



**Beiträge des Instituts für Umweltsystemforschung  
der Universität Osnabrück**

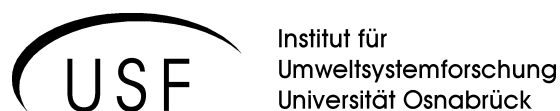
**Herausgeber: Prof. Dr. Michael Matthies**

**Beitrag Nr. 44**

**Analyse von Koffein  
als Abwassermarker  
in Fließgewässern**

**Jan Priegnitz**

**April 2007**



**ISSN Nr. 1433-3805**

Herausgeber

Prof. Dr. Michael Matthies  
Universität Osnabrück  
Institut für Umweltsystemforschung  
Barabarastr. 12

D-49069 Osnabrück

Tel. 0541/ 969 - 2576/2575

Fax. 0541/ 969 - 2599

e-mail: Matthies@usf.Uni-Osnabrueck.DE

Internet: <http://www.usf.Uni-Osnabrueck.DE>

©® USF - Institut für Umweltsystemforschung, Universität Osnabrück

## ***Inhalt***

1	Problemstellung.....	6
2	Sichtung bisheriger Arbeiten.....	7
2.1	Geschichtliches und Aktuelles zum Konsumverhalten.....	7
2.2	Vorkommen in Lebensmitteln.....	9
2.3	Metabolisierung im menschlichen Körper.....	9
2.4	Abbauprozesse in der Umwelt.....	10
2.5	Abbauprozesse in der Kläranlage.....	12
2.6	Wirkung auf die aquatische Fauna.....	12
3	Methodik.....	13
3.1	Probenahme.....	13
3.2	Probenvorbereitung.....	13
3.3	Ansetzen des internen Standards (IS) und des Wiederfindungsstandards (WS).....	14
3.4	Festphasenextraktion.....	17
3.5	Gaschromatographie-Massenspektrometer.....	21
3.6	Methodenvalidierung.....	23
4	Berechnungen.....	25
4.1	Berechnung der Konzentration im Effluent.....	25
4.2	Berechnung des Anteils ungeklärter Abwässer.....	25
5	Eigenheiten des Untersuchungsgebietes.....	26
5.1	Der Fluss.....	26
5.2	Das Kanalnetz.....	26
5.3	Die Abwasserbehandlung.....	27
6	Ergebnisse.....	29
6.1	Auswertung der Wochenmischproben.....	30
6.2	Ergebnisse des Screenings und aus der fließenden Welle.....	31
6.3	Variabilität der täglichen Frachten.....	33
7	Diskussion.....	39
7.1	Langfristige Konzentrationsänderungen (zu Kapitel 6.1).....	41
7.2	Kurzfristige Konzentrationsänderungen (zu Kapitel 6.2).....	41
7.3	Mittelfristige Änderungen und Eignung als Marker (zu Kapitel 6.3).....	41
8	Ausblick.....	42
9	Zusammenfassung.....	43
10	Danksagung.....	45
11	Literatur.....	46

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Koffeingehalte einiger Getränke [Ärzteblatt] .....	9
Tabelle 2: Eliminationshalbwertszeiten in Stunden im Plasma des Menschen .....	10
Tabelle 3: Abbauraten bei Photo- und Biodegradation aus der Literatur .....	11
Tabelle 4: Löslichkeit von Koffein in verschiedenen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen Temperaturen .....	14
Tabelle 5: mittlere Koffeinkonzentration in den Wochenmischproben vom 14.11.05 - 01.01.06.....	30
Tabelle 6: Statistik für die Werte von Durchfluss, Konzentration und Fracht.....	33
Tabelle 7: Liste der flussaufwärts in die Hase einleitenden Kläranlagen (EW: Einwohner)...	37
Tabelle 8: Übersicht über verschiedene Studien zu Koffein.....	40

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Titelblatt der '[Women's petition] against coffee' von 1674 .....	8
Abbildung 2: Strukturformel von 1,3,7-Trimethylxanthin.....	15
Abbildung 3: Abweichung und Variationskoeffizient für verschiedene Gerätschaften zum Pipettieren.....	16
Abbildung 4: Aufbau der SPE für die Schritte 5-13 .....	20
Abbildung 5: Temperaturverlauf im Ofen .....	21
Abbildung 6: Änderung der Spannung des Elektronenvervielfachers über 21 Autotunes .....	22
Abbildung 7: Ausschnitt des Chromatogramms der Probe aus der Hase flussaufwärts (3) vom 26.09.06.....	24
Abbildung 8: Legende für die Bezeichnung der Variablen und die Symbole in den Diagrammen.....	25
Abbildung 9: Flussabschnitt der Hase und Aufstellungsort der beiden automatischen Probenehmer.....	28
Abbildung 10: Koffeinkonzentration in den Wochenmischproben 14.11.05 - 01.01.06.....	30
Abbildung 11: Konzentrationsverlauf in der fließenden Welle über die Fließdauer .....	32
Abbildung 12: Konzentrationsverlauf 26.09.06 - 08.10.06 (Legende in Abb. 8).....	34
Abbildung 13: Verlauf der Frachten 26.09.06 - 08.10.06 (Legende in Abb. 8).....	34
Abbildung 14: Korrelation zwischen dem Durchfluss $Q$ und der Fracht $L$ .....	35
Abbildung 15: Temperatur- und Niederschlagswerte im Untersuchungsgebiet .....	36
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Niederschlag OS und effektiver Elimination, in der Hase flussaufwärts $I$ .....	38
Abbildung 17: Korrelation zwischen Niederschlag und dem Anteil ungeklärter Abwässer $f$ . 38	

„It is difficult for a modern scientist to convey anything of the spirit of excitement of research through a paper in a journal, since editors of these journals necessarily require nothing but the bare bones of the argument.“<sup>1</sup>

R. J. Magee in: Selected Readings in Chromatography [Magee]

### ***Verzeichnis der verwendeten Abk.***

Abk.	Abkürzungen
CAS	Chemical Abstract Service
EC	Effektkonzentration
EGW	Einwohnergleichwerte
EPA	Environmental Protection Agency
EW	Einwohner
GC	Gaschromatographie
GGK	Gewässergüteklasse
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Ionenchromatographie
IS	interner Standard
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
KG	Körpergewicht
LC	Letale Konzentration
LD	Letale Dosis
OS	Osnabrück
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	persönliche Mitteilung
SIM	Selected Ion Monitoring Mode
SPE	Festphasenextraktion
VK	Variationskoeffizient
WS	Wiederfindungsstandard

---

<sup>1</sup> Die grau unterlegten Fußnoten a, b, c... befinden sich in einer Grauzone wissenschaftlicher Praxis. Sie sind nicht offizieller Bestandteil dieser Arbeit und nur als Supplement erhältlich. Sie enthalten fakultative Informationen (z.B. Kommentare zur Literatur, Etymologisches) oder dienen der Zerstreuung. Zudem gibt es ein separates Verzeichnis mit Sekundärliteratur aus dem Internet. Bei Interesse wenden Sie sich bitte an den Autor [jan.priegnitz@uos.de](mailto:jan.priegnitz@uos.de)

## 1 Problemstellung

Trinkwasser ist eine knapper werdende Ressource. Infolge von Desertifikation in den Subtropen und forciert durch den zunehmenden Bevölkerungsdruck wird vermehrt auf Ressourcen zurückgegriffen, die für eine Trinkwasserversorgung kaum geeignet sind. Häufig stellen fäkale Abwässer ein Problem dar. So kommt es jedes Jahr zu rund 4 Mrd. Durchfallerkrankungen, dabei sterben 2,5 Mio. Menschen [EAWAG]. Nach Angaben der [WHO] werden jährlich 250 Mio. Erkrankungen gemeldet, sie spricht sogar von 10 Mio. Toten, die Hälfte sind Kinder unter 5 Jahren (siehe Exkursion nach Malawi in Kapitel 8).

In der EU-Wasserrahmen-[Richtlinie] heißt es:

„Wasser ist keine übliche Handelsware, sondern ein ererbtes Gut, das geschützt, verteidigt und entsprechend behandelt werden muss.“

Wenn eine Kontamination vermindert werden soll, muss zuerst der Status quo gemessen werden.

Bei der Identifizierung einer Kontamination in Umweltmedien ist auch die Klärung des Ursprungs wichtig. Nur so können wirkungsvoll Gegenmaßnahmen eingeleitet werden. Diese Gegenmaßnahmen sind meist effektiver, wenn sie am Ursprung angreifen, anstatt bei der großräumigen Verteilung in verschiedenen Umweltmedien.

In dieser Arbeit geht es um die Quantifizierung einer Kontamination von Wasserkörpern mit fäkalen Abwässern anthropogenen Ursprungs anhand der Koffeinkonzentration.

An einen Marker werden allgemein folgende Ansprüche gestellt: Für eine bestimmte Belastung sollte er eindeutig deren Ursprung aufzeigen und eine Quantifizierung ermöglichen.

Ob ein Marker auch persistent sein soll, hängt von der Fragestellung ab. Soll nur eine Kontamination aus der näheren Vergangenheit ermittelt werden, sollte er es nicht sein.

Bisher wurden für fäkale Abwässer vor allem bakterielle Indikatoren wie *Escherichia coli* herangezogen. Diese haben den Nachteil, dass sie

- wenig spezifisch für eine Belastung sind (so können sie nicht zwischen tierischen und menschlichen Faeces unterscheiden),
- im aufnehmenden Gewässer eine relativ kurze Lebensdauer haben und somit wenig konservativ sind (falls dies gewünscht wird) und
- einige Zeit brauchen, um auf Änderungen der Kontamination zu reagieren.

Neuere Techniken wie PCR könnten diese Zeit verkürzen, sind aber noch nicht robust genug. Ferner wurden die Bakterien auch in Gewässern nachgewiesen, die kaum vom Menschen beeinflusst waren. Zudem ist der bakterielle Test aufwendig, da die Kolonie bildenden Einheiten erst nach 18-24 Stunden ausgezählt werden können [Ogunseitán].

Nun hat Koffein am meisten Aufmerksamkeit auf sich gezogen [Glassmeyer et al.].

Es zählt zu den am häufigsten nachgewiesenen Substanzen in Wasserproben. Bei [Barber et al. 2] war es die häufigste von 22 Substanzen, bei [Kolpin et al.] die vierthäufigste von 95 Substanzen.

Koffein gehörte zu einer relativ kleinen Gruppe von Substanzen, die sich durchgängig in den gereinigten Abwässern von Kläranlagen feststellen lassen. So lagen in den Effluents der drei größten schwedischen Kläranlagen nur 25 von 137 untersuchten Substanzen stets in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze vor, im Effluent der Göteborger Kläranlage nur 5 von 117 - Koffein war aber jedes Mal mit dabei (aus: [Prösch et al.]).

[Barber et al. 1] konnten es sogar an der am weitesten stromaufwärts gelegenen Stelle ihres Untersuchungsgebietes (nur 10 km hinter mehreren Quellen, Ödland in 2722 m Höhe) mit 11 ng/l messen.

Eine umfangreiche Liste mit vorgefundenen Koffeinkonzentrationen in verschiedenen Wasserkörpern wurde von [Buerge et al. 1] zusammengestellt.

[Buerge et al. 2] stellten im Jahr 2006 Koffein als Marker vor, um zuverlässig den Anteil ungeklärter fäkaler Abwässer anthropogenen Ursprungs zu bestimmen. Diese Abwässer stammen in den Industrieländern vor allem aus sporadisch auftretenden Überläufen von Rückhaltebecken, die an einer Mischwasserkanalisation hängen.

Zur Bestimmung des volumetrischen Abwasseranteils (egal ob geklärt oder nicht) ist Koffein nur brauchbar, wenn die Elimination gleich bleibend ist. Hier sind persistenterer Marker geeigneter (z.B. Bor).

In dieser Arbeit werden räumliche und zeitliche Konzentrationsänderungen in der Hase bei Osnabrück untersucht. Die zeitlichen Konzentrationsänderungen werden dabei

- kurzfristig (innerhalb 2,5 Stunden, Kapitel 6.2),
- mittelfristig (innerhalb 12 Tagen, Kapitel 6.3) und
- langfristig (innerhalb 8 Wochen, Kapitel 6.1)

betrachtet.

Die Konzentrationen im Effluent der Kläranlage Osnabrück konnten nicht gemessen, aber berechnet werden.

Koffein selbst stellt für die meisten Gewässer keine schwerwiegende Belastung dar. Darauf wird in Kapitel 2.6 eingegangen.

(Ursprünglich war das zu bearbeitende Thema die Analytik von Östrogenen. Von der Wirkungsseite wären sie spannender als Koffein gewesen, es gibt viele Hinweise auf hormonelle Störungen in der aquatischen Fauna. In der Literatur wurden aber Hinweise gefunden, dass Estriol und Ethinylestradiol bei den hohen Temperaturen im GC nicht stabil sind, letzteres konnte auch nicht nachgewiesen werden. Bisher veröffentlichte Konzentrationen sollen auf einer Coelution von Lignocerin säure beruhen [Zorn].)

## **2 Sichtung bisheriger Arbeiten**

Zuerst soll kurz auf die Geschichte des Konsumverhaltens koffeinhaltiger Nahrungsmittel eingegangen werden, von denen Kaffee das Wichtigste darstellt. Dann werden die verschiedenen Koffeingehalte auf dem Weg vom Verbraucher zum Gewässer behandelt, und Gründe, warum diese stetig abnehmen. Der letzte Abschnitt befasst sich mit der Wirkung auf die aquatische Fauna. Nebenbei werden einige Substanzparameter für Koffein vorgestellt.

### **2.1 Geschichtliches und Aktuelles zum Konsumverhalten**

Die Brauchbarkeit eines Markers hängt auch von seinem kontinuierlichen Gebrauch ab. Der Blick in die Vergangenheit zeigt, dass eine Gesellschaft, die einmal koffeinhaltigen Lebensmitteln exponiert wurde, diesen auch nicht mehr entsagt, sie sind also mehr als eine Modeerscheinung. Versuche der Prohibition scheiterten. Für die kostengünstige Beschaffung von Kaffee wurde sogar das eigene Leben aufs Spiel gesetzt. Dies wird mit Beispielen belegt.

Bei der Markteinführung von Kaffee in Europa Anfang des 17. Jahrhunderts kam es zu einer Polarisierung der Gesellschaft: Frauen in England wetterten gegen die austrocknende Wirkung nach Kaffeekonsum (s. Abb.1). Diese '[Women's petition] against coffee' wurde umgehend von den Männern beantwortet [Men's Answer]. Charles II. sorgte sich um die Gefolgschaft seines Volkes, die ihm aber gerade mit seiner [Proclamation] zur Unterdrückung von Kaffeehäusern verweigert wurde. Die von Johann Sebastian Bach vertonte Kaffeekantate [BWV 211] setzt sich humorvoll mit den damaligen Konsumgewohnheiten auseinander. Mehr Kaffeeklatsch ist bei [Sims] nachzulesen.

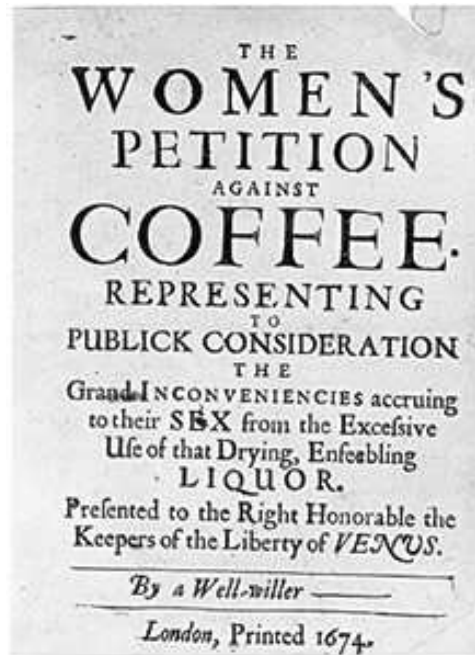


Abbildung 1: Titelblatt der '[Women's petition] against coffee' von 1674

Nach dem II. Weltkrieg war die Kaffeesteuer in Westdeutschland mit 10 DM/kg beträchtlich. In den Jahren 1945-1953 setzte ein Kaffeeschmuggel ein, bei der die Schmuggler sogar Panzer einsetzten. An der Aachener Kaffeefront wurden 40 Schmuggler und Zöllner getötet. Mit der Senkung der Kaffeesteuer auf 3 DM/kg wurde diesem Treiben ein Ende gesetzt.

### Aktuelle Verbrauchsdaten

Die Gesamternte an Rohkaffee betrug 2004/2005 113,3 Mio. Sack à 60 kg, davon waren 84,1 Mio. Sack exportfähig und wurden für 8,9 Mrd. US-\$ verkauft. Kaffee stellt nach Erdöl den Rohstoff mit dem höchsten finanziellen Umsatz dar!

9,042 Mio. Sack à 60 kg gelangten nach Deutschland, dabei kommt der meiste Kaffee aus Brasilien, Vietnam, Kolumbien und Indonesien (2005: 28,32 %, 16,99 %, 9,65 % bzw. 9,37 %). Der durchschnittliche Pro-Kopf-Verbrauch lag 2004 bei 6,4 kg/a, aufgelöst in 151 Liter Wasser. Ende der 80er lag das Maximum des Pro-Kopf-Verbrauches (7,9 kg/a). Entkoffeinierter Kaffee hatte 2005 einen Marktanteil von 9 % am Röstkaffee.

Der höchste Pro-Kopf-Verbrauch liegt in Finnland vor mit 11,94 kg/a, relativ niedrig ist er in Großbritannien mit 2,4 kg/a (dafür umso mehr Tee). [Kaffeeverband]

Diese regionalen Unterschiede und Verbrauchsschwankungen müssen für die Modellierung registriert werden.

1820 wurde Koffein erstmalig vom Chemiker Friedlieb Ferdinand Runge isoliert [Flassig]. Die Dichte beträgt 1,23 g/cm<sup>3</sup> bei 19 °C [Chemical].

Koffein wurde die CAS-Nr. 58-08-2 zugewiesen und zählt heute zu den High Production Volume Chemicals (meist als Abfall aus der Entkoffeinierung<sup>2</sup>) auf der U.S.A. EPA-Liste.

Neuerdings findet sich Koffein auch in Rezepturen für Kosmetika (z.B. Fa. Shiseido, Fa. Dr. Kurt Wolff).

<sup>2</sup> Die überschüssigen Abfälle können zu einem erheblichen Eintrag in die Umwelt führen.



## 2.2 Vorkommen in Lebensmitteln

In Tabelle 1 sind die Koffeingehalte gängiger Getränke aufgelistet.

**Tabelle 1: Koffeingehalte einiger Getränke [Ärzteblatt]**

	<u>Einheit / ml</u>	<u>mg / Einheit</u>	<u>mg/l</u>
Kaffee <sup>3</sup>	140	67-112	450-800
Espresso	50	50-60	1000-1200
Schwarzer Tee	140	20-50	160-400
Kakao	150	2-6	10-32
Cola-Getränk	200	30-40	65-250
Energydrinks	-	-	5-1200

Koffein in Tee wird oft als Teein bezeichnet. Lässt man einen Tee länger ziehen, lösen sich auch vermehrt Polyphenole, die am Koffein binden und so dessen Resorption verzögern. Im weltweiten Durchschnitt werden von einem Menschen täglich 70 mg Koffein konsumiert, in einigen Ländern aber auch 400 mg [Prösch et al.]. Für Deutschland kann eine ähnliche Aufnahme wie in der Schweiz von 300 mg/d angenommen werden [Buerge et al. 1].

### Negative Auswirkungen auf das Befinden

Der orale LD<sub>50</sub> für eine Ratte wird mit 381 mg/kg KG angegeben. Für Menschen liegt die akute letale Dosis bei ungefähr 10 g Koffein (entspricht etwa 100 Tassen Kaffee ) [Julien].

## 2.3 Metabolisierung im menschlichen Körper

Nach Ingestion verteilt sich Koffein in alle Körperkompartimente, es kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und gelangt auch in die Plazenta. Das Verteilungsvolumen wird für Erwachsene mit 0,4-0,6 l/kg KG und für Neugeborene mit 0,78 - 0,92 l/kg KG angegeben [PharmGKB]. Dies legt eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Körperwasser nahe.

Bei Erwachsenen werden vom 1,3,7-Trimethylxanthin (Trivialname Koffein)

- etwa 80 % zu 1,7-Dimethylxanthin (Trivialname Paraxanthin),
- etwa 10 % zu 3,7-Dimethylxanthin (Trivialname Theobromin) und
- etwa 4 % zu 1,3-Dimethylxanthin (Trivialname Theophyllin) abgebaut <sup>4</sup>,

diese wiederum zu Monomethylxanthinen [PharmGKB].

Die Autoren vom [Ärzteblatt] widersprechen dem weiteren Abbau zu Methylharnsäure .

Theophyllin und Theobromin haben eine diuretische, gefäßerweiternde und herzanregende Wirkung und sind nützlich in der Behandlung von Asthma [Dash ].

1-2 % [PharmGKB] bzw. 5 % [Ärzteblatt] des aufgenommenen Koffeins verlassen unmetabolisiert den Körper eines gesunden Erwachsenen.

<sup>3</sup> *Coffea robusta* hat mit 2,4 % einen höheren Koffeinanteil als *Coffea arabica* mit 1,3 %.

<sup>4</sup> Allerdings sollen auch umgekehrt 6 % des Theophyllins im Organismus zu Koffein synthetisiert werden [Loeffler].

Nach enteraler Aufnahme wird die maximale Koffeinkonzentration im Plasma nach 15-120 Minuten erreicht [Arnaud]. Eliminationshalbwertszeiten sind in Tabelle 2 aufgeführt, bei Schwangeren und Patienten mit Leberzirrhose ist die Elimination verzögert.

**Tabelle 2: Eliminationshalbwertszeiten in Stunden im Plasma des Menschen**

<u>Schriftstück</u>	<u>Frühgeborene</u>	<u>Erwachsene</u>
[PharmGKB]	65-130	3-7
[Ärzteblatt]	50	5
[Arnaud]	-	2,5-4,5

## 2.4 Abbauprozesse in der Umwelt

Ermittelte Abbauraten bei Photo- und Biodegradation sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es wurde stets von einem Abbau erster Ordnung ausgegangen.

[Buerge et al. 1] ist folgendes zu entnehmen:

In dem ‚nonsterile‘ Versuch, der eine Abbaurate für Biodegradation  $k_{\text{bio}} = 0,006/\text{d}$  ergab, trat zwischen Tag 24 und 42 ein drastischer Konzentrationsrückgang von 1,1 auf 0,2  $\mu\text{g}/\text{l}$  auf. Möglicherweise hatten sich hier die Mikroorganismen an das Nährstoffangebot adaptiert.

Auch aus der Differenz der beiden Versuche, die dem Sonnenlicht ausgesetzt waren (‚Photodegradation autoclaved‘ und ‚nonsterile‘), lässt sich  $k_{\text{bio}}$  abschätzen, hier sind es 0,004/d. Die Autoren weisen aber auf die relativ hohe Temperatur von etwa 20 °C im Experiment hin, während die Seen im Schweizer Untersuchungsgebiet eine mittlere Jahrestemperatur von etwa 10 °C haben.

Sorption an Partikeln kann aufgrund des geringen Verteilungskoeffizienten für Octanol-Wasser vernachlässigt werden ( $\log k_{\text{ow}} \approx 0$  für  $\text{pH} = 7,4$ ).

Auch Volatisierung wird aufgrund des geringen Henry-Koeffizienten als unerheblich angesehen ( $1,9 \cdot 10^{-19} \text{ bar} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ ).

Photodegradation wird vor allem auf indirekte Photolyse durch Reaktion mit HO-Radikalen zurückgeführt, dabei entsteht 1,3,7-Trimethylharnsäure. Bei großer Wassertiefe und winterlichen Strahlungsverhältnissen fällt die effektive Photolyse weitaus geringer aus (auch in [Poiger et al.]). So wurde für den Zürichsee eine mittlere  $k_{\text{photo}}$  von 0,0001/d geschätzt und für den Greifensee 0,0002/d.

Ohne äußere Einflüsse ist die Dissipation also gering, so dass man von entsprechend gelagerten Wasserproben mittelfristig eine ausreichende Stabilität erwarten kann (siehe Lagerung in Kapitel 6).

Manchmal können die Koffeinkonzentration durch koffeinhaltigen Bewuchs verfälscht sein (so bei [Peeler] in einem Feuchtgebiet durch Yaupon Holly (*Ilex vomitoria*)).

**Tabelle 3: Abbauraten bei Photo- und Biodegradation aus der Literatur**

<u>Autor</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>autoklaviert?</u>	<u>Salzwasser?<sup>5</sup></u>	<u>Sonnenlicht?</u>	<u>gekühlt? / °C</u>	<u>Abbaurrate / 1/d</u>	<u>Halbwertszeit / d</u>
[Peeler]	UV	nein	ja	ja	nein	0,023	31
	Temp	nein	ja	nein	nein	0,010	72
	Control	nein	ja	nein	ja / 4	0,004	178
[MRI]	(gleiche... ...Bedingungen)	'clean water'	nein	nein	ja / 5	0,001	478
		'clean water'	nein	nein	nein	0,002	319
		'clean water'	nein	nein	nein	0,003	235
		'clean water'	nein	ja	nein	0,010	68
[Buerge et al. 1]	Bio-	nein	nein	nein	nein	≤ 0,003	≥ 231
	Photo- autoclaved	ja	nein	ja	nein	0,054	13
	Photo- nonsterile	nein	nein	ja	nein	0,058	12
	autoclaved lake water	ja	nein	nein	nein / 20 ±1	~ 0,001	~ 693
	nonsterile	nein	nein	nein	nein / 20 ±1	~ 0,006	~ 116

Für die Tabelle wurden die Halbwertszeiten des [MRI] aus den Zeiträumen errechnet, nach denen noch 97 % der Startkonzentration vorhanden war.

<sup>5</sup> Hier stellt sich die Frage, ob es auch halotolerante, koffeinabbauende Bakterien gibt.

## 2.5 Abbauprozesse in der Kläranlage

In Kläranlagen ist die Biodegradation deutlicher ausgeprägt. Die aktivsten Pilze sind *Aspergillus* und *Penicillium* [Mazzafera], die aktivsten Bakterien *Pseudomonas putida* und Arten in den Gattungen *Alcaligenes*, *Rhodococcus* und *Klebsiella*. Über Pilze entsteht dabei vor allem Theophyllin und über Bakterien vor allem Theobromin, manche Bakterien bauen auch direkt zu Harnsäure ab [Dash].

*Pseudomonas putida* war fähig, sich ausschließlich von Koffein zu ernähren bei einer Wachstumsrate  $r$  von 0,049/h. Dies stellt aber keine optimalen Bedingungen dar, denn bei Fütterung mit Glukose lag  $r$  bei 0,31/h und bei einer äquimolaren Mischung beider Futtermittel bei 0,22/h [Ogunseitán].

Auf dem Weg durch das Absetzbecken nahmen die Konzentrationen nur um 2 % ab.

Die Tätigkeit der Mikroorganismen ist hier noch gering (5 % Abnahme in einem Batch-Experiment über einen Zeitraum von 2 Tagen bei 20 °C). Somit kann auch von einem geringen Abbau in den Abwasserkanälen ausgegangen werden <sup>6</sup>.

Im Influent wiesen die auf die Bevölkerung umgerechneten Frachten nur eine geringe Variation auf:  $15,8 \pm 3,8$  mg/d (entspricht einer Metabolisierung von 95 %). Die Eliminationsraten in den Kläranlagen betragen 81-99,9 %, im Mittel  $99,6 \pm 0,2$  %, so dass pro Kopf im Effluent nur noch (<sup>7</sup>)  $0,06 \pm 0,03$  mg/d zu verzeichnen waren. [Buerge et al. 1]

[Buerge et al. 2] machten die Beobachtung, dass die Frachten in den Abwasser aufnehmenden Flüssen manchmal höher war als im Effluent der zugehörigen Kläranlagen. Die zusätzliche Quelle wurde in Überlaufereignissen bei Mischwasserkanalisation ausgemacht.

## 2.6 Wirkung auf die aquatische Fauna

Die [EPA] hat bislang 78 ökotoxikologische Datensätze zu Koffein gesammelt. In der aquatischen Fauna sind die Eier des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) am empfindlichsten, der  $LC_{50}(4 \text{ d})$  liegt bei 0,22 µg/l. Unempfindlich hingegen ist die „fathead minnow“ (*Pimephales promelas*), hier ist der  $LC_{50}(5 \text{ d}) = 0,72$  g [sic] /l , d.h. auch nach 5 Tagen würde noch die Hälfte dieser Fische munter im Kaffee schwimmen (vgl. Tabelle 1).

---

<sup>6</sup> In ihrer Arbeit wollten sie mit diesem Experiment aber die Verwendung des Wassers aus der Vorklärung begründen. Da hier grobe Schwebstoffe schon mechanisch abgeschieden wurden, erleichtert dies die Probenvorbereitung.

<sup>7</sup> dieser Wert auch bei [Barber et al. 1]

### **3 Methodik**

Hier werden die erforderlichen Arbeitsschritte zur Bestimmung des Koffeingehaltes in einer Wasserprobe erklärt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte dann mit einem Programm für Tabellenkalkulation.

#### **3.1 Probenahme**

Die Probenahme erfolgte bei einzelnen Proben von Hand mittels eines Schöpfbechers aus der fließenden Welle oder durch zwei automatische Probenehmer. Diese Probenehmer gewährleisten eine kühle und dunkle Lagerung. Bei der Verlegung des Schlauches muss darauf geachtet werden, dass er streng monoton steigend ist, damit sich nicht Wasser in ihm sammelt, welches zur Ausbildung eines Biofilmes führen könnte. Beide Probenehmer lassen sich mit maximal 12 Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von je 2,9 Liter bestücken.

Zur Verhinderung mikrobieller Abbauvorgänge wurde in jedes Gefäß etwa 240 mg Natriumazid gegeben, um eine Konzentration von 100 mg/l zu erreichen<sup>8</sup>.

Es wurde eine diskontinuierliche, zeitproportionale Probenahme eingestellt, die stündlich Aliquots von 100 ml zu einer Tagesmischprobe zusammenstellt. Zur Bestimmung der Fracht wäre aber eine mengenproportionale Probenahme nützlicher gewesen. Wie später gezeigt wird (siehe Abb. 14), bestand eine positive Korrelation zwischen dem Durchfluss und der Fracht. Bei einer zeitproportionalen Probenahme kann es so zu einer Unterschätzung der Frachten kommen.

#### **3.2 Probenvorbereitung**

##### **Zentrifugation**

Für eine Zentrifugation wurde eine Sorvall RC5C Plus mit dem Rotor SLA-3000 bei 9000 Umdrehungen/min getestet. Ein Pellet war an der Gefäßwand kaum zu erkennen oder die Resuspension erfolgte schon bei der Entnahme aus der Zentrifuge.

In einer kleineren Zentrifuge lässt sich ein Vial auch bei 500000-facher Erdbeschleunigung schleudern (man könnte das Vial dann vorsichtig in den Autosampler stellen und müsste je nach Abscheidung die Sprizentiefe einstellen). Sie ist aber nicht praktikabel, weil sie mit einem Vakuum arbeitet (um den Reibungswiderstand zu verringern). In diesem Vakuum würde das Lösungsmittel rasch verdunsten. Andererseits wäre der Dichteunterschied der Verschmutzung hierin größer als in Wasser.

##### **Filtration**

Eine saubere Filtration war vor allem für die Proben aus dem Schönungsteich mit starkem Algenbewuchs am Kläranlagenauslauf wichtig. Folgende Verfahren wurden in Betracht gezogen:

- a) Filterpapier aus Cellulose
- b) Filterpapier aus Nylon mit unterschiedlichen Porendurchmessern
- c) Saugkerzen aus Nylon
- d) Dialyseverfahren an IC
- e) Filterpapier aus Glasfaser

---

<sup>8</sup> [Schröder et al.] verwendeten eine Dosis von 50 mg/l, dies ist auch die Empfehlung von Mikrobiologen an der Uni Osnabrück.

Die angelegten Kriterien waren Feinheit, Schmutzaufnahmekapazität, Handhabbarkeit, Dauer und Kosten. Die Verfahren a)-d) wurden aus folgenden Gründen verworfen:

- a) steht im Verdacht Koffein zu binden
- b) setzte sich schnell zu <sup>9</sup>, da als Membranfilter geringe Schmutzaufnahmekapazität, erfordert so häufige Filterwechsel
- c) Filterstärke eher schlecht mit 5 µm [Krausch]; Unterdruck der Vakuumpumpe reichte nicht aus
- d) langwierig, da passives Verfahren; mangelnde Erfahrung damit

Filterpapier aus Glasfaser hat zwar gegenüber Filterpapier aus Nylon einen höheren Preis, zeichnet sich aber als so genannter Tiefenfilter durch eine hohe Schmutzaufnahmekapazität aus. Der einzige Nachteil war, dass der relativ dicke Filter im Spritzen-Filtervorsatz schnell zu einer Undichtigkeit führte. Durch eine niedrigere Positionierung des Probengefäßes während der SPE lässt sich der hydrostatische Druck aber leicht vermindern.

### 3.3 Ansetzen des internen Standards (IS) und des Wiederfindungsstandards (WS)

Die Verwendung eines IS hat den Vorteil, dass eine Quantisierung über eine definierte Menge eines Stoffes erfolgt, die den gleichen Arbeitsschritten ausgesetzt ist, wie die zu analysierende Substanz. Der IS sollte möglichst ähnliche Substanzparameter aufweisen.

Mit dem WS kann der Verlust abgeschätzt werden, der bei der SPE auftritt und so die Nachweis- und Bestimmungsgrenze beeinflusst. Er wird nach der SPE hinzugegeben.

#### Vorversuche zur Löslichkeit und Auswahl geeigneter Substanzen

Als IS sollte zuerst ein Di- oder Monomethylxanthin <sup>10</sup> eingesetzt werden, deren Löslichkeit sich aber grundlegend von der des hydrophilen Trimethylxanthins Koffein unterschied, die in folgender Tabelle dargestellt ist.

**Tabelle 4: Löslichkeit von Koffein in verschiedenen Lösungsmitteln bei unterschiedlichen Temperaturen**

<u>Lösungsmittel</u>	<u>Temperatur / °C</u>	<u>Löslichkeit / g/l</u>
Wasser	20	21
Wasser	80	180
Wasser	100	670
Ethanol	20	15
Ethanol	60	45
Aceton	20	20
Chloroform	20	180

Nur 1,7-Dimethylxanthin hatte eine noch ausreichende Löslichkeit <sup>11</sup>, es war aber kaum GC-gängig: Die manuelle Injektion ergab ein deutliches Signal für 2,5 µg/ml <sup>12</sup>C-Koffein und ein kaum erkennbares für die doppelte Konzentration 1,7-Dimethylxanthin. [Houghton] weist

<sup>9</sup> bei einem Durchmesser von 2,5 cm bei 0,45 µm schon nach 10 ml, bei 0,8 µm nach 60 ml und bei 3 µm nach 180 ml

<sup>10</sup> 7-Methylxanthin, 9-Methylxanthin, 3,7-Dimethylxanthin, 1,7-Dimethylxanthin

<sup>11</sup> Von einem Chemikalienvertrieb wird in Methanol gelöstes 1,7-Dimethylxanthin vertrieben, welches die in der Literatur angegebene Löslichkeit übersteigt: Für Wasser sind dies 1 mg/ml, für Ethanol 0,6 mg/ml bei 20 °C. Hinsichtlich der Polarität von Methanol können Werte in diesem Intervall angenommen werden. Dennoch wollen sie einem 1 mg/ml Methanol verkaufen.

darauf hin, dass Dimethylxanthine wegen ihrer Polarität einer Derivatisierung für das GC/MS bedürfen.

Darum wurde auf  $^{13}\text{C}$ -markiertes Koffein (0,1 mg/ml Methanol, Cambridge Isotopes) zurückgegriffen. Alle drei C-Atome der drei Methylgruppen sind hier markiert (s. Abb. 2), so dass sich das Molgewicht von 194,19 g um 3 g erhöht.

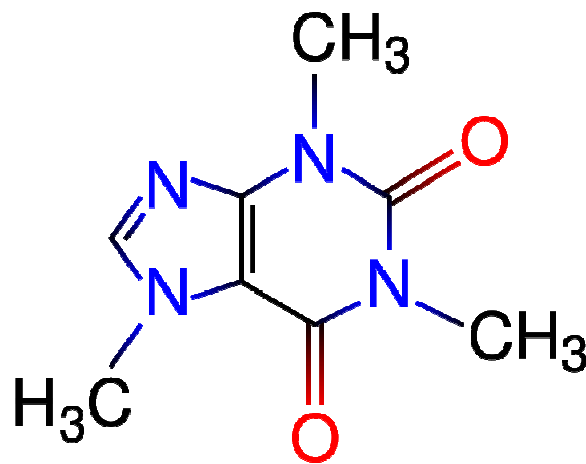


Abbildung 2: Strukturformel von 1,3,7-Trimethylxanthin

Im natürlichen Isotopenverhältnis macht  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff 1,1 % des gesamten Kohlenstoffes aus. Andere Isotope sind instabil. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein natürlich vorkommendes Koffeinmolekül mit drei  $^{13}\text{C}$ -Atomen besetzt ist, beträgt bei insgesamt acht C-Atomen nur 0,007 %.

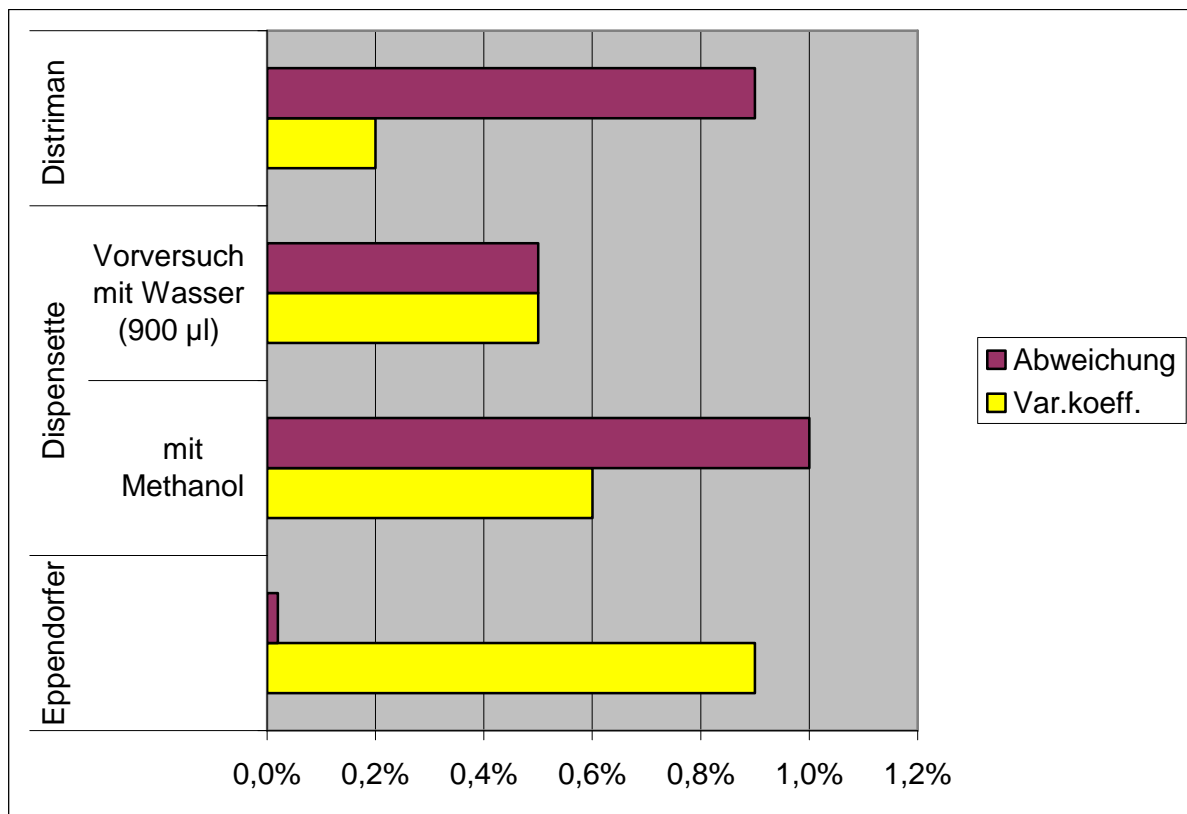
Auch  $^{12}\text{C}$ -Koffein (1 mg/ml Methanol) wurde zur Bestimmung der Responsefaktoren besorgt. Als WS diente Simazin.

### Abfüllen der Vials

Für das Abfüllen der Vials wurde nach einer handlichen und genauen Gerätschaft gesucht. Zur Auswahl standen:

- eine Distriman (Fassungsvermögen 12,5 ml, Skala auf 10  $\mu\text{l}$  genau. Cave: verspritzt leicht bei hoher Austrittsgeschwindigkeit)
- eine Dispensette (großes Gefäß, nur grobe Skala. Auf blasenfreies Leitungssystem achten!)
- eine Eppendorf-Pipette (blau, Skala auf 1  $\mu\text{g}$  genau)

Die Genauigkeit wurde in Messreihen mit je 10 Abfüllungen von 1 ml Methanol bzw. 0,9 ml Wasser ermittelt. Benutzt wurde eine Sartorius-Waage mit einer Messgenauigkeit von 1  $\mu\text{g}$  und einem Messbereich bis 2 g. Die Ergebnisse sind im folgenden Diagramm (Abb. 3) zusammengefasst.



**Abbildung 3: Abweichung und Variationskoeffizient für verschiedene Gerätschaften zum Pipettieren**

Der Variationskoeffizient bezieht sich auf eine mangelnde Präzision, die Abweichung auf eine mangelnde Richtigkeit.

- Die DISTRIMAN hatte die beste Präzision und eine schlechte Richtigkeit (dies liegt an der größeren Skala). Sie würde ein serienweises Abfüllen ermöglichen.
- Die Dispensette hatte eine mittlere Präzision, die grobe Skala würde eine Kalibrierung erfordern. Praktisch ist das große Gefäß, unpraktisch dessen Reinigung.
- Die Eppendorf-Pipette hat die schlechteste Präzision und die beste Richtigkeit. Die Handhabung ist am umständlichsten, weil für jedes Abfüllen neu aufgefüllt werden muss.

Es wurde die Eppendorf-Pipette benutzt.

Standards wurden in einer konsekutiven Verdünnungsreihe erstellt mit den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,5; 1 µg/ml und für <sup>12</sup>C-Koffein auch 5 µg/ml. Das Lösungsmittel muss von Anfang an Raumtemperatur aufweisen. Dies ist bei einem Lösungsmittel mit einem hohen Raumausdehnungskoeffizienten umso wichtiger (Methanol dehnt sich etwa fünfmal stärker aus als Wasser (bei 20 °C)). Weiterhin sollte der Vorgang zügig erfolgen, um Verluste durch Verdunstung gering zu halten (Methanol hat einen Siedepunkt von 65 °C). Beim Abfüllen im Glaskolben wird mit der Unterseite des Meniskus abgeglichen. Die im Vergleich zu Wasser geringe Oberflächenspannung von Methanol führt dazu, dass beim Schwenken des Kolbens Flüssigkeit in die Wandung des Verschlusses kriecht. Trotzdem sollte darauf nicht verzichtet werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

Beim Abfüllen entstanden unvermutete Restmengen, für einzelne Verdünnungsstufen ein Überschuss von bis zu 2,2 %.

Zuerst wurde überprüft, ob beim Abfüllen der Kolben die darauf angegebene Genauigkeit erreicht werden kann. Dies geschah gravimetrisch mit Wasser (um Lösungsmittel



einzusparen) bei Zimmertemperatur. Dabei stellte sich ein geringeres Volumen der Kolben mit einer größeren Ungenauigkeit heraus als angegeben, wobei die Reste ja ein größeres Volumen nahe gelegt hätten. Für den 250-ml-Kolben waren dies -0,3 ml (angegeben sind  $\pm 0,15$  ml), für den 100-ml-Kolben -0,4 ml ( $\pm 0,1$  ml).

In einer Nachkontrolle verschlechterte sich die Präzision der Eppendorfer-Pipette. Hierfür wurde in einem Durchgang 24-mal je 1 ml Methanol bei 16 °C in ein Gefäß pipettiert. Die Dichte wurde anhand Literaturangaben von 20 °C aus extrapoliert. Jetzt zeigte sich eine Abweichung von -1,28 %, was zu den Restmengen passen würde. Bei 24 Pipettiervorgängen kann der vorher ermittelte VK von 0,9 % kaum als Erklärung herangezogen werden.

Das Abfüllen der Standards wurde nicht im Labor, sondern wegen des größeren Platzbedarfes in einem Seminarraum durchgeführt. Dieser war besser beheizt als das Labor (geschätzt 20 °C gegenüber 16 °C). Diese Temperaturzunahme könnte die Dichte um 0,6 % verringert haben. Das alleine erklärt aber noch keine Fehler von 2,2 %.

### **Bestimmung des Responsefaktors (RF)**

Die Bestimmung des RF beinhaltete 10 verschiedene RF-Standards, aus denen der Mittelwert genommen wurde. Er berechnet sich wie folgt:

*FE*: Flächeneinheiten für  $m/z = 194$  bzw.  $197$   
*C*: Konzentration des Standards  $^{12}\text{C}$ -Koffein bzw.  $^{13}\text{C}$ -Koffein

$$RF = FE_{194} / FE_{197} * C_{13} / C_{12}$$

Der MW war 1,206 bei einem VK von 2,3 %.

Analog wurde der RF für den WS mit 4 verschiedenen WS-Standards bestimmt.

## **3.4 Festphasenextraktion**

Mit der Festphasenextraktion (SPE) werden zum einen unerwünschte Probenverunreinigungen abgetrennt, zum anderen wird die Konzentration der zu untersuchenden Substanz gegenüber der Probe selbst erhöht (eine so genannte Aufkonzentrierung). Auf diese Weise kann die Nachweisgrenze einer analytischen Methode herabgesetzt werden. Dies beinhaltet oft einen Lösungsmittelwechsel von einem polaren Lösungsmittel (Wasser) zu einem weniger polaren Lösungsmittel (Ethylacetat, Hexan). In der Regel arbeitet man mit einem IS, um eine verlässliche Quantifizierung zu ermöglichen. Obwohl hohe und reproduzierbare Wiederfindungsraten von mehr als 80 % angestrebt werden, ist mit IS prinzipiell auch bei geringeren, nicht so gut reproduzierbaren Wiederfindungen eine Quantifizierung möglich.

### **Durchführung**

Die Wasserprobe (z.B. 500 ml) wird durch eine SPE-Kartusche mit einem spezifischen Adsorbens (100 mg) gegeben, dessen Eigenschaften eine hohe Sorptionskapazität für die zu untersuchende Substanz gewährleisten sollten. Danach wird mit einem geeigneten Lösungsmittel die Substanz wieder von der festen Phase heruntergespült, was als Elution bezeichnet wird. Das setzt voraus, dass das Lösungsmittel stärkere attraktive Wechselwirkungen mit der Zielsubstanz eingehen kann als das Adsorbens.

Bei manchen Anwendungen wird das Adsorbens zwischendurch mit einem weiteren Lösungsmittel gereinigt. In diesem Schritt sollen unerwünschte Substanzen, die die anschließenden Analysen stören könnten, entfernt werden, ohne dass die eigentliche Zielsubstanz desorbiert wird.

Verwendet man zur Elution z.B. einen Milliliter, ließe sich bei einem Volumen der Wasserprobe von 500 ml die Konzentration maximal (eine vollständige Wiederfindung vorausgesetzt) um den Faktor 500 erhöhen. Durch ein Eindampfen des Eluats (Volumenverringerung) lässt sich die Konzentration noch einmal erhöhen.

Falls das optimale Elutionsmittel (das die höchste Wiederfindungsrate ergibt) für die nachfolgende Analyse ungeeignet ist (z.B. für das Säulenmaterial im GC unverträglich), kann ein weiterer Lösungsmittelwechsel vorgenommen werden.

Alle verwendeten Lösungsmittel müssen GC-grad haben.

### **Chronologisches Vorgehen**

1. Die Probe wurde im Probenehmer mit Natriumazid versehen und seitdem dunkel und gekühlt gelagert.
2. Eine Glasampulle des IS mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$   $^{13}\text{C}$ -Koffein in das Probengefäß entleeren und die Glasampulle unter Zuhilfenahme eines Spatels versenken, damit sie sich mit Wasser füllen kann. Den Spatel danach abspülen.
3. Die Probe einer ersten Filtration unterziehen mit Glasfaserfiltern (GF6 der Fa. Whatman / Schleicher & Schuell, Durchmesser 100 mm) in einem Keramiktrichter und das Permeat wieder zurück in das Probengefäß geben.
4. Das Gefäß ohne Deckel wiegen und das gemessene Gewicht vermerken.
5. Für die zweite Filtration folgendes aufbauen (s. Abb. 4): Den Adapter des Ansaugschlauches auf eine leere Kartusche mit Fritte drücken und das andere, mit Metall beschwerte Ende im Probengefäß versenken. Die Kartusche auf einen Spritzen-Filtervorsatz mit eingelegtem Glasfaserfilter (GF/D, Durchmesser 25 mm) setzen.
6. Eine Bakerbond-PolarPlus-C-18-Kartusche (500 mg mit  $20\text{-}\mu\text{m}$ -Fritte)<sup>12</sup> entsprechend der Wasserprobe beschriften. Dann wird sie auf das Ventil des Deckels der Glaskammer gesetzt.
7. Mit einer Pasteur-Pipette das Adsorbens mit etwa einem Milliliter Methanol konditionieren (dies soll die Benetzbarkeit des Adsorbens erhöhen und das Passieren der Wasserprobe erleichtern.) Dann mit einer neuen Pasteur-Pipette die Kartusche mit destilliertem Wasser auffüllen. Mit dem rund gefeilten  $^{13}$  Adapter die Kartusche mit dem Spritzen-Filtervorsatz verbinden.
8. Den Schlauch der Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand CVC2, rechts im Hintergrund von Abb. 4) an der Glaskammer anschließen und das ringförmige Ventil (neben dem Manometer, siehe Abb. 4) erstmal öffnen.
9. Die Pumpe einschalten und auf einen Druck  $p$  von 300 mbar<sup>14</sup> bei einer Toleranz von 250 mbar einstellen. Die Differenz von  $p$  zum Atmosphärendruck entspricht dem Unterdruck und darf laut der Beschriftung der Glaskammer 20 Zoll Quecksilbersäule nicht unterschreiten. Eine höhere Toleranz lässt sich nicht einstellen, sie verhindert ein ständiges An- und Ausschalten der Pumpe (was womöglich zum Verschleiß führt). Jetzt kann das ringförmige Ventil geschlossen werden. Die Konstruktion wird auf Dichtheit überprüft, insbesondere im Bereich des Spritzen-Filtervorsatzes.
10. Eventuell den Pegelstand in beiden Kartuschen anpassen. Einerseits soll ein Trockenlaufen des Adsorbens verhindert werden. Andererseits soll der Pegel nicht so hoch sein, dass die Tropfgeschwindigkeit nicht mehr beobachtet werden kann. Falls der

---

<sup>12</sup> Diese Kartuschen wurden auch von [Peeler] und [Prösch et al.] benutzt. Von Macherey&Nagel werden für Koffein sonst noch eine C6H5- und eine SB- Kartusche empfohlen. Bei [Buerge et al. 1] wurde die SPE mit wieder verwendbaren Kartuschen durchgeführt, die mit etwa 10 ml großporigem Polystyrol gefüllt wurden. Gegenüber C-18-Silica hätten sich saubere Extrakte ergeben. Die aufgegebene Menge wurde dort der vermuteten Konzentration angepasst: 200 ml für Wasser aus der Kläranlage, 1000 ml für Wasser aus Gewässern.

<sup>13</sup> siehe Danksagung

<sup>14</sup> [Peeler] stellte einen Durchfluss von etwa 10 ml/min ein. Das würde für 500 ml 50 min bedeuten. Auch mit 300 mbar brauchte es hier fast doppelt so lange, der Durchfluss nimmt zum Ende hin stark ab.

Pegel einmal zu niedrig ist: Das Probengefäß über das Niveau der Kartusche anheben und die Schraube des Ansaugschlauches lockern. So kann Luft aus der Kartusche entweichen und die Wasserprobe durch den hydrostatischen Druck nachfließen. Falls der Pegel einmal zu hoch ist: Den Ansaugschlauch aus dem Probengefäß kurzzeitig herausziehen und die angesaugte Luftblase abwarten.

11. Beim gleichzeitigen Anschluss mehrerer Wasserproben, die ein Gesamtvolumen von einem Liter überschreiten, muss das Auffanggefäß in der Glaskammer zwischendurch geleert werden. Wird die Tropfgeschwindigkeit zu niedrig, sollte ein neuer Filter verwendet werden.
12. Den letzten Rest der Wasserprobe saugt man aus dem geeigneten Probengefäß und der Glasampulle heraus. Die Glasampulle kann zur Wiederverwendung in den Abwurfbehälter gegeben werden.
13. Wenn das Leergewicht des Probengefäßes unbekannt war, dieses jetzt ermitteln (wiederum ohne Deckel). Danach das Probengefäß ausspülen.
14. Den Ansaugschlauch entfernen, die Pumpe ausschalten und das Auffanggefäß entleeren. Das Innere der Kartusche, die Unterseite des Deckels und die Edelstahlspitze mit Zellstoff abtrocknen.
15. Nun das Adsorbens mit einem Lösungsmittel waschen. (Das unpolare Hexan hat im gleichfalls unpolaren Adsorbens auch die positive Wirkung unerwünschten Wasser herauszupressen.) Mit einer Pasteur-Pipette etwa einen Milliliter aufgeben, das Durchfeuchten des Adsorbens abwarten und mit wieder angeschalteter Pumpe trockensaugen. Das Lösungsmittel im Auffanggefäß in den Sondermüllbehälter für Lösungsmittelabfälle geben.
16. Die Etagenböden in die Glaskammer legen. Eine Glasampulle entsprechend der Kartusche beschriften und in die Vertiefung der Etagenböden setzen.
17. Mittels einer Pasteur-Pipette mit etwa einem Milliliter Aceton eluieren.
18. Das ringförmige Ventil öffnen, die Pumpe anschalten und auf einen geringeren Unterdruck einstellen ( $p > 800$  mbar!!). Das Ventil vorsichtig mit der Fingerkuppe schließen. Das Eluat darf nicht verspritzen, auch den erniedrigten Siedepunkt des Lösungsmittels bei Unterdruck beachten. Dann die Pumpe wieder ausschalten.
19. Auch beim Einengen ist zu beachten, dass das Eluat nicht verspritzt. Es wird synthetische Luft (Reinheit 5.0)<sup>15</sup> verwendet, die mit einem anderen Deckel der Glaskammer über die Öffnung der Glasampulle verströmt wird. Um mit der synthetischen Luft sparsam umzugehen, alle nicht benötigten Öffnungen verschließen. Vor dem vorsichtigen Aufsetzen des Deckels den Druckminderer der Gasflasche nur soweit öffnen, dass der aus der Edelstahlspitze kommende Luftstrom auf dem Trommelfell vernehmbar wird. Die Oberfläche des Lösungsmittels erscheint nun etwas eingedellt. Das verdampfte Aceton kann über einen Abluftschlauch nach draußen abgeführt werden.
20. Nach dem vollständigen Verdampfen des Acetons den festen Rückstand mit 0,2 ml Ethylacetat per Eppendorfer-Pipette wieder in Lösung bringen. Dazu die Glasampulle verschließen und geneigt rotieren. Schließlich in ein Mikroinsert geben. Im schlanken Gefäßboden können Gasbläschen hängen bleiben, die entfernt werden müssen. Sonst könnte die Injektorspritze diese ansaugen.

---

<sup>15</sup> Wenn die Raumluft sauber genug ist, könnte ein Einengen auch einfach über die Vakuumpumpe erfolgen.



**Abbildung 4: Aufbau der SPE für die Schritte 5-13**

### 3.5 Gaschromatographie-Massenspektrometer

Zum Einsatz kamen folgende Geräte der Fa. Agilent:

- 7683 B Series Injector
- 6890 N Network GC System mit einer Hewlett-Packard-5MS-Säule (Durchmesser 0,25 mm, Länge 30 m, Filmdicke 0,25 µm)
- 5973 Inert Mass Selective Detector mit Elektronenstoßionisation
- 59864 B Ionization Gauge Controller

#### Analysebedingungen im GC

Trägergas: Helium  
Spülmittel: je zweimal Hexan und Ethylacetat vor jeder Probe <sup>16</sup>  
Injektionsvolumen: 1 µl splitless (Spritzenvolumen 10 µl)  
Liner-Temperatur: 270 °C <sup>17</sup>  
Purge Flow: 50 ml für eine Minute <sup>18</sup>  
Temperaturprogramm: siehe Abb. 5 <sup>19</sup> (mit Vergleich anderer Programme aus der Literatur <sup>20</sup>)  
Initial Flow: 1,5 ml/min <sup>21</sup>  
Transferline-Temperatur: 280 °C

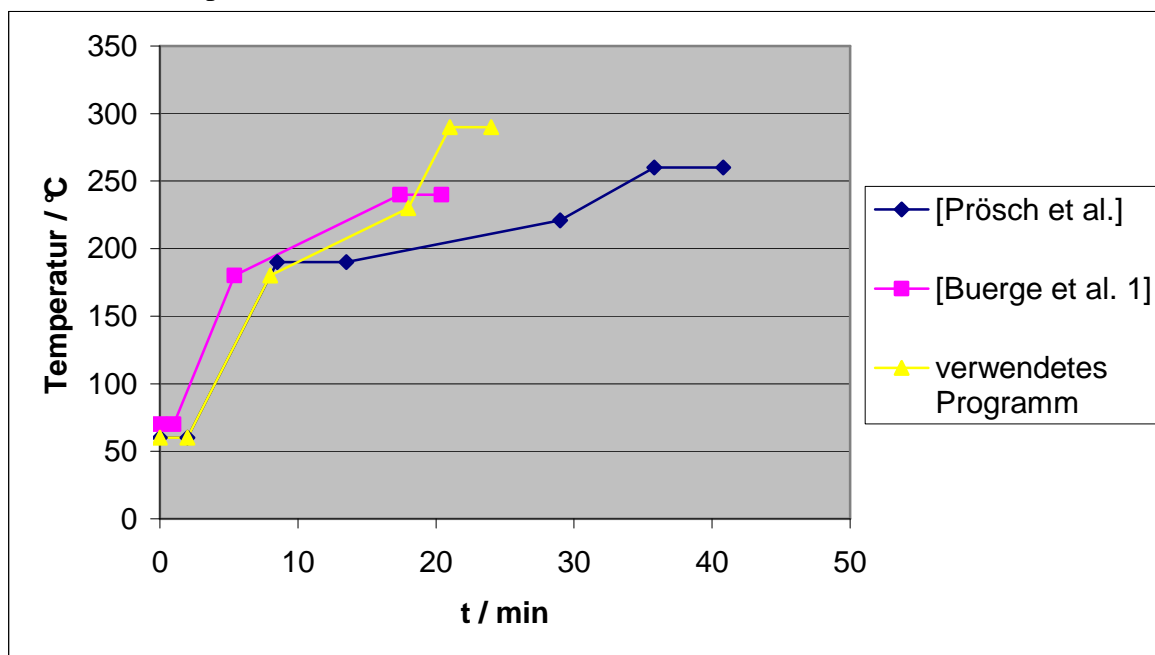


Abbildung 5: Temperaturverlauf im Ofen

<sup>16</sup> Die ersten vier Pumpvorgänge werden zurückgepumpt, da sie noch mit Resten der Spülmittel durchsetzt sein könnten.

<sup>17</sup> Um zu überprüfen, ob diese Temperatur nicht zu einer Überladung des Liners führt, wurde das Programm ‚Solvent Vapor Volume Calculator‘ von Hewlett Packard benutzt. Sonst drückt sich das Lösungsmittel schon selbst in die Säule und kann ein Tailing verstärken.

<sup>18</sup> Eine Temperaturerhöhung im Ofen sollte erst danach beginnen.

<sup>19</sup> Die Starttemperatur sollte niedriger als der Siedepunkt des Lösungsmittels sein (für Ethylacetat 77 °C). Der Schmelzpunkt von Koffein liegt bei 238 °C [Loeffler]. Die Säule verträgt bis zu 350 °C.

<sup>20</sup> [Prösch et al.] ist nicht in Bezug auf Koffein optimiert, hier wird auch ein ganzer Pestizidcocktail erfasst.

<sup>21</sup> Von Agilent wird für die Säule einmal eine Geschwindigkeit von 20-40 cm/s für das Trägergas Helium und ein Initial Flow von 2 ml/min empfohlen. Mit diesem Initial Flow wird aber schon eine Geschwindigkeit von 52 cm/s erzielt, darum wurde er auf 1,5 ml/min gesenkt, was eine Geschwindigkeit von 45 cm/s ergibt. Somit beträgt die Totzeit für die 30 m lange Säule 67 s. An dieser Stelle gäbe es auch die Möglichkeit anstatt des konstanten Initial Flow einen konstanten Druck einzustellen.

### Analysebedingungen im MS

Koffein als Purin lässt sich massenspektrometrisch leicht identifizieren, weil die energetisch stark unterschiedlichen Bindungen zu charakteristischen Fragmenten führen, was bei alicyclischen Kohlenwasserstoffen nicht der Fall ist. Außerdem sind Purine sehr stabile Verbindungen, so dass das Molekularion im Spektrum am häufigsten vertreten ist.

Die typischen Zerfallsrouten sind

$m/z = 194 \rightarrow 165 \rightarrow 137 \rightarrow 109 \rightarrow 82 \rightarrow 55$  und

$m/z = 194 \rightarrow 109 \rightarrow 67$  oder andere Kombinationen über das 109-Ion.

Für das 109-Ion wird eine Ringerweiterungsreaktion zu einem 7-Ringmolekül angenommen, da nur dieses eine ausreichende Stabilität besitzt. [Spiteller]

Im SIM wurde

- für  $^{12}\text{C}$ -Koffein das 194-Ion als Identifier-Ion und das 109-Ion als Qualifier-Ion genommen,
- für  $^{13}\text{C}$ -Koffein waren dies das 197-Ion und das 111-Ion,
- bei Simazin als WS sind es die Massenspuren 201 und 186.

Aufgrund der relativistischen Massenzunahme bei hohen Geschwindigkeiten sind die Fenster nicht symmetrisch, sondern umfassen das Intervall  $[m/z - 0,3; m/z + 0,7]$ .

### Software:

Es ist darauf zu achten, dass die Ergebnisse der Autointegration vom gewählten Zeitfenster abhängen. Peaks, die für das Fenster 11-12 min nicht erkannt wurden, bereiten bei einem Fenster von 11,7-11,8 min keine Probleme. Gleichzeitig können sich die Peakflächen ändern. Die Parameter des Autotune<sup>22</sup> waren Schwankungen unterworfen, die besonders beim Elektronenvervielfacher hoch waren (siehe Abb. 6). Er kann zwar die Empfindlichkeit erhöhen, dabei aber auch die Basislinien (s. Abb. 7).

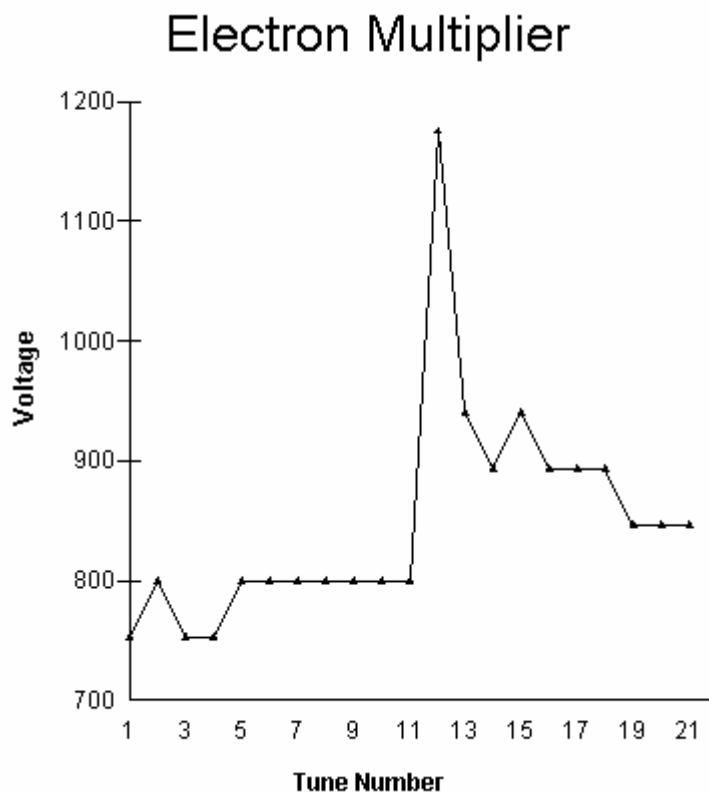


Abbildung 6: Änderung der Spannung des Elektronenvervielfachers über 21 Autotunes

<sup>22</sup> Dafür wird Octafluornaphthalin eingesetzt.

### 3.6 Methodvalidierung

Um die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit des ersten Elutionsschritt mit Hexan (Kapitel 3.4, Punkt 15) zu überprüfen, wurde wie folgt vorgegangen:

1. 200 ml destilliertes Wasser wurden mit 5 µg <sup>12</sup>C-Koffein und 1 µg <sup>13</sup>C-Koffein dotiert und einer SPE unterzogen.
2. Die erste Elution erfolgte mit Hexan, die zweite mit Aceton.
3. In beide Vials wurde als WS 0,5 ml mit 50,6 µg/ml 1,7-Dimethylxanthin gegeben.
4. Die Gemische wurden bis zur Trockene eingengt und erneut mit Aceton in Lösung gebracht (später wurde von Aceton als Lösungsmittel abgerückt).
5. Schließlich erfolgte ein Vergleich der enthaltenen Koffeinemengen.

Der Verlust an Koffein betrug maximal 0,5 %. In einem Total Ion Chromatogram wurden die Flächeneinheiten der coeluierten Substanzen verglichen. Diese waren im Hexan weitaus höher. Der geringe Verlust ist also die größere Sauberkeit wert. Für Ethylacetat waren die Verluste aber zu hoch.

Im Verhältnis Identifier-Ion zu Qualifier-Ion ergab sich bei 12 Proben (aus Kapitel 6.3) ein VK von 8 % für <sup>12</sup>C-Koffein bzw. 5 % für <sup>13</sup>C-Koffein.

Die Wiederfindungsrate (s. Kapitel 3.3) betrug gleichermaßen für das <sup>12</sup>C-Koffein wie auch für das <sup>13</sup>C-Koffein 75 %<sup>23</sup>.

Die Software bietet die Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses an. Ein Verhältnis von 3 wurde als Nachweisgrenze, eines von 10 als Bestimmungsgrenze angesetzt. Falls diese Möglichkeit nicht besteht, kann die Bestimmungsgrenze z.B. bei der Konzentration angesetzt werden, die zu einem VK von 10 % führt [Fries].

Das Signal wurde im Intervall 11,87-12,07 min (es sollte das Maximum beinhalten) abgegriffen, das Rauschen im Intervall 10,5-11,7 min (möglichst ohne deutliche Peaks anderer Substanzen).

Bei Berücksichtigung von Aufkonzentrierung und Wiederfindungsrate während der SPE wäre die Bestimmungsgrenze für die Ausgangskonzentration in der Probe bei 7 ng/l für die Injektion aus einem Vial bzw. bei 1 ng/l für die Injektion aus einem Mikroinsert.

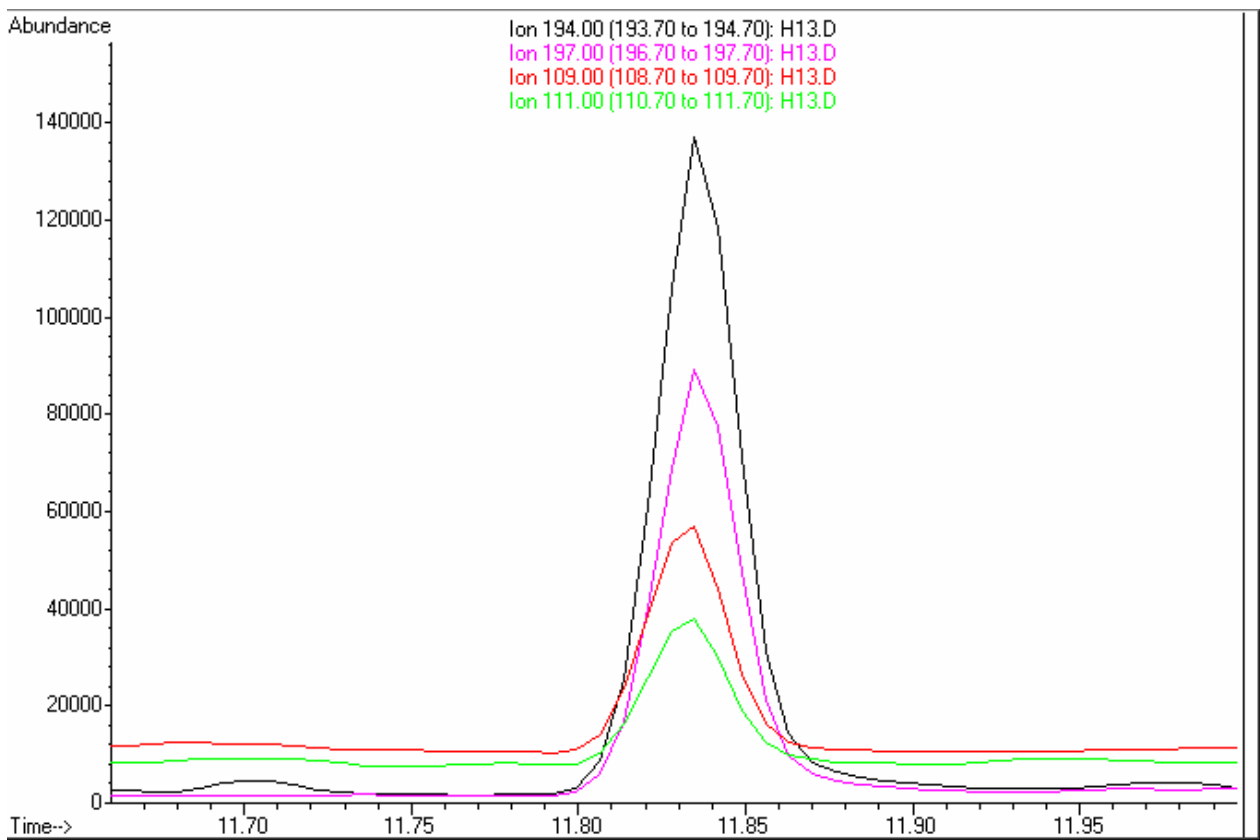
Die ermittelten Bestimmungsgrenzen sind relativ gut im Vergleich zu anderen Arbeiten (siehe Tabelle 8). Dies könnte daran liegen, dass in diesen Arbeiten in einem SIM auch noch andere Zielsubstanzen abgefragt wurden, was die Scan-Zykluszeit erhöht.

Nichtsdestotrotz erschwerte ein Tailing im Koffein-Peak dessen Integration (siehe Abb. 7, der Simazin-Peak sah schmaler aus), möglicherweise ist Koffein für die Aufgabe auf die GC-Säule zu polar.

Man hätte den IS auch gleich bei der Probenahme zugeben können. So wäre die Quantifizierung unbeeinflusst von einer möglichen Dissipation während der Lagerung (siehe Übersicht zu Kapitel 6), der Verbrauch am teuren IS in der Tagesmischprobe hätte sich aber fast verfünffacht.

---

<sup>23</sup> bei [Barber et al. 2] betrug sie 60 %



**Abbildung 7: Ausschnitt des Chromatogramms der Probe aus der Hase flussaufwärts (3) vom 26.09.06 zur Retentionszeit von Koffein im SIM für die Massenspuren 194, 197, 109 und 111**



## 4 Berechnungen

### 4.1 Berechnung der Konzentration im Effluent

Da das Wasser aus dem Effluent der Kläranlage Probleme bei der Filtration verursachte, konnte die dortige Konzentration nur über folgenden Ansatz berechnet werden, der das Konzentrationsgefälle in der Hase ausnutzt.

$L$ : Fracht,  $C$ : Konzentration,  $Q$ : Durchfluss

$$L = C * Q$$

$I$ : Hase flussaufwärts, 2: Effluent Kläranlage, 3: Hase flussabwärts (siehe dazu Abb. 8<sup>24</sup>)  
gemessen werden:  $C1, C3$   $Q2, Q3$  von [PM Hr. Glins<sup>25</sup> u. NLWKN<sup>26</sup>]

$$Q1 = Q3 - Q2$$

$$C2 = (C3 * Q3 - C1 * Q1) / Q2$$

### 4.2 Berechnung des Anteils ungeklärter Abwässer

aus [Buerge et al. 2]

$P$ : Bevölkerung,  $I$ : Input pro Person,  $f$ : Anteil des ungeklärten Abwassers

$$L_{Fluss} = L_{ungeklärt} + L_{geklärt}$$

mit

$$L_{Fluss} = C_{Fluss} * Q_{Fluss} = P * I_{Fluss}$$

$$L_{ungeklärt} = P * f * I_{ungeklärt}$$

$$L_{geklärt} = P * (1 - f) * I_{geklärt}$$

$$f = (I_{Fluss} - I_{geklärt}) / (I_{ungeklärt} - I_{geklärt})$$

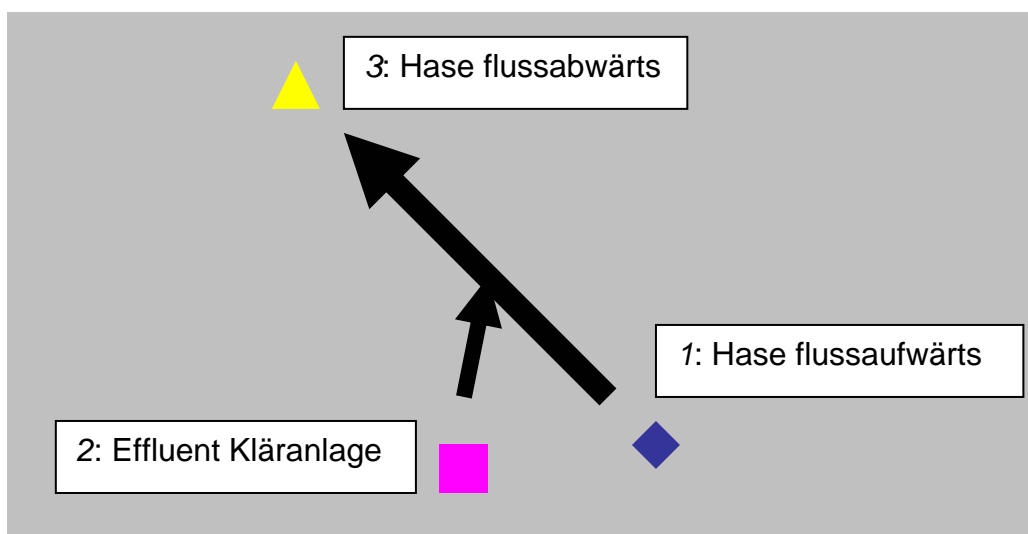


Abbildung 8: Legende für die Bezeichnung der Variablen und die Symbole in den Diagrammen

<sup>24</sup> als Merkhilfe: 1 und 2 ergibt 3. Und 3 ist dreieckig. Da es keine Ein- und Zweiecke gibt, Vierecke.

<sup>25</sup> in stündlicher Auflösung

<sup>26</sup> in viertelstündlicher Auflösung aus Pegeldaten

## 5 *Eigenheiten des Untersuchungsgebietes*

### 5.1 **Der Fluss**

Die Hase ist insgesamt etwa 170-193 km lang (abhängig von der Auflösung des fraktalen Gebildes), entspringt im Teutoburger Wald und mündet in Meppen in die Ems. Insgesamt leben 597000 Menschen im Einzugsgebiet der Hase, davon sollen schätzungsweise 10 % [PM Jürgen Berlekamp] nicht an die Kanalisation angeschlossen sein.

Im Zeitraum 1993-1999 hat sich die biologische Gewässergüte der Hase in der Innenstadt und dem Eingangsbereich der Stadt von der Gewässergüteklasse II –III (kritische Belastung) auf GGK III (starke Verschmutzung) verschlechtert. Unterhalb der Kläranlage ist noch die GGK II – III (1993 und 1999) vorherrschend (insgesamt gibt es 5 Klassen) [NLWK].

GGK III wird wie folgt umschrieben [Wasser-Wissen]:

„Gewässerabschnitte mit starker organischer, sauerstoffzehrender Verschmutzung und meist niedrigem Sauerstoffgehalt; örtlich Faulschlammablagerungen; Kolonien von fadenförmigen Abwasserbakterien und festsitzenden Wimpertieren übertreffen das Vorkommen von Algen und höheren Pflanzen; nur wenige gegen Sauerstoffmangel unempfindliche tierische Makroorganismen wie Egel und Wasserasseln kommen bisweilen massenhaft vor; mit periodischen Fischsterben ist zu rechnen. Diese Verhältnisse deuten auf Abwassereinleitungen hin. Der Saprobienindex liegt zwischen 2,7 und 3,2. Sauerstoff ist noch stets vorhanden, kann jedoch zeitweise auf Werte um etwa 2 mg/l absinken<sup>27</sup>. Häufig beträgt der BSB5 7 bis 13 mg/l. NH4-N liegt meist über 0,5 mg/l und erreicht oft einige Milligramm je Liter.“

Auch um die Gewässerstrukturgüte der Hase im Stadtgebiet ist es sehr schlecht bestellt: Güteklasse VI (von insgesamt 7 Klassen).

### 5.2 **Das Kanalnetz**

2005 hatten die Schmutzwasserkanäle im Stadtgebiet eine Länge von 457 km, die Regenwasserkanäle 477 km und Mischwasserkanäle 24 km (sind anteilig 5 %). Davon wurden 2005 303 km, 200 km bzw. 12 km einer Reinigung unterzogen und dabei 886 t Rückstände entnommen [Stadtverwaltung]. Bei der Massenbilanz von Schadstoffen sollte dies berücksichtigt werden, Koffein weist aber eine geringe Sorption an Partikeln auf.

Um die Bildung dieser Kanälrückstände zu verringern, besteht der Hauptteil der Schmutzwasserkanäle aus lasiertem Steinzeug mit besonders glatter Oberfläche. Auch die noch bestehenden Mischwasserkanäle sollen durch getrennte Schmutz- und Regenwasserkanäle ersetzt werden. Für das Wasser aus der Mischkanalisation stehen in ausreichender Kapazität Ausgleichsbecken bereit, so dass ein Überlauf auch bei starken Niederschlagsereignissen nicht eintritt. Für Abwasser aus dem Stadtzentrum wird eine Aufenthaltsdauer von durchschnittlich zwei Stunden angegeben. [Kläranlage]

---

<sup>27</sup> Nichtsdestotrotz konnte ein großes Vorkommen des europaweit geschützten Steinbeißers (*Cobitis taenia taenia*) zwischen Schellenbergbrücke und Neuer Mühle aufgefunden werden. Dieser Fisch bevorzugt eigentlich sauerstoffreiches Wasser, er kann aber durch akzessorische Darmatmung auch den Sauerstoff aus an der Wasseroberfläche verschluckter Luft nutzen [Stadtverwaltung].

### 5.3 Die Abwasserbehandlung

Seit 1993/94 ist die [Kläranlage] in Eversburg mit einer Nitrifikation, Denitrifikation und einer biologischen Phosphatelimination in der biologischen Reinigungsstufe ausgestattet. Das Klärwerk Hellern empfängt die Abwässer aus den Stadtteilen Hellern und Sutthausen sowie aus der Gemeinde Hasbergen. Vom Osnabrücker Abwasseraufkommen bewältigt sie 10 %. Die Einleitung erfolgt hier in die Düte.

[Buerge et al. 1] vermerkten für die Kläranlagen in ihrer Untersuchung das Alter des Belebtschlamm. In der Kläranlage OS laufen vier parallele Belebtschlammbecken, das durchschnittliche Alter soll 20 Tage betragen. Bei einem GAU für die Mikroorganismen wird das kontaminierte Wasser durch eine einzige Straße geleitet, der Klärschlamm entfernt und durch Impfung mit einer Bakterienkultur neu angesetzt [PM Hr. Glins].

Bei einem Zulauf von  $40000 \text{ m}^3/\text{d}$ <sup>28</sup> beträgt die Aufenthaltszeit in der Kläranlage in Eversburg etwa 1,5 Tage. Für den Schönungsteich kann über dessen Volumen von  $50000\text{-}80000 \text{ m}^3$  [PM Hr. Glins] eine durchschnittliche<sup>29</sup> Verweilzeit von 1,25-2 Tagen abgeschätzt werden. Somit ergibt sich für den gesamten Kläranlagenkomplex eine Aufenthaltszeit von 2,75-3,5 Tagen.

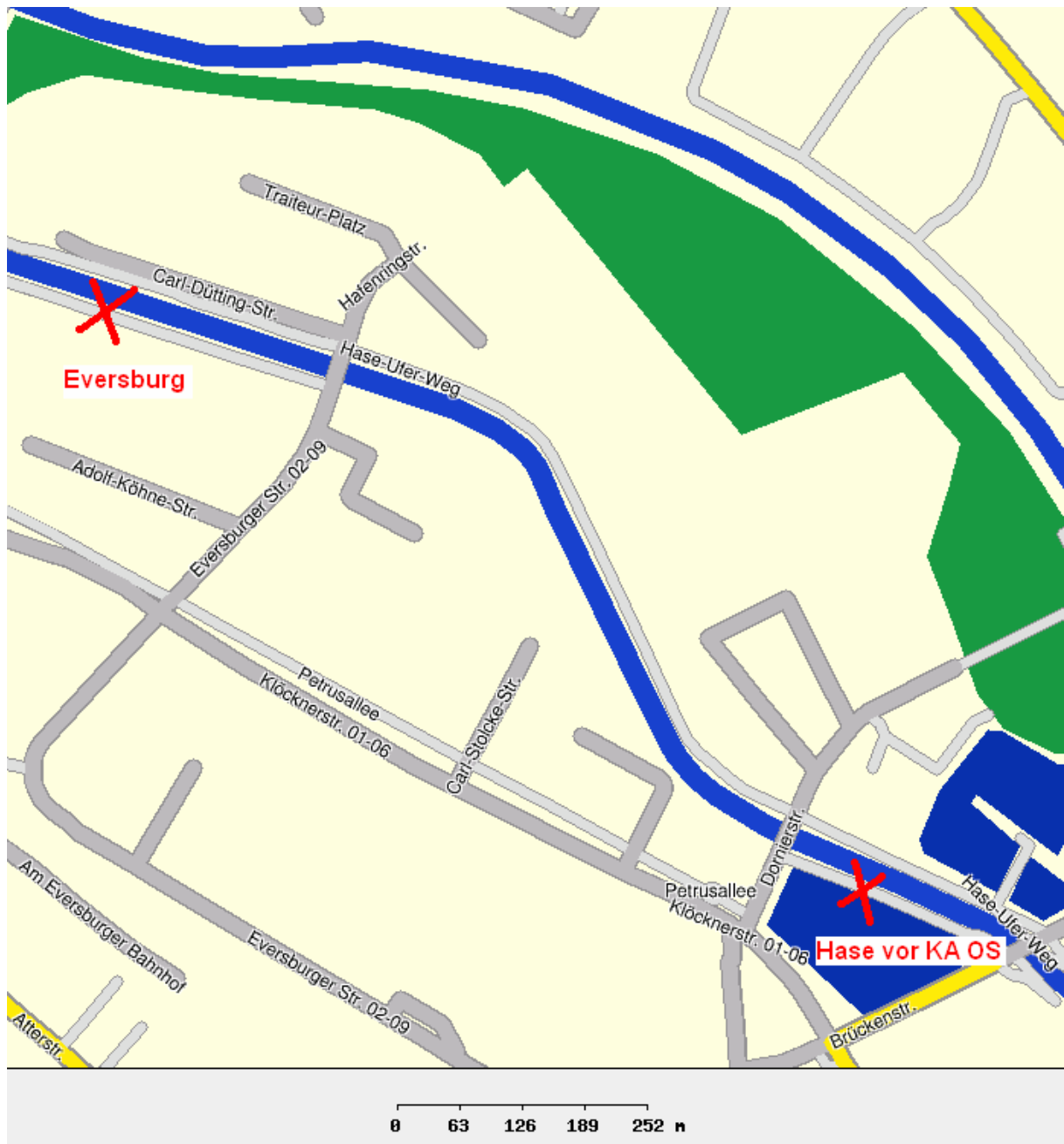
In einem kleinen Projekt [Priegnitz] wurde für diesen Flussabschnitt schon die Durchmischungstrecke für die transversale Dispersion ermittelt: Nach 420 m weichen die Konzentrationen im Flussprofil um maximal 5 % voneinander ab. Ein Kilometer Fließstrecke dürfte so einen ausreichenden Sicherheitsabstand darstellen<sup>30</sup>. In Abb. 9 sind die Standorte der beiden automatischen Probennehmer skizziert. Südlich vom Standort „Hase vor Kläranlage Osnabrück“ befindet sich der Schönungsteich, der neben der Brücke Dornierstraße in die Hase einleitet. Nördlich der Hase verläuft der Stichkanal zum Hafen.

---

<sup>28</sup> Im Probenahmezeitraum waren es im Mittel  $42941 \text{ m}^3/\text{d}$ .

<sup>29</sup> Im Herbst kann für einen dimiktischen See eine gute Durchmischung des Wasserkörpers angenommen werden.

<sup>30</sup> [Buerge et al. 1] konnten in der Limmat 6 km unterhalb der Kläranlage noch einen Konzentrationsgradienten feststellen ( $64$  bzw.  $48 \text{ ng/l}$ ).



**Abbildung 9: Flussabschnitt der Hase und Aufstellungsort der beiden automatischen Probennehmer**  
**Karte aus Freie Vektor-Geodaten Osnabrück (Fa. Intevation)**

## 6 Ergebnisse

### Übersicht

Von Maik Bischoff wurden Tagesmischproben aus dem Zeitraum 14.11.05 - 01.01.06 für die Standorte Eversburg und Lüstringen (flussaufwärts, im Südosten der Stadt) zur Verfügung gestellt. Die Zeiträume der vorhandenen Proben aus beiden Standorten waren nicht völlig kongruent (siehe Abb. 10). Die Lagerung war nicht optimal, da sie ursprünglich nicht für eine Analyse von Koffein gedacht waren. Diese Proben wurden zu Wochenmischproben zusammengestellt (Kapitel 6.1).

Es wurde überprüft, ob die Probennehmer für eine Lagerung geeignet sind. Hierfür wurde mit Koffein dotiertes Wasser aus der Hase vor dem Kläranlagen-Einlauf genommen und in zeitlichen Abständen Aliquots für eine Analyse entnommen werden. Es wurden verschiedene Lagerungsbedingungen getestet (ob mit  $\text{NaN}_3$  versetzt, ob gekühlt, ob dunkel). Nach einer Sichtung der Abbauraten in der Literatur (siehe Tabelle 3) konnten die Versuchsreihen aber eingestellt werden. Ebenso wurde die Untersuchung des Absorptionsspektrums von Koffein (man kann es mit dem Immissionsspektrum der Sonne bei unbewölkter Atmosphäre vergleichen) mit einem Photometer fallengelassen, da auch hierzu schon Angaben in der Literatur existieren<sup>31</sup>.

Die Beprobung eines abgelegenen Gewässers im Osnabrücker Raum sollte die Frage beantworten, ob Koffein tatsächlich nur bei einem direkten anthropogenen Einfluss feststellbar ist oder schon ubiquitär vorkommt (Kapitel 6.2).

Weitere Probenahmen sollten einmal den räumlichen Konzentrationsverlauf in der fließenden Welle (Kapitel 6.2) und dann den zeitlichen Konzentrationsverlauf in Hase und Kläranlage zeigen (Kapitel 6.3). Aus letzterem sollte die Variabilität der täglichen Frachten bestimmt werden.

---

<sup>31</sup> Das Absorptionsmaximum einer wässrigen Koffeinlösung in UV-Licht liegt bei 272 nm [Arnaud].

## 6.1 Auswertung der Wochenmischproben

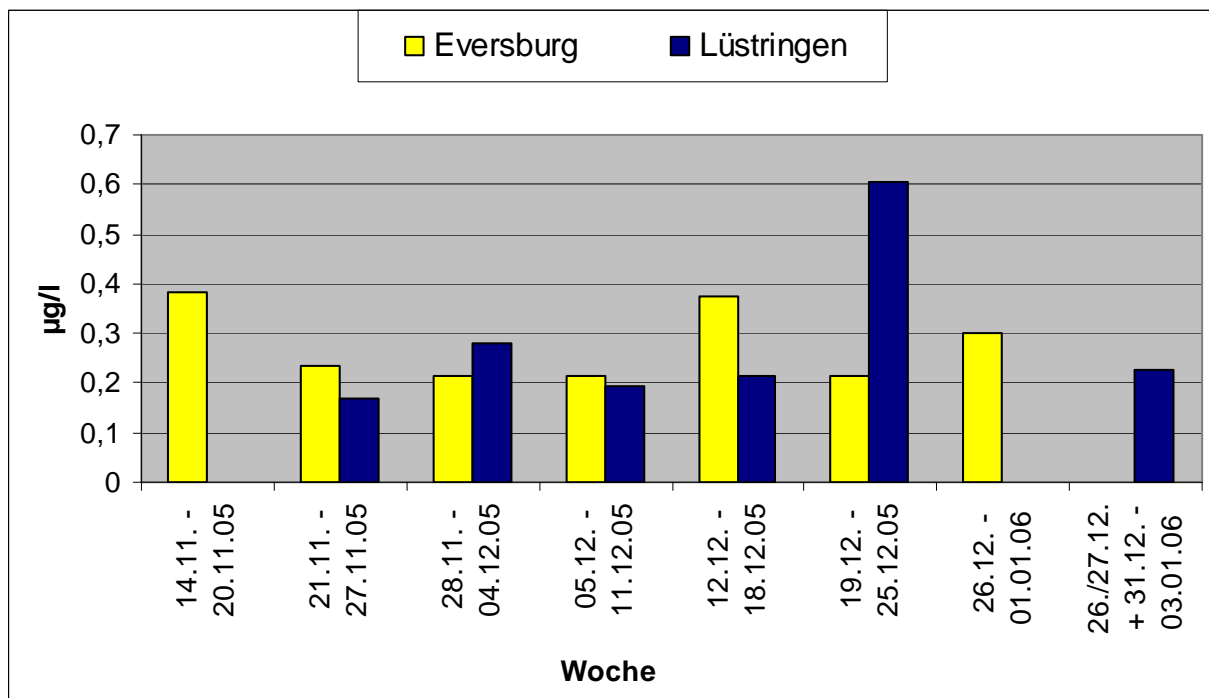


Abbildung 10: Koffeinkonzentration in den Wochenmischproben 14.11.05 - 01.01.06

Tabelle 5: mittlere Koffeinkonzentration in den Wochenmischproben vom 14.11.05 - 01.01.06 und Vergleich mit Tagesmischproben vom 26.09.06 - 08.10.06

Standort	Wochenmischproben		Tagesmischproben	
	Mittelwert	Var.koeff.	Mittelwert	Var.koeff.
	in µg/l	in %	in µg/l	in %
Lüstringen	0,292	62	-	-
Standort 1	-	-	0,285	44
Standort 3 / Eversburg	0,277	28	0,274	26

Zwischen den Standorten Lüstringen und Standort 1 liegen einige Kilometer Fließstrecke, beide liegen vor der Kläranlage. Standort 3 / Eversburg war für beide Probenahmen identisch. Wochen sind mit Tagen nicht direkt vergleichbar, es ergibt sich aber ein ähnliches Bild: Es fällt auf, dass in beiden Messreihen die Koffeinkonzentration in der Hase vor der Kläranlage höher ist als dahinter. Der Kläranlagen-Effluent führt also sogar zu einer Verdünnung in der Hase. Auch sind die Schwankungen hinter der Kläranlage kleiner, sie werden durch die gleich bleibende Leistung der Kläranlage nivelliert.

## 6.2 Ergebnisse des Screenings und aus der fließenden Welle

### Screening

Die Koffeinkonzentration im Manelito-See im Nordwesten von Osnabrück (hinter dem Attersee) liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Der See ist ein ehemaliges Sandabbaugebiet für den Autobahnbau, wird durch Grundwasser gespeist (beim Herumlaufen wurde kein Zulauf entdeckt) und liegt abgeschieden in einem Vogelschutzgebiet. Eine Probe aus dem Rhein bei Flusskilometer 555 wurde verworfen aufgrund unzureichender Lagerung.

### Vorgehen für die fließende Welle

Für die fließende Welle wurde am 21.04.06 eine Strecke von 3,5 km Länge hinter der Durchmischungsstrecke bis zur Einmündung der Düte mehrmals beprobt. Die mittlere Fließgeschwindigkeit betrug weniger als 0,5 m/s, so dass die Probenahmen einen Zeitraum von 2,5 Stunden umfassen. Der damit verbundene Spaziergang verschaffte einem einen guten Überblick über das Untersuchungsgebiet.

Als Tracer der Fließgeschwindigkeit wurden Orangen eingesetzt, die öfters durch Kehrwasser und die starke Verkräutung in ihrem Fortkommen behindert wurden. Die Probenahme empfiehlt sich zu zweit an beiden Uferseiten, um hängen gebliebene Orangen schnell wieder befreien zu können. Sonst müssen Brücken für eine Querung des Flusses aufgesucht werden. Zumindest eine Orange sollte immer unterwegs sein.

Die Orangen zeigen auch die Varianz der Fließgeschwindigkeit. Wenn sich die Abstände auf etwa 100 m vergrößert hatten, wurden die vordersten und hintersten Orangen wieder bei der mittleren Orange eingesetzt.

In der fließenden Welle wurde keine nennenswerte Biodegradation über den kurzen Zeitraum erwartet, das sonnige Wetter könnte in dem flachen Gewässer aber Photodegradation gefördert haben. Um Abbauvorgänge registrieren zu können, bräuchte man jedoch einen längeren Flussabschnitt ohne Einleitungen und Zuflüsse.

### Entwicklung von Temperatur, Leitfähigkeit und Wasserstand

Die Wassertemperatur stieg am Ausgangspunkt in Eversburg zwischen 11-16 Uhr von 13,6 auf 14,4 °C. Die Leitfähigkeit änderte sich dort von 987 auf 1002 µS/cm. Ein Einlauf am rechten Ufer aus einer Firma vor der ersten Brücke wies eine erhöhte Leitfähigkeit von 1270 µS/cm auf, der Durchfluss betrug aber nur wenige Liter pro Sekunde. Alle anderen Zuflüsse hatten eine geringere Leitfähigkeit als die Hase.

Einen deutlichen Verdünnungseffekt dürfte es nur bei einem Bachlauf auf der linken Uferseite gegeben haben. Der Pegelstand erhöhte sich innerhalb von 4 Stunden um 4 cm.

Am Zusammenfluss von Hase und Düte hat die Düte eine geringere Temperatur und Leitfähigkeit (12,5 °C und 714 µS/cm gegenüber 14,6 °C und 986 µS/cm). Da keine Probenahmebehälter mehr zur Verfügung standen, konnte hier leider keine Wasserprobe mehr entnommen werden.

## Entwicklung der Koffeinkonzentration

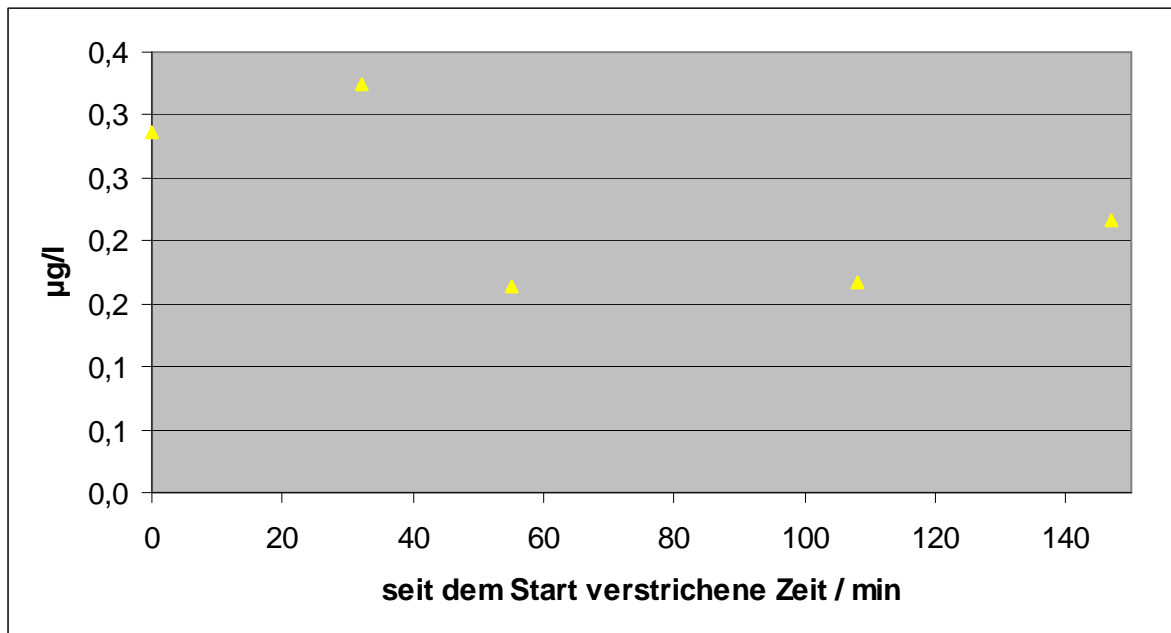


Abbildung 11: Konzentrationsverlauf in der fließenden Welle über die Fließdauer

Die Schwankungen sind unerwartet hoch. Wenn der Konzentrationsrückgang zwischen Minute 32 und 55 auf den einen Bach zurückzuführen ist, wurde dessen Durchfluss nicht so groß vermutet. Der neuerliche Anstieg lässt sich erstmal nicht aus den räumlichen Gegebenheiten erklären, außer durch eine versteckte Einleitung der Anwohner. Alle Leitfähigkeitswerte waren aber unauffällig. Erst die Düte würde den Effluent aus der Kläranlage Hellern (siehe Kapitel 5.3) zuführen.

Andererseits könnte es sich statt räumlicher auch um tageszeitliche Schwankungen handeln, obwohl dies ja durch die Herangehensweise vermieden werden sollte. Die Strömung ist aber im Profil nicht einheitlich. Um diese tageszeitlichen Schwankungen zu registrieren, hätte man parallel dazu am Ausgangspunkt in Eversburg den bereits dort aufgestellten Probenehmer zur Erstellung von 12 viertelstündigen Proben nutzen können. Da diese Schwankungen nicht in dieser Stärke erwartet wurden (der Hinweis darauf in [Buerge et al. 2] war zu dem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht), wurde dies leider versäumt. Jedenfalls erscheint hier die Erstellung von Tagesmischproben als sinnvoll.



### 6.3 Variabilität der täglichen Frachten

( Bei einer ersten Probenahme im Zeitraum 28.07.06 - 08.08.06 stellte sich der Extrakt aus der Kläranlage als gefärbte (evtl. auch Huminstoffe), zähe Flüssigkeit dar. Eine Aufgabe auf die empfindliche GC-Säule wurde aufgegeben. Ein Probenehmer wurde daraufhin umgesetzt. Zwischenzeitlich wurde auch die Filtration optimiert.)

Die Probenahme lief über 12 Tage vom 26.09.06 - 08.10.06, jeder Tag startet 18 Uhr. Der Zeitraum wurde auch gewählt, weil am 29.09.06 der erste „Tag des Kaffees“ stattfand, eine Marketingkampagne vom Deutschen [Kaffeeverband], die mit Produkteinführungen und Gratisproben von Marktführern wie Tchibo und Starbucks verbunden war. Es war fragwürdig, ob dieser Tag einen messbaren Einfluss auf das Konsumverhalten haben würde<sup>32</sup>.

Am 4. Tag wurden nur 1959 ml angesaugt, am 5. Tag war die angesaugte Menge zu gering, um sie auszuwerten (darum Lücken in den Abb. 12 u. 13). Vielleicht war hier die Öffnung des Schlauches verstopft, an einem niedrigen Wasserstand kann es nicht gelegen haben.

**Tabelle 6: Statistik für die Werte von Durchfluss, Konzentration und Fracht während des Probenahmezeitraums 26.09.06 - 08.10.06 (Legende in Abb. 8)**

	<u>Mittelwert</u>	<u>Var.koeff.</u>
	in m <sup>3</sup> /s	in %
Q1	0,823	21
Q2	0,497	17
	in µg/l	
C1	0,285	44
C2	0,241	33
	in g/d	
L1	21,5	74
L2	10,4	34

Der mittlere Durchfluss im Effluent der Kläranlage Q2 ist im Verhältnis zur Hase Q1 beträchtlich (siehe Tabelle 6). Für den Pegel Eversburg waren 1951 - 1994 die Werte für den mittleren Abfluss MQ = 3,64 m<sup>3</sup>/s, für den mittleren Niedrigwasserabfluss MNQ 0,976 m<sup>3</sup>/s [Trapp]. Hier lag also ein niedriger Pegel vor.

Die Befürchtung, dass C1 unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen würde, konnte ausgeräumt werden. Im Gegenteil: Wie schon in Kapitel 6.1 erwähnt, war die Koffeinkonzentration in der Hase vor der Kläranlage (C1) höher als dahinter (C3). Mit dem in Kapitel 4.1 vorgestellten Ansatz konnte nun auch die Konzentration im Effluent der Kläranlage (C2) ermittelt werden.

In Eversburg (L3) fließen täglich durchschnittlich 31,9 g Koffein vorbei .

---

<sup>32</sup> Sollte der ausgeschenkte Kaffee nicht den Geschmack der Kundschaft treffen, wäre einiges direkt in den Ausguss gekippt worden und gerade dieser unverdaute Kaffee hätte die Fracht erhöht.

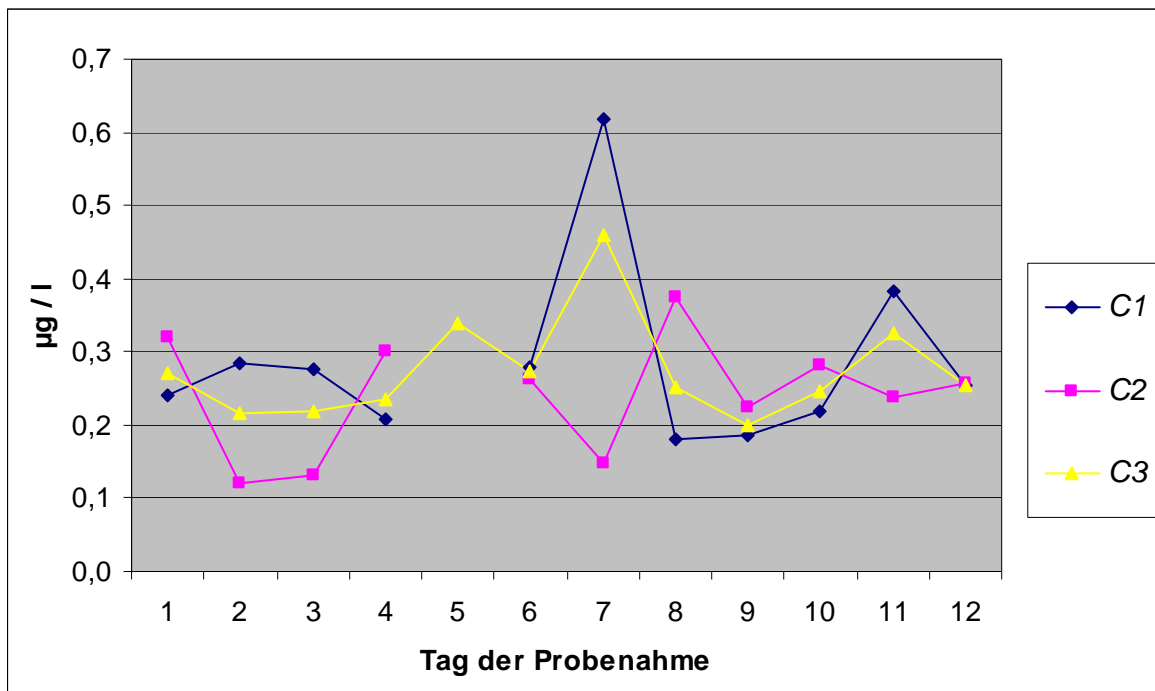


Abbildung 12: Konzentrationsverlauf 26.09.06 - 08.10.06 (Legende in Abb. 8)

Tatsächlich wurde 3 Tage nach dem „Tag des Kaffees“ eine Verdopplung der Konzentration (siehe Abb. 12) festgestellt, dies würde auch mit der Aufenthaltszeit in der Kläranlage zusammenpassen (siehe Kapitel 5.3). Nur lag diese Konzentrationserhöhung schon in der Hase flussaufwärts (C1) vor, die Konzentration im Effluent (C2) war an diesem Tag sogar relativ niedrig.

Werden die Durchflüsse mit in die Betrachtung einbezogen, können die Frachten ermittelt werden. Hier bot sich ein ähnliches Bild (Abb. 13), Verdünnungseffekte können ausgeschlossen werden. Der „Tag des Kaffees“ war also eine falsche Fährte.

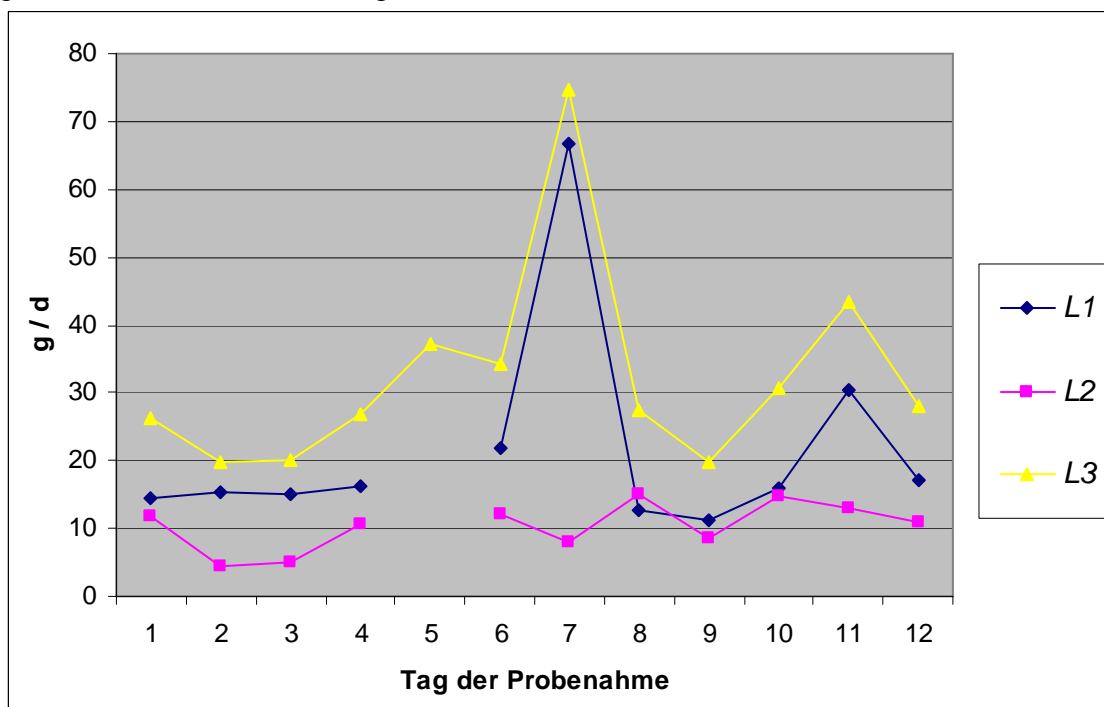
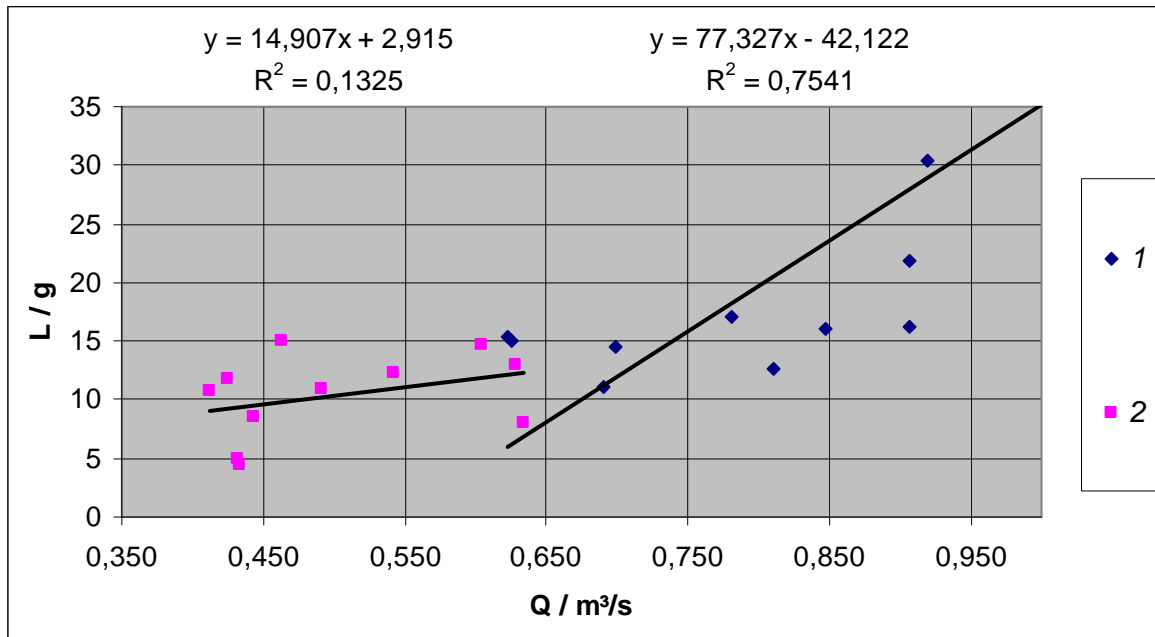


Abbildung 13: Verlauf der Frachten 26.09.06 - 08.10.06 (Legende in Abb. 8)

Es ist gerade umgekehrt: Die Fracht ( $L1$ ) steht in der Hase flussaufwärts mit dem Durchfluss ( $Q1$ ) in einem proportionalen Zusammenhang (s. Abb. 14). Für die Kläranlage ( $L2$  zu  $Q2$ ) gibt es diesen Zusammenhang nicht ( $R^2 \approx 0$ ).



**Abbildung 14: Korrelation zwischen dem Durchfluss  $Q$  und der Fracht  $L$  in der Hase flussaufwärts 1 und im Effluent der Kläranlage 2 mit Angabe der Gleichungen für die Ausgleichsgeraden und deren Bestimmtheitsmaß  $R^2$**

Die Durchflüsse sind auch vom Niederschlagsgeschehen abhängig. Darum wurden die Niederschlagswerte für Melle [PM Fr. Wolf], Osnabrück und Bad Salzuflen (nächste Wetterstation zu Melle; beide [Wetteronline]) und die Temperaturen für Osnabrück [Wetter] herangezogen (s. Abb. 15).

Tatsächlich gab es am 02.10. in Osnabrück ein starkes Niederschlagsereignis. Nur an 6 Tagen im Jahr 2006 fiel mehr Niederschlag (an 23 Tagen konnten keine Daten erhoben werden, das Maximum lag bei 21 mm). Am 06.10. gab es ein kleineres Niederschlagsereignis, das auch in Melle und Bad Salzuflen registriert wurde. Schaut man sich noch mal die Frachten an (Abb. 13), erkennt man auch an diesem Tag eine Erhöhung.

Nun ist die Frage, woher diese plötzliche Zunahme der Fracht kommt. Bevor dieser Frage weiter nachgegangen wird, sollen die flussaufwärts liegenden Quellen identifiziert werden.

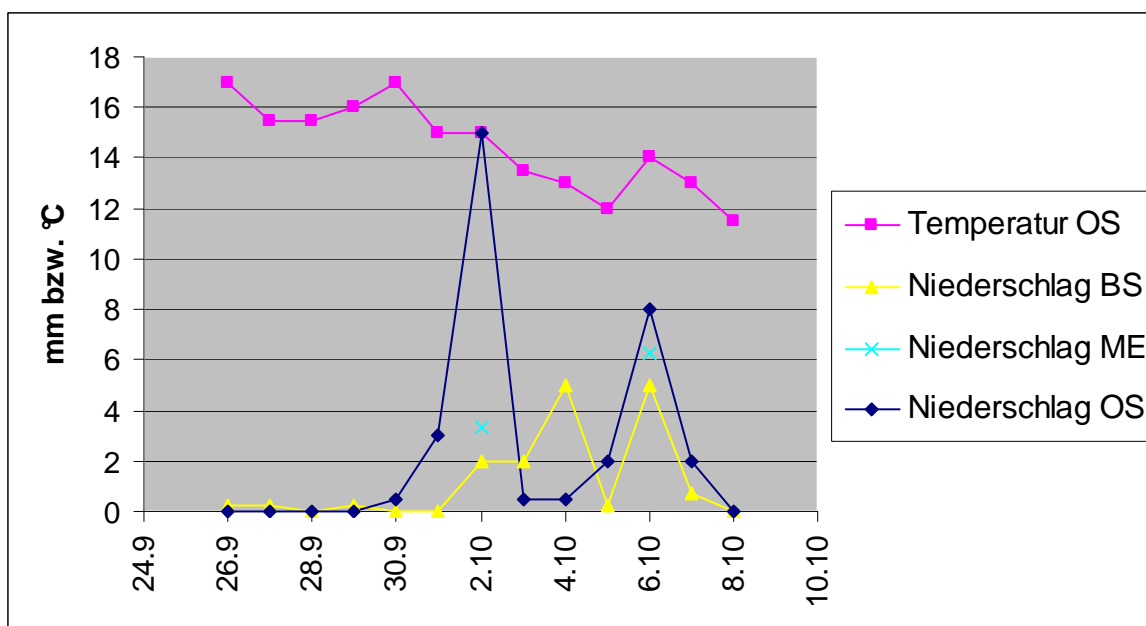


Abbildung 15: Temperatur- und Niederschlagswerte im Untersuchungsgebiet  
(OS: Osnabrück, BS: Bad Salzuflen, ME: Melle)

Flussaufwärts liegen folgende Kläranlagen (Tabelle 7):

**Tabelle 7: Liste der flussaufwärts in die Hase einleitenden Kläranlagen (EW: Einwohner).**

**Aus: Lagebericht des NLWKN 2005**

<u>Kläranlage</u>	<u>Kapazität</u>	<u>Belastung</u>	<u>davon EW</u>
Belm	16000	16000	12837
Bissendorf	6500	4400	3846
Melle	8000	10500	3748
Natbergen	6500	4800	3846
Rulle	6000	4500	4416
Schledehausen	5500	3400	<u>3255</u>
			<u>31948</u>
OS Eversburg	250000	195300	149315

Es fällt auf, dass die Kapazität der Kläranlage in Melle <sup>33</sup> nicht auf ihre tatsächliche Belastung ausgelegt ist. Die Differenz aus Belastung und Einwohnern (EW) sind die Einwohnerequivalente (EGW) aus der Industrie. Da im Einzugsgebiet der Hase keine Kaffeerösterei oder ähnliches bekannt ist, dürfte der Koffeineintrag <sup>34</sup> allein aus den privaten Haushalten stammen (EW).

Verteilt man die Fracht aus der Kläranlage OS (L2) auf die angeschlossenen EW kommt man auf einen mittleren Effluent von 0,0695 mg/d. Für die ungleich größere Fracht flussaufwärts (L1) stehen nur 31948 EW zur Verfügung (s. Tabelle 7).

Benutzt man die Fracht pro EW im Influent von 15,8 mg [Buerge et al. 1] lassen sich jetzt Eliminationsraten bestimmen. Demnach hätte die Kläranlage OS täglich einen Input von 2359 g zu bewältigen. Mit  $L2 = 10,4 \text{ g/d}$  ergibt sich eine Elimination von 99,6 % mit einem VK von nur 0,15 %.

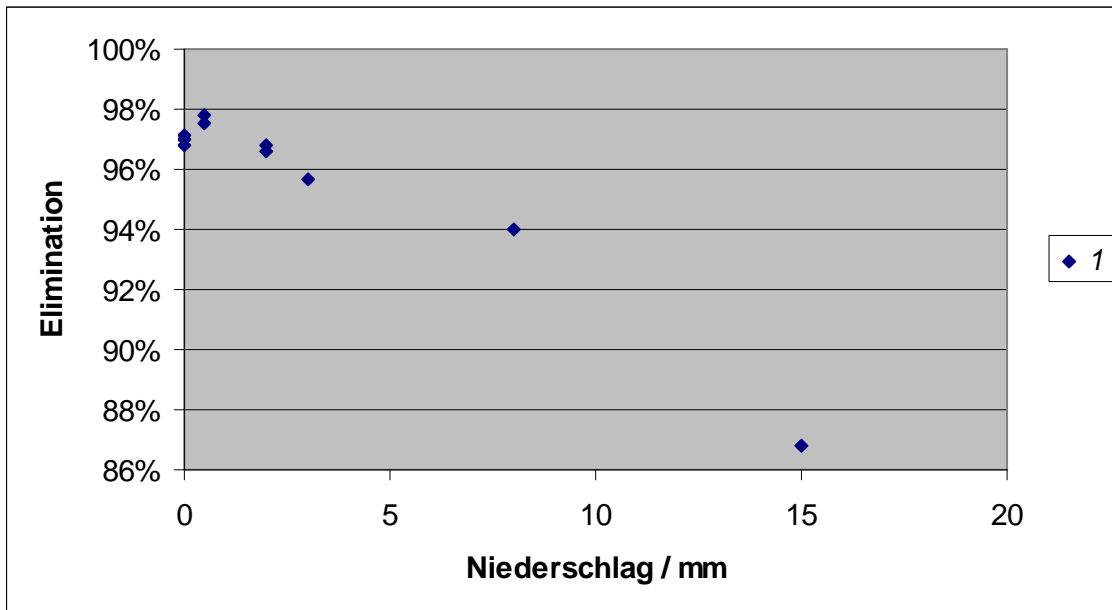
Der gesamte Input im Influent flussaufwärts müsste 505 g/d betragen, die mittlere Elimination dann nur 95,7 %, VK = 3,28 %.

Dass der Durchfluss keinen Einfluss auf die Leistung der Kläranlage OS hat, zeigt Abb. 14. Von den Kläranlagen flussaufwärts sollte man Ähnliches annehmen können. An dieser Stelle sei an die in den Kapiteln 1, 2.5 und 5.2 erwähnten Überlaufereignisse bei Mischwasserkanalisation erinnert.

Abbildung 16 ist darum etwas suggestiv: Die Bezeichnung „effektive Elimination“ wäre passender, da die Kläranlagen bei solchen Ereignissen umgangen werden. Allerdings soll auch bei den Kläranlagen flussaufwärts der Anteil an Mischwasserkanalisation gering sein [PM Maik Bischoff]. Bei einem Überlauf aus einem Rückhaltebecken tritt nicht die Verzögerung wie beim Passieren einer ganzen Kläranlage auf (siehe Kapitel 5.3).

<sup>33</sup> Würde die Kläranlage Melle vor der Hase-Bifurkation einleiten, flösse ein Teil der Abwässer über die Else in die Werre.

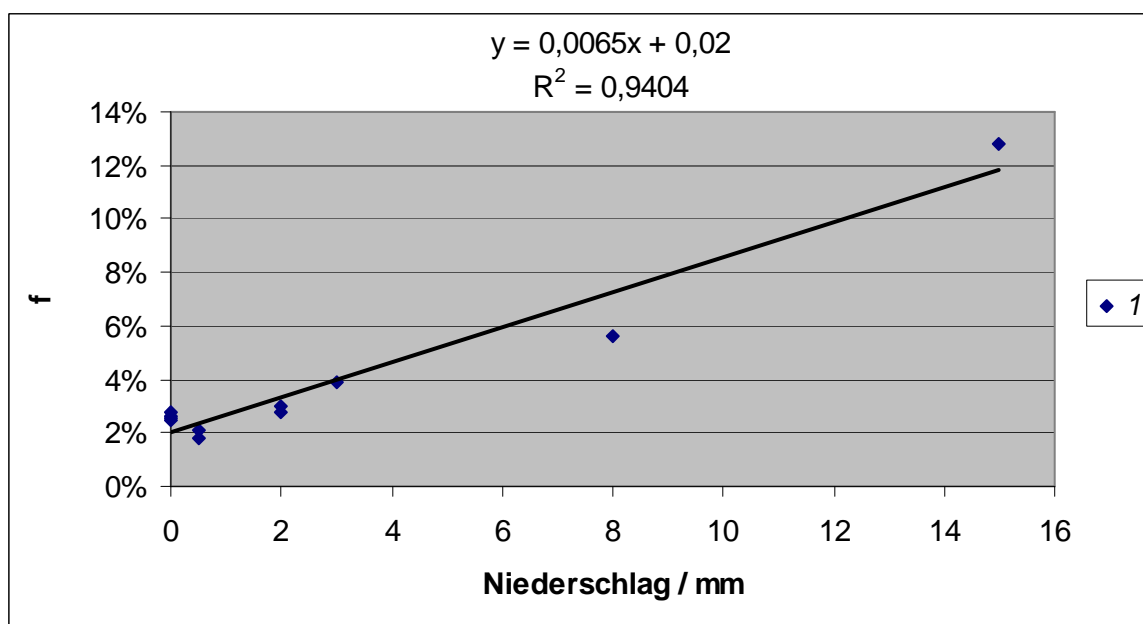
<sup>34</sup> Dieser könnte sogar noch etwas höher sein, weil auf der Fließstrecke von den einzelnen Kläranlagen flussaufwärts zu den Probennehmern schon etwas Abbau stattgefunden haben müsste.



**Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Niederschlag OS und effektiver Elimination, in der Hase flussaufwärts I**

Mit dem Ansatz aus Kapitel 4.2 kann nun der Anteil ungeklärter Abwässer  $f$  bestimmt werden. Prinzipiell stellt Abbildung 17 den gleichen Zusammenhang wie Abbildung 16 dar, nur wird hier die Beschriftung des Diagramms dem zugrunde liegenden Sachverhalt mehr gerecht. Bei Annahme einer „normalen“ Elimination von 99,6 % wie in der Kläranlage OS ergibt sich flussaufwärts ein mittlerer Anteil  $f$  von 3,8 % bei einem VK von 82 %.

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass die Koffeinfrachten in der Hase oberhalb der Kläranlage  $L1$  gut mit den Niederschlägen in OS korrelieren, das Bestimmtheitsmaß liegt bei 0,94.



**Abbildung 17: Korrelation zwischen Niederschlag und dem Anteil ungeklärter Abwässer  $f$  in der Hase flussaufwärts I mit Angabe der Gleichung für die Ausgleichsgerade und deren Bestimmtheitsmaß  $R^2$**

Es muss aber auf die räumliche Variabilität des Niederschlags hingewiesen werden (Abb. 15). Man könnte die Niederschlagsmenge gemäß der Relevanz für das Einzugsgebiet wichten, kumulieren und damit die Korrelation untersuchen.

### **Natriumazid stört Leitfähigkeit**

Leider wurde durch das Natriumazid eine Messung der Leitfähigkeit verfälscht<sup>35</sup>. Sonst hätte man sie mit der Koffeinkonzentration in Beziehung setzen können. Da sich Chloride im Gegensatz zu Koffein sehr konservativ bei der Abwasserbehandlung verhalten, dürften hier Überlaufereignisse keine Rolle spielen. So hätte man nur bei einem stetigen Anteil ungeklärter Abwässer eine Korrelation erwarten können. Dennoch ergab eine Einsicht in die Datenbank für das letzte Quartal 2005 von Maik Bischoff eine positive Korrelation zwischen Niederschlag und Chlorid. Hier wäre eigentlich ein gegenläufiger Trend zu erwarten.

Um diesen Nachteil nicht zu haben, könnte man den IS schon vorher zusetzen (siehe Ende von Kapitel 3.6).

## **7 Diskussion**

### **Wahl der Markersubstanz und der Methode**

Bis auf einen entlegenen See lag Koffein in dieser Arbeit immer über der Bestimmungsgrenze vor. Tabelle 8 fasst die Daten mehrerer Studien zusammen.

Wegen der hohen Abbauraten im Menschen halten [Wood et al.] Koffein für einen ungeeigneten Marker und schlagen vor, die Analytik auf die Metabolite auszurichten; so hatten [Barber et al. 1] auch 1,7-Dimethylxanthin im Programm. Jedoch sind auch diese nicht vor weiteren Abbau gefeit.

Das zeigt die Arbeit von [Kolpin et al.], in der 1,7-Dimethylxanthin nur in 28,6 % der Messstellen detektiert wurde (Maximum 3,1 µg/l, Median 0,11 µg/l). Dies kann auch mit Problemen in der GC-Säule zusammenhängen (siehe [Houghton] in Kapitel 3.3). Koffein konnten sie dagegen an 61,9 % bzw. 70,6 % der Messstellen nachweisen. Sie untersuchten Koffein mit zwei unterschiedlichen Methoden, wobei die HPLC der GC/MS bei der Nachweisgrenze überlegen war (0,014 bzw. 0,08 µg/l). Dies wird auch auf die unterschiedlichen Extraktionsmethoden zurückgeführt (gefilterte SPE bzw. ungefilterte kontinuierliche Flüssig-Flüssig-Extraktion (CLLE)). Allerdings mussten diese Methoden auch für 21 bzw. 46 Zielsubstanzen herhalten. Die An- und Abwesenheit von Koffein an einer Messstelle stimmte in 83,3 % der Fälle überein.

Auch für [Glassmeyer et al.] war die Nachweisgrenze bei Verwendung von LC/MS-ESI(+) niedriger als mit GC/MS. [Dash] hält zudem die Entwicklung von Biosensoren zum Koffeinnachweis für möglich.

[Prösch et al.] meinen, dass sich Koffein bei der routinemäßigen Untersuchung von Pestiziden problemlos miterfassen lässt und keinen Mehraufwand darstellt, sie benutzten GC/MS.

---

<sup>35</sup> Der Einfluss des  $\text{NaN}_3$  dürfte nicht unerheblich sein, da sich auch die Chlorid-Konzentration in der Hase bei etwa 150 mg/l bewegt. Die molaren Massen sind für Cl 35,453 g/mol und für  $\text{NaN}_3$  65,01 g/mol. Der Zusammenhang Konzentration-Leitfähigkeit dürfte nur bei niedrigen Konzentrationen annähernd linear sein. Bei der Dissoziation von  $\text{NaN}_3$  entsteht Stickstoffwasserstoffsäure, die mit einem Siedepunkt von 35,7 °C schon bei Zimmertemperatur ausgasen könnte. So könnte die Leitfähigkeit auch wieder abnehmen.

**Tabelle 8: Übersicht über verschiedene Studien zu Koffein**

**#: Anzahl der Probenahmeorte, RL: reporting level, MW: Mittelwert (MV: Mecklenburg-Vorpommern)**

<u>Schriftstück</u>	<u>#</u>	<u>Untersuchungsgebiet</u>	<u>RL</u> in µg/l	<u>MW bzw. (m) Median</u> in µg/l	<u>Maximum</u> in µg/l	<u>Häufigkeit &gt; RL</u> %
[Glassmeyer et al.]	40	USA	0,016	0,046	7,99	70
[Prösch et al.]	20	MV, Dtl.	0,05	0,1-0,5	1,27	9,1-100
[Buerge et al. 1]	~ 23 <sup>36</sup>	Schweiz	<sup>37</sup> 0,002	uneinheitliche Proben	0,25	nur einmal < RL
[Kolpin et al.] <sup>38</sup>	139	USA	0,014	(m) 0,081	6	70,6
[Barber et al. 2]	33	Boulder Creek, USA	0,028	-	0,28 bzw. 0,045 <sup>39</sup>	86 bzw. 100
diese Arbeit	5 + 2	Osnabrück, Dtl.	< 0,007	0,274	0,619	100

<sup>36</sup> auch Kläranlagen und Seen

<sup>37</sup> Nachweisgrenze wurde mit dem Mittelwert in fossilem Grundwasser plus dreifacher Standardabweichung festgelegt

<sup>38</sup> für HPLC

<sup>39</sup> Trocken- bzw. Regenzeit



### 7.1 Langfristige Konzentrationsänderungen (zu Kapitel 6.1)

Für die Wochenmischproben lohnt sich ein Blick in [Prösch et al.], wo über einen Zeitraum von 12 bzw. 24 Monaten jeden Monat eine <sup>40</sup> Probe gezogen wurde. Die höchsten Konzentrationen lagen im Winter vor. Dies kann einmal mit der geringen Wasserführung infolge niedriger Niederschlagsmengen und der Verminderung des Oberflächenabflusses durch Eis und Schnee begründet werden. (Der Winter 1995/96 wird von den Autoren auch als „Extremwinter“ bezeichnet.) Zum anderen führt im Winter die geringe Insolation zu einer geringen Bio- und Photodegradation. Geringe Interzeption und Wasserverbrauch der Pflanzen laufen diesem Trend aber entgegen.

In dieser Arbeit war kein solcher Trend auszumachen, vielleicht wegen der milden Witterung.

### 7.2 Kurzfristige Konzentrationsänderungen (zu Kapitel 6.2)

Zur Variabilität innerhalb eines Tages liegen bislang wenig Daten vor. [Buerge et al. 2] untersuchten die Frachten im Tagesgang und konnten ebenfalls keinen Einfluss des Durchflusses auf die Elimination feststellen (siehe Kläranlage OS in Abb. 14). Die Reinigungsleistung verschlechterte sich also kaum bei einem höheren Durchsatz, sie blieb stets über 99 %.

### 7.3 Mittelfristige Änderungen und Eignung als Marker (zu Kapitel 6.3)

[Buerge et al. 2] bekamen in der Ustermer Aa auch nennenswerte Frachten an relativ trockenen Tagen, was auf einen gleichmäßigen Input aus dem Pfäffikersee (die dortige Aufenthaltsdauer wird nicht angegeben) zurückgeführt wird. Das Bestimmtheitsmaß lag dort bei 0,61 und bei 0,91 in der Mönchaldorfer Aa (vgl. Abb. 17).

In der Region Greifensee konnte über eine Massenbilanz der Anteil ungeklärter Abwässer auf 1-4 % geschätzt werden. Dieser Anteil trägt wegen der sonst sehr effizienten Elimination in Kläranlagen zu einem beträchtlichen Teil der Frachten bei [Buerge et al. 1]. In [Buerge et al. 2] wurden für das jährliche Mittel von  $f$  2-3 % ermittelt. Im Greifensee gab es eine hockeyschlägerartige Korrelation für  $f$  und Niederschlag, d.h. ein Überlauf findet erst ab einem bestimmten Schwellenwert für Niederschlag statt.

Die Eliminationsrate der Kläranlage OS stimmt mit dem in [Buerge et al. 1] angegebenen Mittelwert überein. <sup>41</sup>

Zur Eignung von Koffein als Marker gibt es unterschiedliche Befunde:

Bei [Glassmeyer et al.] korrelierte es nicht mit Pharmazeutika. [Prösch et al.] konnten keine Korrelation der Koffeinkonzentrationen mit den Konzentrationen für Pestizide, Trichlor- und Tetrachlorethylen, EDTA und NTA feststellen (wobei dies für die beiden letzten Substanzen denkbar gewesen wäre, da sie in Waschmittelrezepturen für den Hausgebrauch auftauchen).

Bei [Buerge et al. 2] erwies sich Koffein als geeigneter Marker für Phosphor, obwohl die hydrophilen Eigenschaften der beiden Stoffe sehr unterschiedlich sind (P neigt dazu an Fe und Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zu sorbieren). Bei einer Elimination in der Kläranlage von 96-98 % führten diese Überlaufereignisse zu ähnlichen Frachten von Phosphor wie im regulären Effluent.

Die Frage ist also weiterhin, für welche Stoffe sich anhand der Koffeinkonzentration, und mit Hinblick auf die Anteile von Mischwasser und ungeklärtem Wasser, Frachten ermitteln lassen, wenn einmal deren typische Eliminationsraten bestimmt wurden.

---

<sup>40</sup> so ist man den Schwankungen ausgesetzt, Mischproben wären besser geeignet, waren dort aber nicht verfügbar

<sup>41</sup> Schließlich bedeutet die mittlere Koffeinkonzentration in der Hase von 0,279 µg/l schon eine Gefährdung des Krallenfrosches (s. Kapitel 2.6).

## **8 Ausblick**

### **Eignung von Fließgewässern zur Klärung des Ursprungs einer Kontamination**

Hat man in einem Gewässer eine Verunreinigung festgestellt, so lässt sich deren Ursprung in einem Fließgewässer weitaus leichter als in einem stehenden Gewässer identifizieren. Da die horizontale Durchmischung des Epilimnions auch in einem stehenden Gewässer rasch erfolgt, müssen an dessen Ufer alle Einleitungen überprüft werden. Im Fluss hingegen kann eine binäre Suche durchgeführt werden: mit einer Probenahme am Auslauf und einer in der Mitte des jeweiligen Abschnitts.

So kann jedes Mal eine Hälfte des Gewässers ausgeschlossen werden, sollte es sich tatsächlich nur um eine einzige Einleitung handeln. Auf diese Weise kommt man mit  $2 \cdot \log_2 n$  Probenahmen aus, wenn  $n$  die Anzahl der Einleitungen/Abschnitte darstellt. Nachteilig bei diesem Verfahren ist nur, dass für den jeweils nächsten Schritt erst das Ergebnis des vorherigen abgewartet werden muss – dies rechnet sich aber, wenn der Aufwand von der Zahl der Proben stark abhängig ist.

(vgl. Anhang V 1.3.3 „Überwachung zu Ermittlungszwecken“ in der EU-Wasserrahmen-[Richtlinie])

### **Eignung von stehenden Gewässern zur Bestimmung der langfristigen Immission**

Stehende Gewässer sind hingegen besser geeignet, um die langfristige Immission darzustellen, da die lange Aufenthaltszeit kurzfristige Immissionsschwankungen abdämpft. In den gemäßigten Breiten wird man es meist mit einem dimiktischen See zu tun haben. Hier muss beachtet werden, dass in einem tiefen See während der Winter- und Sommerstagnation für eine Verdünnung nur das Epilimnion zur Verfügung steht. Da die Tiefe der Sprungschicht zeitlich und räumlich nicht einheitlich ist, sind zur Konzentrationsbestimmung des gesamten Wasserkörpers der Frühling und der Herbst geeigneter.

### **Brauchbarkeit von Koffein in einem konkreten Fall an der Uni Osnabrück**

Eine Gruppe von Geographiestudenten aus Osnabrück unter Leitung von Prof. Lükenga untersuchte im Sommer 2005 auch die Wasserqualität in Kasasire in Malawi. Man beschränkte sich auf einige chemische Parameter (u.a. der Ammonium/Ammoniak- und der Nitrit- und Nitratgehalt), weil eine Bestimmung bakterieller Indikatoren vor Ort zu aufwendig gewesen wäre. Sie wäre auch später in Osnabrück nicht sinnvoll gewesen, da diese Bestimmung zeitnah zu erfolgen hat (siehe Kapitel 1). Kühl gelagerte und mit einem Mittel gegen mikrobiellen Abbau versehene Proben hätten mit der hier vorgestellten Methodik die Bestimmung einer fäkalen Kontamination ermöglicht .

## 9 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung einer Kontamination von Fließgewässern mit fäkalen Abwässern anthropogenen Ursprungs anhand der Koffeinkonzentration. Auch der Anteil ungeklärter Abwässer sollte so ermittelt werden. Im Fluss Hase bei Osnabrück/Deutschland wurden dafür zeitliche (kurzfristige (innerhalb 2,5 Stunden), mittelfristige (innerhalb 12 Tagen) und langfristige (innerhalb 8 Wochen)) und räumliche Konzentrationsänderungen gemessen. Die Konzentrationen im Effluent der Kläranlage Osnabrück konnten nicht gemessen, aber berechnet werden.

Koffein ist eine weit verbreitete Droge und stammt vor allem aus dem Kaffeekonsum, der 2004 in Deutschland pro Person 6,4 kg in 151 l Wasser ausmachte. Etwa 5 % werden vom Menschen unmetabolisiert ausgeschieden. In der Umwelt hat es eine ausreichende Persistenz.

Mikrobielle Abbauvorgänge bei der Lagerung im automatischen Probenehmer wurden durch Natriumazid zusätzlich verhindert, es verfälschte aber eine Messung der Leitfähigkeit. Ein erster Elutionsschritt bei der SPE mit Hexan beeinträchtigte nicht die Wiederfindung, die 75 % betrug. Dimethylxanthine (Metabolite von Koffein) waren wenig geeignet für eine Analyse im GC/MS. Tailing im Koffein-Peak störte aber auch dessen Integration, möglicherweise ist es für die Aufgabe auf die GC-Säule zu polar. Im Verhältnis Identifier-Ion zu Qualifier-Ion ergab sich ein Variationskoeffizient (VK) von 8 % für <sup>12</sup>C-Koffein bzw. 5 % für <sup>13</sup>C-Koffein. Die Bestimmungsgrenze lag bei 7 ng/l für die Injektion aus einem Vial bzw. bei 1 ng/l für die Injektion aus einem Mikroinsert.

In der fließenden Welle könnte es sich statt räumlicher auch um kurzfristige zeitliche Schwankungen gehandelt haben.

Bei der langfristigen, wie auch bei der mittelfristigen Messung waren die Koffeinkonzentrationen in der Hase vor der Kläranlage (Mittelwert (MW) = 0,292 bzw. 0,285 µg/l) geringfügig höher als dahinter (MW = 0,277 bzw. 0,274 µg/l), der Effluent führte also sogar zu einer Verdünnung in der Hase.

Auch sind die Schwankungen hinter der Kläranlage kleiner (VK = 62 bzw. 44 % ggü. 28 % bzw. 26 %), sie wurden durch die gleich bleibende Leistung der Kläranlage nivelliert.

Eine Konzentrationszunahme im Winter war nicht festzustellen, vielleicht wegen der milden Witterung. Der erste „Tag des Kaffees“ hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Koffeinkonzentrationen.

Die mittlere Koffeinfracht betrug im Zeitraum 26.09.06 - 08.10.06 in der Hase vor der Kläranlage 21,5 g/d (VK = 74 %), im Effluent 10,4 g/d (VK = 34 %).

Der Durchfluss hatte keinen Einfluss auf die Leistung der Kläranlage Osnabrück, ihre Eliminationsrate lag bei 99,6 % (VK = 0,15 %). Für die Kläranlagen flussaufwärts betrug sie nur 95,7 % (VK = 3,28 %).

In der Hase vor der Kläranlage bestand eine leichte positive Korrelation zwischen Fracht und Durchfluss (Bestimmtheitsmaß = 0,75). Dies war auf das Niederschlagsgeschehen und damit verbundene Überlaufereignisse aus Mischwasserkanalisation zurückzuführen. So war die Korrelation zwischen den Frachten und den Niederschlägen in Osnabrück auch besser (Bestimmtheitsmaß = 0,94).

Ein starkes Niederschlagsereignis (15 mm) ging einher mit einer Verdreifachung der Fracht. In der Hase vor der Kläranlage betrug der Anteil ungeklärter Abwässer 3,8 % (VK = 82 %).

### ***summary for 'Analysis of Caffeine as a Wastewater Marker in Rivers'***

The object of this thesis was to establish a method for quantifying the contamination of running waters with anthropogenic fecal wastewater on the basis of caffeine concentrations. Also the fraction of untreated wastewater should be determined.

Hence in the river Hase nearby Osnabrück/Germany temporal (short-term (within 2.5 hours), medium-term (within 12 days) and long-term (within 8 weeks)) and spatial changes of concentrations were measured. The concentrations in the effluent of the wastewater treatment plant (WWTP) Osnabrück could not be measured but computed.

Caffeine is a widespread drug and originates mainly from coffee consumption, which constituted in Germany 6.4 kg in 151 L water per person in 2004. About 5 % of the digested caffeine is excreted unmetabolized. In the environment it has a sufficient persistence.

Biodegradation during the storage in the automated sample drawing device was additionally prevented by sodium azide, however it falsified a measurement of the conductivity.

A first elution with hexane in the solid phase extraction did not impair the recovery, which amounted to 75 %. Dimethylxanthine (a metabolite of caffeine) was less suitable for an analysis via gas chromatography-mass spectrometry. Tailing within the caffeine peak disturbed its integration, too. Possibly it is too polar for the column.

The coefficient of variation (CV) for the ratio of identifier to qualifier ion was 8 % for <sup>12</sup>C-caffeine and 5 % for <sup>13</sup>C-caffeine. The limit of quantification was 7 ng L<sup>-1</sup> for the injection from a vial and 1 ng L<sup>-1</sup> for the injection from a micro-insert.

The fluctuations in the running water could also have emerged from a short-term temporal causation instead of a spatial causation.

In both the long-term and the medium-term measurement, caffeine concentrations in the river Hase upstream of the WWTP (arithmetic mean (AM) = 0.292 and 0.285 µg L<sup>-1</sup>, resp.) were slightly higher than downstream (AM = 0.277 and 0.274 µg L<sup>-1</sup>, resp.), thus the effluent even led to a dilution in the river.

Also the fluctuations downstream of the WWTP are smaller (CV = 62 and 44 % compared to 28 % and 26 %, resp.), they were levelled by the continuous performance of the WWTP.

A concentration increase in the winter was not observed, perhaps because of the mild weather. The first 'Day of Coffee' had likewise no influence on caffeine concentrations.

The mean caffeine load in the river Hase upstream of the WWTP from September 26, 2006 to October 08, 2006 was 21.5 g d<sup>-1</sup> (CV = 74 %), in the effluent it was 10.4 g d<sup>-1</sup> (CV = 34 %).

The flow rate did not affect the performance of the WWTP Osnabrück, its elimination rate was 99.6 % (CV = 0.15%). For the WWTPs upstream it was only 95.7% (CV = 3.28 %).

There was a small positive correlation between the load and the flow rate in the river Hase upstream of the WWTP (coefficient of determination = 0.75). This was due to precipitation and associated combined sewer overflows. Thus the correlation between the load and the precipitation in Osnabrück was better (coefficient of determination = 0.94).

A strong precipitation event with 15 mm led to a triplication of the load.

On the upstream side the fraction of untreated wastewater amounted to 3.8 % (CV of 82 %).

## ***10 Danksagung***

- Prof. Matthies für die Überlassung des Themas und für Geduld.
- Jörg Klasmeier für Spaziergänge neben Orangen in der fließenden Welle, das Abfüllen der Standardlösungen, Troubleshooting am GC-MS und haarsträubende Autofahrten am Gestade der Hase.
- Maik Bischoff für die Einweisung auf die Probenehmer und Mithilfe bei deren Inbetriebnahme, und für die Bereitstellung diverser Datensätze.
- Antje Möhlmeier für den Verleih von Laborbedarf zur Filtration und Eva Limpinsel für den Verleih einer Dispensette und Einweisung auf die Zentrifugation.
- Veronika Lötscher für Mithilfe bei der SPE.
- Der Werkstatt im Fachbereich Biologie für das unkomplizierte Drehen eines Adapters.
- Der Fa. Erica Rössler Strickerei (der Hausmeister verlegte eigens ein Kabel) und Hr. Sikora vom Klärwerk für die Gewährung eines Standplatzes für die Probenehmer.
- Hr. Glins vom Klärwerk und Fr. Sprengel vom NLWKN in Cloppenburg für Abflussdaten.
- Fr. Wolf vom Tiefbauamt der Stadt Melle für eine freundliche Auskunft.
- Hr. Rosemeyer für seine Gastfreundschaft in der Veranstaltung „Analytische Verfahren in der Organischen Chemie“.
- Fr. Kipp für eine eigenwillige Änderung meines Themas, welche mich erstmal vor methodische Probleme stellte: „Analyse von Koffern...“ Es ist wohl meinen kalligraphischen Fertigkeiten geschuldet.

## ***11 Literatur***

(nicht hier aufgeführte Quellen befinden sich im Verzeichnis mit Sekundärliteratur aus dem Internet, siehe Hinweis in der ersten Fußnote)

[Arnaud] M.J. Arnaud (1987): The pharmacology of caffeine. in: Prog. Drug. Res. 31, 273-313

[Ärzteblatt] Wolfgang Forth u. Olaf Adam (2001): Coffein: Umgang mit einem Genussmittel, das auch pharmakologische Wirkungen entfalten kann. in: Deutsches Ärzteblatt 98/43

[Barber et al. 1] Larry B. Barber, Sheila F. Murphy, Philip L. Verplanck, Mark W. Sandstrom, Howard E. Taylor, Edward T. Furlong (2006): Chemical Loading into Surface Water along a Hydrological, Biogeochemical, and Land Use Gradient: A Holistic Approach. in: EST 40, 475-486

[Barber et al. 2] Larry B. Barber, Edward T. Furlong, Steffanie H. Keefe, Gregory K. Brown, and Jeffery D. Cahill (2000): Chapter 5 – Natural and Contaminant Organic Compounds in the Boulder Creek Watershed, Colorado During High-Flow and Low-Flow Conditions. in: U.S. Geological Survey Water Resources Investigations Report 03-4045, Kapitel 5.

[Buerge et al. 1] Ignaz J. Buerge, Thomas Poiger, Markus D. Müller u. Hans-Rudolf Buser (2003): Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. in: Environ. Sci. Technol. 2003, 37, 691-700

[Buerge et al. 2] Ignaz J. Buerge, Thomas Poiger, Markus D. Müller u. Hans-Rudolf Buser (2006): Combined Sewer Overflows to Surface Waters Detected by the Anthropogenic Marker Caffeine. in: Environ. Sci. Technol. 2006, 40, 4096-4102

[Dash] Swati S. Dash u. Sathyanarayana N. Gummadi (2006): Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. in: Biotechnol Lett 28:1993–2002

[Fries] Elke Fries (2002): Eintrag organischer Umweltchemikalien aus der Oder in den anaeroben Grundwasserleiter des Oderbruchs.

[Glassmeyer et al.] S. T. Glassmeyer, E. T. Furlong, D. W. Kolpin, J. D. Cahill, S. D. Zaugg, S. L. Werner, M. T. Meyer, D. D. Kryak (2005): Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. in: Environ. Sci. Technol. 39,5157-5169

[Guarraci et al.] Fay Guarraci u. Anastasio Benson (2005): Coffee, Tea and Me - Moderate doses of caffeine affect sexual behavior in female rats. in: Pharmacology Biochemistry and Behavior, Bd. 82, S. 522

[Houghton] E. Houghton (2005): Deuteromethylation of dimethylxanthines: A gas chromatographic mass spectrometric method for confirmatory analysis in horse urine extracts.

[Julien] Robert M. Julien (2002): A primer of drug action - a concise and nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs.

[Kaufmann et al.] P. A. Kaufmann, M. Namdar, P. Koepfli, R. Grathwohl, P. T. Siegrist, M. Klainguti, T. Schepis, R. Delaloye, C. A. Wyss, S. P. Fleischmann, O. Gaemperli (2006): Caffeine Decreases Exercise-Induced Myocardial Flow Reserve. in: Journal of the American College of Cardiology, Bd. 47, S. 405

[Kolpin et al.] Dana W. Kolpin, Edward T. Furlong, Michael T. Meyer, E. Michael Thurman, Steven D. Zaugg, Larry B. Barber, Herbert T. Buxton (2002): Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. in: Environ. Sci. Technol. 36,1202-1211

[Loeffler] Bernd Loeffler (2000): Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Coffein, Theophyllin und Theobromin beim Hund nach Aufnahme von Kaffee, Tee und Schokolade.

[Magee] R. J. Magee, Hrsg. (1970): Selected readings in chromatography. Oxford.

[Mazzafera] Paulo Mazzafera (2002): Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. in: Scientia Agricola, v.59, n.4, p.815-821

[MRI] Midwest Research Institute (1982): NCI Contract No. NOI-CP-95615, 1437-1457.

[National Geographic] Adventure 1/2003. deutsche Ausgabe

[NLWK] Niedersächsisches Landesamt für Wasserwirtschaft und Küstenschutz (2000): Gewässergütekarte.

[Ogunseitan] O.A. Ogunseitan (1996): Removal of caffeine in sewage by *Pseudomonas putida*: Implications for water pollution index. in: World Journal of Microbiology & Biotechnology 12. 251-256

[Peeler] Kelly Ann Peeler (2004): Caffeine as an Anthropogenic Source Indicator in Freshwater and Marine Systems.

[Poiger et al.] T. Poiger, H.-R. Buser, M. D. Müller, M. E. Balmer u. I. J. Bürgle (2003): Occurrence and Fate of Organic Micro-pollutants in the Environment: Regional Mass Balances and Source Apportioning in Surface Waters Based on Laboratory Incubation Studies in Soil and Water, Monitoring and Computer Modeling. in: Chimia 57 492-498.

[Prösch et al.] Joachim Prösch u. Wilfried Puchert (1998): Coffein: Vorkommen in Fließgewässern Mecklenburg-Vorpommerns. in: Vom Wasser, 91, 207-214

[Richtlinie] 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik.

[Schröder et al.] K. Schröder, W. Schmidt, F. Sacher, J. Stien u. H.-J. Brauch (2004): Untersuchungen zum Vorkommen und Verhalten von xenobiotischen organischen Einzelstoffen in hochbelasteten Elbsedimenten.

[Shindo et al.] Koji Shindo u. Akira Otsuki (1999): Establishment of a sampling strategy for the use of blue mussels as an indicator of organotin contamination in the coastal environment.

[Spiteller] G. Spiteller u. M. Spiteller-Friedmann (1961): Vergleichende massenspektrometrische Untersuchung einiger Purinderivate.

[Trapp] Stefan Trapp (1995): Neue Stickstoffelimination des Klärwerks Osnabrück entlastet die Hase. in: Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen Band 20/21 Seite 441-448

[WHO] World Health Organization (1995): Seven Out of Every Ten Deaths in Developing Countries Are Due to Just Five Causes: Pneumonia, Diarrhoea, Malaria, Measles and Malnutrition. WHO Press Office.

[Wood et al.] Harold R. Wood u. N. K. Suleman (2000): The Assessment of Fecal Indicator Potential and Degradation Kinetics of Caffeine and Several Caffeine Metabolites in Environmental Waters.

[Zorn] E.-C. Zorn (2003): Methoden der spurenanalytischen Bestimmung von Estrogenen im Abwasser.



## *Sekundärliteratur aus dem Internet*

[BWV 211] Schweigt stille, plaudert nicht. auch: „Kaffeekantate“ (1734)  
<http://www.cs.ualberta.ca/~wfb/cantatas/211.html>

[Chemical] Chemical Database by the department of Chemistry at the University of Akron.  
<http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/>

[EAWAG] SODIS, solare Trinkwasserdesinfektion. von:  
[http://www.sodis.ch/German/index\\_neug.html](http://www.sodis.ch/German/index_neug.html)

[EPA] ECOTOX Database. von: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>

[Flassig] Tobias Flassig (2000): Chemische Aspekte des Kaffees.  
[www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/umat/kaffee2/1\\_kaffee2.htm](http://www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/umat/kaffee2/1_kaffee2.htm)

[Frida] Freie Vektor-Geodaten Osnabrück von: <http://frida.intevation.org>

[Kaffeeverband] Jahresbericht (2005). von:  
[http://www.kaffeeverband.de/pdf/jahresbericht\\_2005.pdf](http://www.kaffeeverband.de/pdf/jahresbericht_2005.pdf)

[Kläranlage] Stadtwerke Osnabrück. von: <http://www.stw-os.de/euw/3262.htm>

[Krausch] Claudia Krausch (1999): Vor-Ort-Arbeiten des Hydrogeologen und chemische Wasseranalytik. Teil 1: Probenahmetechnik. von:  
[www.geo.tu-freiberg.de/hydro/oberseminar/os99/krausch\\_claudia.pdf](http://www.geo.tu-freiberg.de/hydro/oberseminar/os99/krausch_claudia.pdf)

[Men's Answer] The Mens Answer to The Womens petition against Coffee: Vindicating their own Performances, and the Vertues of their Liquor, from the Undeserved Aspersions lately cast upon Them, in their Scandalous Pamphlet. (1674) von:  
<http://homepage.univie.ac.at/thomas.gloning/tx/mens-answer-1674.htm>

[PharmGKB] The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base.  
[www.pharmgkb.org/](http://www.pharmgkb.org/)

[Priegnitz] Jan Priegnitz (2004): Untersuchung der transversalen Dispersion in einem Abschnitt der Hase. Projektbericht. von: [http://home.arcor.de/jot.pe/sywi/kleines\\_Projekt.doc](http://home.arcor.de/jot.pe/sywi/kleines_Projekt.doc)

[Proclamation] Charles II (1675): By the King. A proclamation for the suppression of the coffee-houses. von: <http://homepage.univie.ac.at/thomas.gloning/tx/suppress.htm>

[Sims] Michael Sims (1997): Black as the Devil and Hot as Hell.  
von: [http://weeklywire.com/ww/12-15-97/nash\\_ol-history.html](http://weeklywire.com/ww/12-15-97/nash_ol-history.html)

[Stadtverwaltung] der Stadt Osnabrück (2006): Umweltbericht.  
[http://www.osnabrueck.de/images\\_design/Grafiken\\_Inhalt\\_Wohnen\\_Verkehr/UB\\_2006\\_internet\(1\).pdf](http://www.osnabrueck.de/images_design/Grafiken_Inhalt_Wohnen_Verkehr/UB_2006_internet(1).pdf)

[Wasser-Wissen] <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon/g/gewaessergueteklasse.htm>

[Wattenmeer] Rainer Borchering: Die Miesmuschel. von:  
<http://www.schutzstation-wattenmeer.de/wissen/miesmuschel.html>

[Wetter] von: <http://www.wetter.com>

[Wetteronline] von: <http://www-de-1.wetteronline.de>

[Women's petition] The women's petition against coffee. Representing to publick consideration the grand inconvenience accruing to their sex from the excessive use of that drying, enfeebling liquor. (1674) von:  
<http://homepage.univie.ac.at/thomas.gloning/tx/wom-pet.htm>

[Wikipedia] [http://de.wikipedia.org/wiki/Aachener\\_Kaffeefront](http://de.wikipedia.org/wiki/Aachener_Kaffeefront) u.a.

**Beiträge des Instituts für Umweltsystemforschung  
der Universität Osnabrück**

1. Eberhard Umbach: Umweltverträgliches Wirtschaftssystem in den Bereichen Abfall und Emissionen. März 1997.
2. Stefan Trapp, Bernhard Reiter, Michael Matthies: Überprüfung und Fortentwicklung der Bodenwerte für den Boden-Pflanze-Pfad - Teilprojekt Transferfaktoren Boden-Pflanze. August 1997.
3. Michael Matthies (Hrsg.): Stoffstromanalyse und Bewertung. September 1997.
4. Dirk Melcher: Quantifizierung, Klassifizierung und Modellierung der Phytotoxizität organischer Chemikalien. Oktober 1997.
5. Stefan Schwartz: Organische Schadstoffe in der Nahrungskette - Vorstudie zur Validierung von Expositionsmodellen. November 1997.
6. Volker Berding: Private Hausbrunnen - Vergleichende Bewertung von Maßnahmen zur Verbesserung der Trinkwasserqualität. Oktober 1997.
7. Horst Malchow (Hrsg.): Modellbildung und -anwendung in den Wissenschaften I. Januar 1998.
8. Birgit Radtke: Bifurkationen in einem Modell mariner Planktodynamik. Januar 1998.
9. Werner Berens: Konzeption eines Umweltinformationssystems für die Universität Osnabrück. Juni 1998.
10. Michael Matthies (Hrsg.): Studienprojekte 1998. September 1998.
11. Michael Matthies (Hrsg.): Globaler Wandel. September 1998.
12. Klaus Brauer (Hrsg.): Institutsbericht. September 1998.
13. Klaus Brauer, Horst Malchow, Michael Matthies, Eberhard Umbach (Hrsg.): Materialien des Arbeitstreffens Systemwissenschaft in der Lehre, Universität Osnabrück, 29./30.9.1998. Dezember 1998.
14. Horst Malchow (Hrsg.): Modellbildung und -anwendung in den Wissenschaften II. Dezember 1998.
15. Horst Malchow (Hrsg.): Modellbildung und -anwendung in den Wissenschaften III. August 1999.
16. Michael Matthies (Hrsg.): Regionale Nachhaltigkeit. September 2000.
17. Markus Klein: Langjähriger Wasserhaushalt von Gras- und Waldbeständen. Entwicklung, Kalibrierung und Anwendung des Modells LYFE am Groß-Lysimeter St. Arnold. Juni 2000.
18. Markus Brune: Multimediale Umweltmodellierung mit Fuzzy-Mengen. Juli 2000.
19. Michael Matthies (Hrsg.): Fraktale in Hydrologie und Biologie. Oktober 2000.
20. Stefan Fuest (Dissertation): Regionale Grundwassergefährdung durch Nitrat. Dezember 2000.
21. Carsten Schulze (Dissertation): Modelling and evaluating the aquatic fate of detergents. Januar 2001.

Die Beiträge können gegen einen Selbstkostenpreis (ca. 10 EUR pro Exemplar) beim Institut für Umweltsystemforschung, Universität Osnabrück, 49069 Osnabrück bestellt werden. Alle folgenden Beiträge sind herunterzuladen unter <http://www.usf.uos.de/usf/beitraege/>

22. Horst Malchow (Hrsg.): Modellbildung und -anwendung in den Wissenschaften IV. Januar 2001.
23. Horst Malchow (Hrsg.): Modellbildung und -anwendung in den Wissenschaften V. August 2001.
24. Kai Lessmann (Diplomarbeit): Probabilistic Exposure Assessment. Parameter Uncertainties and their Effects on Model Output. November 2002.
25. Frank M. Hilker (Diplomarbeit): Parametrisierung von Metapopulationsmodellen. März 2003.
26. Nadja Rüger (Diplomarbeit): Habitat suitability for *Populus euphratica* in the Northern Amudarya delta - a fuzzy approach. Juni 2003.
27. Claudia Pahl-Wostl, Eva Ebenhöf (Hrsg.): Komplexe Adaptive Systeme. Juli 2003.
28. Horst Malchow (Hrsg.): Chaos und Ordnung in Natur und Gesellschaft. Dezember 2004.
29. Andreas Focks (Diplomarbeit): Modeling the transfer of antibiotic drug resistance genes between *E. coli* strains. Juni 2005.
30. Christiane Zarfl (Diplomarbeit): Modellierung von Arsen in der Mulde. Juni 2005.
31. Sven Lautenbach (Dissertation): Modellintegration zur Entscheidungsunterstützung für die Gewässergütebewirtschaftung im Einzugsgebiet der Elbe. November 2005.
32. Frank M. Hilker and Frank H. Westerhoff: Control of chaotic population dynamics: Ecological and economic considerations. November 2005.
33. Harold Fellermann (Diplomarbeit): Micelles as containers for protocells. Dezember 2005.
34. Jens Newig, Oliver Fritsch (Hrsg.): Effektivität von Beteiligungsprozessen. Mai 2006.
35. Ba Kien Tran (Diplomarbeit): Modellierung biologischer Invasionen mit Reaktions-Diffusionsgleichungen. Juli 2006.
36. Ivo Siekmann (Diplomarbeit): Agentenbasierte Modellierung von Persönlichkeitsunterschieden auf der Grundlage der PSI-Theorie. Juli 2006.
37. Tobias Ceglarek (Diplomarbeit): Irreguläre Oszillationen in drei- und vierkomponentigen populationsdynamischen Modellen. September 2006.
38. Horst Malchow (Hrsg.): Komplexe Systeme und nichtlineare Dynamik in Natur und Gesellschaft. Dezember 2006.
39. Jens Newig, Veronika Gaube, Karin Berkhoff, Kai Kaldrack, Britta Kastens, Juliana Lutz, Bianca Schlußmeier, Heide Adensam, Helmut Haberl, Claudia Pahl-Wostl, Armand Colard, Bettina Aigner, Rudolf Maier, Wolfgang Punz: Partizipative Modellbildung, Akteurs- und Ökosystemanalyse in Agrarintensivgebieten. Juli 2007.

40. Bert Wecker, Bakhtiyor Karimov, Bakhtiyar Kamilov, Uwe Waller, Michael Matthies, Helmut Lieth: Sustainable Aquaculture in Recirculating Systems – Feasibility Study for the Catchment Area of the Aral Sea. März 2007.
41. Michael Matthies (Hrsg.): Klimawandel. Oktober 2007.
42. Nina Hüffmeyer (Diplomarbeit): Modellierung von Zink in der Ruhr - Emissionspfade und Belastungsanalyse. August 2006.
43. Jutta Wissing (Diplomarbeit): Georeferenzierte hydromorphologische Charakterisierung von Flussgebieten. November 2006.
44. Jan Priegnitz (Diplomarbeit): Analyse von Koffein als Abwassermarker in Fließgewässern. April 2007.