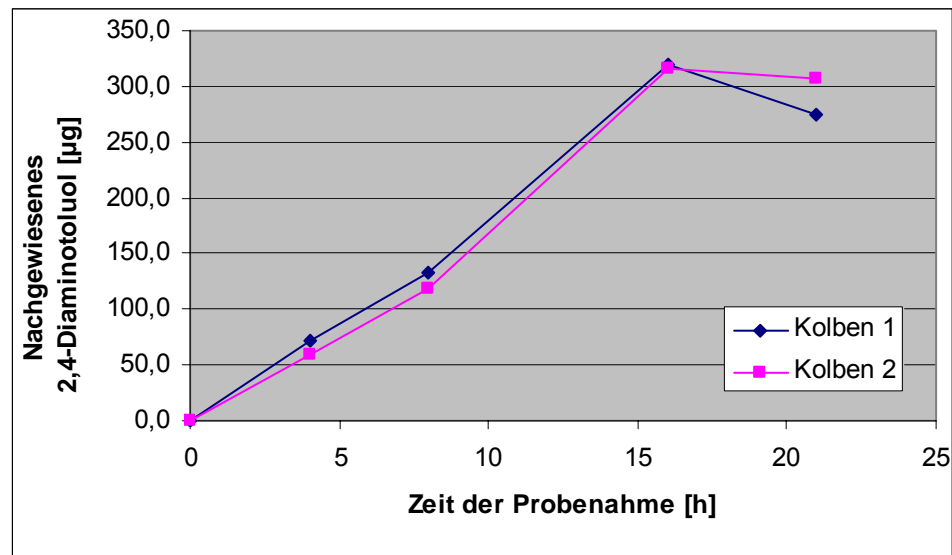


Abb. 34 Verlauf der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 10 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Tab. 49 Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 10 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03

Zeitraum, Beginn-Ende [h]		0 - 4	4 - 8	8 - 16	16 - 21
Freigesetztes 2,4-Diaminotoluol [$\mu\text{g}/\text{h}$]	Kolben 1	18,1	15,2	23,3	-8,9
	Kolben 2	14,8	15,0	24,7	-2,1

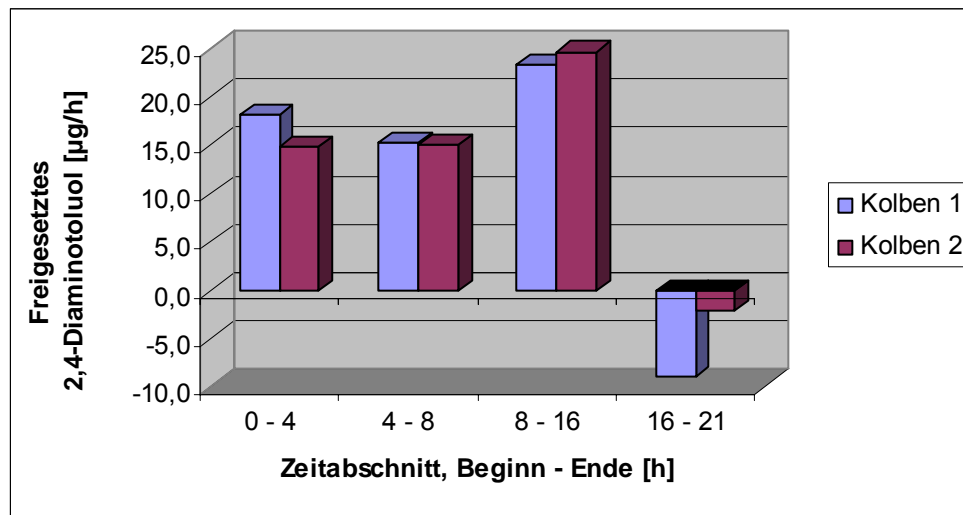


Abb. 35 **Geschwindigkeit der Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus 10 mg Bismarck Braun, anaerobe Bedingungen, KW 30/03**

Bei der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Inkubation von Ansätzen mit 10 mg Bismarck Braun kommt es erwartungsgemäß zu einer sehr viel schnelleren Freisetzung des Amins, auch die erreichte Konzentration des 2,4-Diaminotoluols im Assay ist deutlich höher.

Innerhalb der ersten 4 Stunden ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit nur geringfügig. Im Zeitraum von 8 bis 16 Stunden verläuft die Freisetzung für beide Kolben mit deutlich gesteigerter Geschwindigkeit.

Dieser Trend wird in den letzten 5 Stunden der Inkubation aber radikal umgekehrt, überraschend kommt es zu einem Rückgang der Konzentration an 2,4-Diaminotoluol und das obwohl, nach der Färbung der Assays zu urteilen, bis zuletzt eine hohe Menge des Substrats Bismarck Braun im Assay vorhanden war. Eine mögliche Erklärung findet sich bei näherer Betrachtung der Chromatogramme: bei relativ hohen Retentionszeiten (etwa 39,4 min) erscheint ein bislang unbekannter Peak, der weder durch das Amin, den Farbstoff oder seine Begleitsubstanzen verursacht wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Metaboliten 2. Ordnung, ein Kupplungsprodukt der Oxidationsprodukte untereinander oder mit dem Amin selbst. Die Bildung solcher Metaboliten wurde bereits von Parris et al.²⁹ bei hohen Konzentrationen des Amins und seiner Oxidationsprodukte beschrieben.

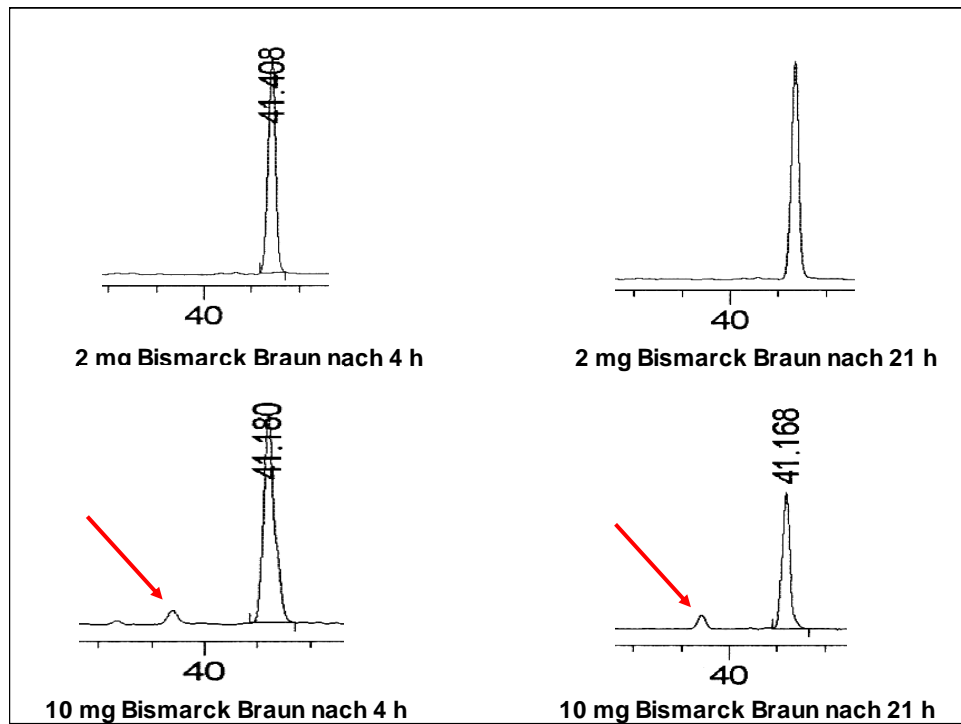


Abb. 36 Vergleich der Chromatogramme nach Inkubation von 2 mg bzw. 10 mg Bismarck Braun für 4 h und 21 h

Der intensive Peak bei 41,1 min repräsentiert jeweils den Inneren Standard 3,3'-Dichlorbenzidin. Die roten Pfeile markieren den Peak einer unbekanntes Verbindung, der nur bei Inkubation von 10 mg Farbstoff im Assay beobachtet wird.

Wenn eine Bildung solcher Metaboliten 2. Ordnung tatsächlich stattfindet, dann unterliegt sie grundsätzlich einer Kinetik 2. Ordnung und die Geschwindigkeit einer solchen Reaktion nimmt überproportional mit der Konzentration der daran beteiligten Stoffe (Amin und Metaboliten 1. Ordnung) zu. Damit lässt sich erklären, warum im letzten Zeitabschnitt eine Reaktion einsetzte, die das Amin so rasch verbraucht, dass seine Konzentration trotz immer noch unverminderter Freisetzung aus dem in ausreichender Menge vorhandenen Farbstoff rückläufig ist.

Einen Sonderfall stellt die Kinetik der Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus Crocein Scharlach dar:

Tab. 50 Verlauf der Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus 1 mg Crocein Scharlach, aerobe und anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeit [h]		2	4	8	24
Nachgewiesenes 4-Aminoazobenzen [μg]	aerob 1	6,3	12,7	62,8	5,2
	aerob 2	9,4	12,7	79,2	7,2
	anaerob 1	40,2	93,3	74,0	0,0
	anaerob 2	59,7	106,5	88,6	0,0

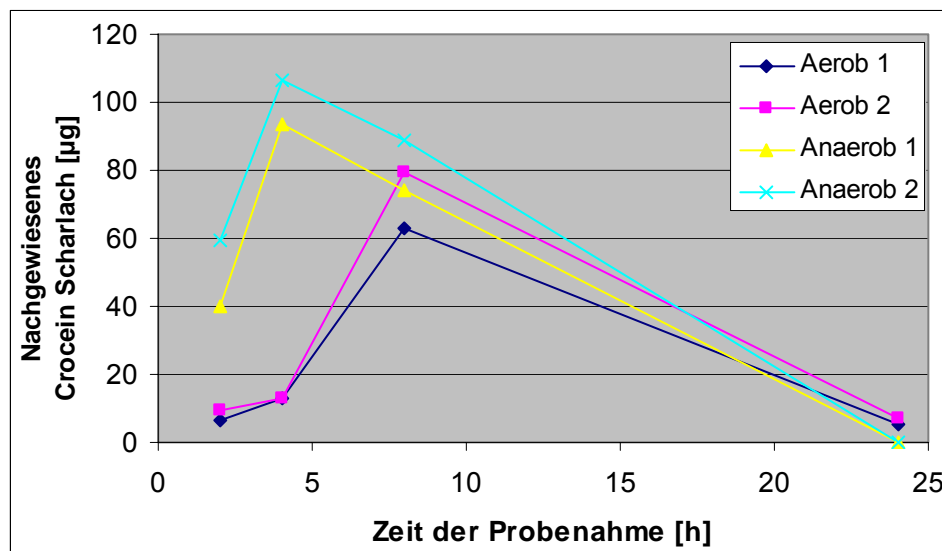


Abb. 37 Verlauf der Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus 1 mg Crocein Scharlach, aerobe und anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Tab. 51 Geschwindigkeit der Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus 1 mg Crocein Scharlach, aerobe und anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Zeit [h]		0 - 2	2 - 4	4 - 8	8 - 24
Freigesetztes 4-Aminoazobenzen [$\mu\text{g}/\text{h}$]	aerob 1	3,15	3,21	12,52	-3,60
	aerob 2	4,70	1,67	16,61	-4,50
	anaerob 1	20,12	26,55	-4,84	-4,62
	anaerob 2	29,85	23,40	-4,48	-5,54

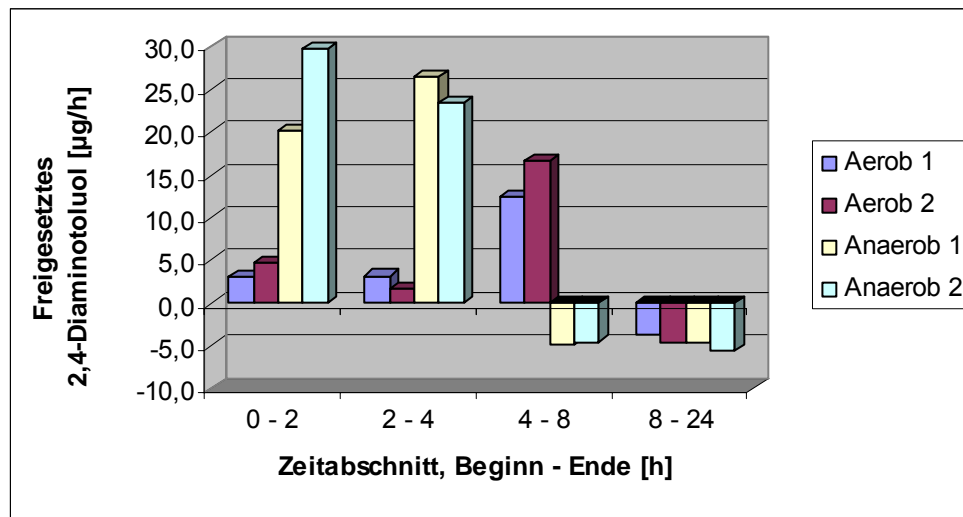


Abb. 38 Geschwindigkeit der Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus 1 mg Crocein Scharlach, aerobe und anaerobe Bedingungen, KW 45/02

Unter anaeroben Bedingungen wird der Farbstoff Crocein Scharlach deutlich schneller gespalten, die Konzentration seines Spaltproduktes 4-Aminoazobenzen erreicht bereits nach 4 Stunden das Maximum. Bei der Inkubation unter aeroben Bedingungen wird die maximale (gemessene) Konzentration nach 8 Stunden erreicht, sie liegt außerdem unter den Maximalwerten, wie sie für die anaerobe Inkubation gemessen wurden.

Im weiteren Verlauf der Inkubation nimmt die Konzentration an 4-Aminoazobenzen in beiden Fällen wieder ab, nach 24 Stunden ist das Amin in den anaeroben Ansätzen nicht mehr nachweisbar, in den aeroben Ansätzen wird noch eine kleine Restmenge gefunden.

4.7.4 Diskussion

Die kinetischen Untersuchungen haben gezeigt, dass der gleichmäßige Anstieg der Amin-Konzentration im Assay, die Kinetik 0. Ordnung einen Sonderfall darstellt, der nur in den wenigsten Fällen beobachtet wird. Am ehesten entspricht die aerobe Freisetzung von o-Anisidin aus Sudanrot G dieser Modellvorstellung. Das hierbei freigesetzte Amin ist dabei relativ unempfindlich gegenüber weiterer Metabolisierung.

Aerobe Inkubationen von Bismarck Braun, bei denen das oxidationsempfindliche Amin 2,4-Diaminotoluol gebildet wird, führen dagegen zu Freisetzungskurven bei denen sich die Amin-Konzentration asymptotisch einem Grenzwert nähert – bzw. bei der die effektive Rate der Neubildung desamins gegen 0 sinkt und gegen Ende des Versuchs die Amin-Konzentration sogar leicht rückläufig sein kann.

Auch unter anaeroben Bedingungen spielt die Oxidationsempfindlichkeit dieses Amins offensichtlich eine Rolle. Wird z.B. der Farbstoff vollständig aufgebraucht, wie es bei der Inkubation der 2 mg Assays im Juli 2003 der Fall war, hört damit die Neubildung des Amins auf, so ist die Konzentration des 2,4-Diaminotoluols im letzten Zeitabschnitt rückläufig.

Dass bei den zuvor durchgeführten Versuchen (ebenfalls unter anaeroben Bedingungen) im November 2002 die Konzentration des 2,4-Diaminotoluols bis zuletzt anzusteigen scheint, kann zum einen daran liegen, dass die Umsetzung langsamer erfolgte, die Phase der abfallenden Konzentration also innerhalb der 24 h nicht erreicht wurde, zum anderen kann dieser Eindruck auch in Folge der unterschiedlichen Zeiten der Probenahme entstehen: möglicherweise war die Amin-Konzentration in einem Zeitraum von $t > 16$ h rückläufig, dies konnte aber nicht erfasst werden, da zum Zeitpunkt $t = 16$ h keine Probenahme erfolgte.

Überraschend war jedoch, dass auch bei der Inkubation von Assays mit 10 mg Bismarck Braun die Konzentration des freigesetzten Amins im letzten Zeitabschnitt rückläufig war. Erwartet wurde, dass in Anbetracht des großen Angebots an Substrat bis zuletzt Substratsättigung bestehen sollte und die Amin-Konzentration im Assay entweder ansteigen oder aber (infolge von einer weiteren Metabolisierung des Amins) sich einem Fließgleichgewicht hätte nähern sollen.

Offensichtlich war aber die Konzentration an Amin so weit angestiegen, dass damit auch der Abbau-Prozess stark beschleunigt wurde. In den Chromatogrammen der jeweiligen Proben finden sich außerdem deutliche Hinweise, dass die Oxidationsprodukte untereinander oder mit dem Amin selbst Kopplungsreaktionen eingegangen sind. Als Folge dessen wird das Amin nunmehr schneller verbraucht als neu gebildet und seine Konzentration im Assay fällt.

Bei der Inkubation eines 2 mg Assays von Direkt Blau 1, der gegen Ende des Versuchs vollständig entfärbt war, in dem also die Konzentration des Substrats gegen Ende signifikant vermindert war, entspricht die zuletzt abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit den theoretischen Erwartungen.

Wird dem Assay dagegen eine ausreichende Menge an Substrat zugesetzt, so steigt bei anaerober Inkubation die Reaktionsgeschwindigkeit in den meisten Fällen an, so geschehen bei der anaeroben Inkubation von Sudanrot G, Direkt Blau 1 und 14, Congorot und Scharlach R. Für diese Beschleunigung der Azospaltung sind zahlreiche Erklärungen denkbar, die sich durch zusätzliche Experimente auf Plausibilität prüfen ließen, vgl. hier zu den Ausblick, Ziffer 5.3.

Mit der Ausnahme einiger Freisetzungen von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun wies jedoch die nach 24 Stunden (bzw. bei den Versuchen in der 30. Kalenderwoche 2003 die abschließende, nach 21 h) gezogene Probe die höchste Konzentration an Amin auf. Eine Versuchsdauer von 24 h, die anfangs eine Konventionmethode darstellte, kann also aufgrund der Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen als ein zur Verbesserung von Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit geeignetes Vorgehen bezeichnet werden. Auch im Fall des 2,4-Diaminotoluols ist der Rückgang seiner Konzentration nicht so gravierend, dass er eine Änderung im Versuchsablauf erforderlich machen würde.

Die einzige gravierende Ausnahme von dieser Regel soll im Folgenden betrachtet werden:

Die Freisetzung von 4-Aminoazobenzen aus Crocein Scharlach unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Kinetik grundlegend von allen anderen hier untersuchten Farbstoffen und Aminen. Der Grund dafür liegt offensichtlich darin, dass 4-Aminoazobenzen seinerseits eine Azo-Verbindung darstellt, die durch Azoreduktasen gespalten werden kann. Unter anaeroben Bedingungen wird deshalb nicht nur das Crocein Scharlach schneller gespalten, auch der Abbau des 4-Aminoazobenzens vollzieht sich schneller und gründlicher, so dass es nach 24 h nicht mehr nachweisbar ist. Bei einer solchen Spaltung von 4-Aminoazobenzen sollte ein entsprechendes Spaltprodukt nachweisbar sein. Tatsächlich nach Aufarbeitung dieser Proben in den Chromatogrammen ein zuvor nicht beobachteter Peak einer relativ polaren Verbindung (Retentionszeit etwa 12 min). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Peak um Anilin. In Abb. 66 ist der Peak mit einem blauen Pfeil markiert. Er ist bereits nach 4 h Stunden Inkubation erkennbar, nach 24 h jedoch ungleich intensiver. Der violette Pfeil markiert den Peak des Farbstoffs Crocein Scharlach, nach 4 h noch deutlich, nach 24 h nur in Restmengen vorhanden. 4-Aminoazobenzen (oranger Pfeil) erscheint nach 4 h mit einem deutlichen Peak, nach 24 h ist es nicht mehr nachweisbar. Der grüne Pfeil markiert jeweils den Inneren Standard 3,3'-Dichlorbenzidin.

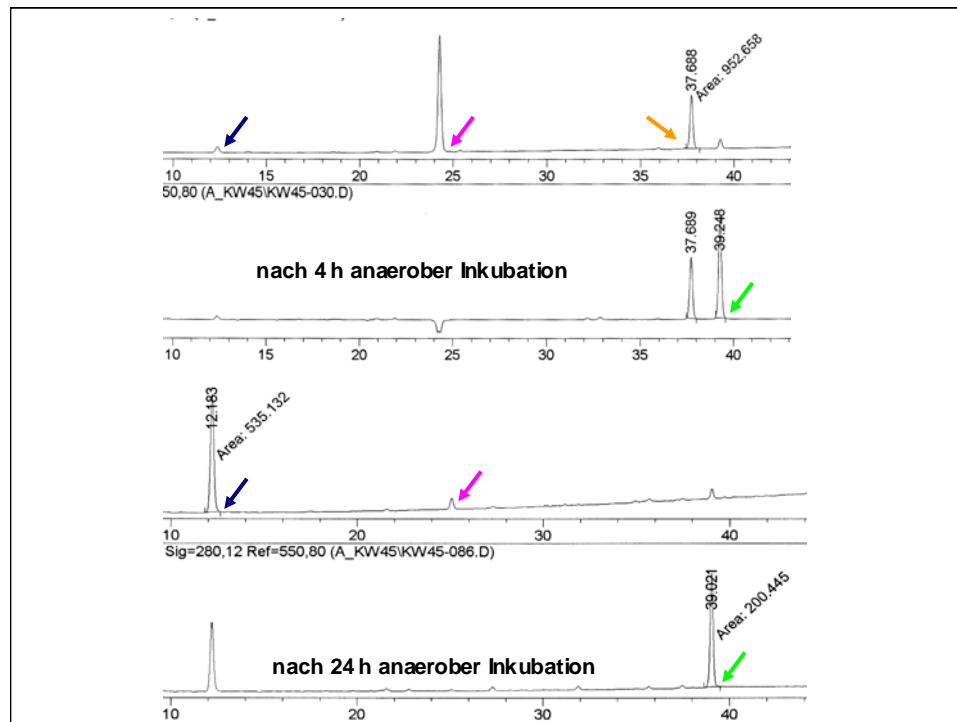


Abb. 39 Chromatogramme nach 4 h und 24 h anaerober Inkubation von Crocein Scharlach.

Als weiteres Spaltprodukt wäre theoretisch das p-Aminophenol zu erwarten. Dieses ist jedoch aufgrund seiner extremen Oxidationsempfindlichkeit sowie seines amphoteren, die Festphasen-Extraktion erschwerenden Charakters (bei pH 10,0 wird die phenolische Gruppe z.T. deprotoniert, d.h. in die ionische Form überführt, was die Affinität zu unpolaren Sorbens deutlich herabsenkt) vermutlich nicht mehr nachweisbar.

Eine praktische Folgerung aus diesen Messergebnissen war, dass bei weiteren Inkubationen von Farbstoffen, die evtl. 4-Aminoazobenzen freisetzen konnten, die Inkubation im aeroben Milieu nach 8 Stunden und im anaeroben Milieu nach 4 Stunden durch Kühlung auf 4 °C beendet wurde.

Vergleicht man beide Möglichkeiten der Durchführung einer anaeroben Inkubation, so lässt sich feststellen, dass der Einsatz von Kolben mit Normschliff die gegen Störungen robustere Versuchsanordnung darstellt und zu besser reproduzierbaren Resultaten führt, erkennbar z.B. an der geringeren Schwankungen zwischen den Ergebnissen der Doppelbestimmung bei der Inkubation der Direkt Blau Farbstoffe. Dennoch sind die Ergebnisse beider Arbeitsgänge häufig miteinander vergleichbar (vgl. die häufige Beobachtung einer sich beschleunigenden Azospaltung unter anaeroben Versuchsbedingungen), so dass auch die Resultate der in der 45. Kalenderwoche 2002 angewandten Technik als ausreichend valide angesehen werden können, um hier vorgestellt und diskutiert zu werden. Nachteilig bei der Verwendung von Kolben mit

Normschliff ist die Tatsache, dass bei jeder Probenahme erneut Sauerstoff in das Gefäß tritt und anschließend wiederum mit Inertgas vertrieben werden muss, was zu einem deutlich höheren Verbrauch an Stickstoff führte.