

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Schwermetall-Extraktion mithilfe ionischer
Flüssigkeiten: toxikologische Aspekte“

1

verfasst von

Angela Fleischer

Bachelor of Science (BSc)

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Chemie

Betreuerin: ao Univ. Prof. Mag. Dr. Regina Krachler

***Herzlichen Dank für die freundliche Unterstützung
während dieser Arbeit!***

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Regina Krachler

Mag. Dr. Franz Jirsa

Mag. Markus Gruber

O. Univ. Prof. DDr. Bernhard K. Keppler

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Markus Galanski

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Michael Schagerl

Den lieben KollegInnen der Arbeitsgruppe Umweltchemie

Den lieben KollegInnen der Arbeitsgruppe Radiochemie

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhalt

<i>Herzlichen Dank für die freundliche Unterstützung während dieser Arbeit! ...</i>	2
1 Kurzfassung	5
2 Abstract	8
3 Einleitung.....	11
4 Materialien und Methoden	22
4.1 Synthese der ionischen Flüssigkeiten	22
4.1.1 Synthese von 1-octyl-4-methylpyridinium nonafluorbutylsulfonat, abgekürzt [4MOPYR][NfO].....	22
4.1.2 Synthese von <i>N</i> -phenyl- <i>N'</i> -(pyridin-2-ylmethyl)- <i>S</i> -methyl-thiouronium Bis(trifluormethylsufonyl)imid, abgekürzt THIOU	23
4.1.3 Synthese von 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid.....	25
4.1.4 Synthese von Pyridinium-funktionalisiertem Chitosan, abgekürzt PyrChi	27
4.2 Charakterisierung.....	29
4.2.1 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid	29
4.2.2 PyrChi	30
4.3 Extraktionen	32
4.3.1 Extraktionen mit [4MOPYR][NfO].....	32
4.3.2 Extraktionen mit THIOU	35
4.3.3 Extraktionsversuche mit PyrChi	36
4.4 Toxizitätsversuche an Algen	39
4.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	39
4.4.2 Sättigung der wässrigen Phase mit ionischer Flüssigkeit.....	41

4.4.3 Probenschema	42
4.4.4 PAM-Fluoreszenz.....	43
4.4.5 Chlorophyll a Bestimmung	45
5 Resultate und Diskussion	47
5.1 Resultate der Extraktionen	47
5.1.1 Hg-Extraktion mit [4MOPYR][NfO]	47
5.1.2 Cu- und Cd-Extraktion mit THIOU.....	49
5.1.3 Extraktion von Quecksilber mit PyrChi	52
5.2 Resultate der Toxizitätstests	55
5.2.1 Toxizitätsresultate für THIOU bei <i>Selenastrum capricornutum</i> , „Control“: Algenmedium pur	55
5.2.2 Toxizitätsresultate für THIOU bei <i>Scenedesmus acuminatus</i>	57
5.2.3 Toxizität von [4MOPYR][NfO] auf <i>Selenastrum capricornutum</i>	62
5.2.4 Toxizität von [4MOPYR][NfO] auf <i>Scenedesmus acuminatus</i>	63
6 Literaturverzeichnis	67
7 Abkürzungsverzeichnis	72
8 Anhang	74
Lebenslauf.....	74
Pam-Fluoreszenz Geräteeinstellungen	75

1 Kurzfassung

Die Belastung von Oberflächengewässern mit Schwermetallen kann sowohl bei Fauna und Flora als auch beim Menschen zu großen Schäden führen. Viele Staaten haben deswegen Grenzwerte für die Emission von Schwermetallen festgesetzt, die von der Industrie eingehalten werden müssen. Es gibt verschiedene Ansätze, um Abwässer zu reinigen, bevor sie in natürliche Gewässer eingeleitet werden, diese sind jedoch alle mit Nachteilen verbunden. Eine der beliebtesten Methoden ist die „solvent extraction“, bei der organische Lösungsmittel eingesetzt werden, die aufgrund ihrer Flüchtigkeit in die Atmosphäre entweichen und von dort aus Organismen schädigen können. Weitere Methoden sind beispielsweise die Ausfällung von Schwermetallen, die Membranfiltration sowie der Einsatz von Ionentauschern.

Als vielversprechende Kandidaten für den Ersatz bzw. zur Ergänzung der heute angewandten Reinigungsmethoden gelten die ionischen Flüssigkeiten, kurz ILs. Es handelt sich dabei um ionische Verbindungen, die einen Schmelzpunkt unter 100°C aufweisen. Sie besitzen mehrere interessante Eigenschaften. Zum einen besitzen die meisten einen vernachlässigbaren Dampfdruck, wodurch sie nicht in die Atmosphäre entweichen können. Zum anderen ist es chemisch möglich, ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften einem bestimmten Anwendungszweck anzupassen.

Allerdings ist bislang wenig über ihre Toxizität bekannt. Zwar wurden Korrelationen zwischen der Lipophilie und der Toxizität gefunden, aber viele Fragen bleiben noch ungeklärt. Einige Befunde zeigten außerdem, dass selbst stark hydrophobe ILs zum Teil in die wässrige Phase übertreten können. Bevor eine IL also zur Reinigung von Abwässern zum Einsatz kommt, ist es notwendig, ihr ökotoxikologisches Gefahrenpotential festzustellen.

Deswegen beschäftigte sich diese Arbeit damit, zuerst das Extraktionspotential ausgewählter ILs festzustellen und anschließend ihre Toxizität auf zwei

einzellige Grünalgenspezies, nämlich *Selenastrum capricornutum* und *Scenedesmus acuminatus* zu testen.

Für die Extraktionsversuche wurden drei sehr unterschiedliche ILs herangezogen, jeweils eine Alkylammonium-, Pyridinium- und Thiouronium-Verbindung, in dieser Arbeit abgekürzt als [A336][TS], [4MOPYR][NfO] und THIOU.

Für [A336][TS] war die Extraktionseffizienz und die Toxizität für Algen bereits bekannt. Die Versuche konzentrierten sich deswegen auf eine Immobilisation der Substanz in PVC, da die Hoffnung bestand, dass damit die Extraktionseffizienz erhalten bliebe und gleichzeitig die Verteilung der IL in der wässrigen Phase verhindert werden könnte. Die Immobilisation war auch erfolgreich, jedoch stellte sich heraus, dass dabei die Aufnahmefähigkeit für Kupfer verlorengeliegt.

Extraktionen mit [4MOPYR][NfO] zeigten eine gute Aufnahmefähigkeit für zweiwertiges Quecksilber und außerdem eine pH-Abhängigkeit der Extraktion. Eine erfolgreiche Extraktion war nur bei basischem pH möglich, was darauf hindeutet, dass sich nur unter alkalischen Bedingungen eine Quecksilberspezies ausbildet, an welche die IL binden kann. Ein Versuch, die IL in PVC zu immobilisieren, scheiterte.

Von THIOU waren zuvor nur Extraktionsdaten für Silber und Platin bekannt, nicht jedoch für Kupfer und Cadmium. Flüssig-Flüssig-Extraktionen ergaben ein gutes Aufnahmevermögen für Kupfer und ein nur geringes für Cadmium.

Da für [4MOPYR][NfO] und THIOU noch keine Toxizitätsdaten vorliegend waren, wurden mit ihnen 72h Toxizitätstests an den beiden erwähnten Algenspezies durchgeführt. Die Experimente erfolgten nach ISO-Norm 8692. Dabei wurde das Wachstum der Algen im Abstand von jeweils 24 Stunden mithilfe Messungen des Chlorophyll a Gehalts und die physiologische Aktivität der Algen durch PAM-Fluoreszenz bestimmt. Es zeigte sich, dass [4MOPYR][NfO] für beide Grünalgenspezies auch in sehr geringer Konzentration wachstumshemmend wirkt, was mit den üblichen Befunden für ILs mit langen Alkylketten übereinstimmt. Bei THIOU konnte keine erhebliche Toxizität festgestellt werden, erst ab einer Konzentration von 400 mg/l in den

Proben war eine deutliche Wachstumshemmung festzustellen. Jedoch kam es bei Konzentrationen von THIOU im Bereich von 5 mg/l zu einer Wachstumssteigerung im Vergleich zu den Kontrollen.

Resultierend lässt sich sagen, dass [4MOPYR][NfO] wegen seiner großen Toxizität gegenüber Algen und seiner Tendenz, in die wässrige Phase überzutreten, nicht für eine Anwendung in der Praxis infrage kommt. Die in dieser Arbeit gefundene Toxizität ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur, da in der Literatur Hinweise dafür vorliegen, dass größere Alkylkettenlängen mit einer höheren Toxizität gegenüber Algen korrelieren.

Auch THIOU wird wegen seines hohen Schmelzpunkts von 49,8°C nicht im großen Maßstab verwendet werden können. Auffällig ist allerdings seine hohe Aufnahmekapazität für Kupfer, die vermuten lässt, dass auch andere Thiouronium-Verbindungen imstande wären, Kupfer zu binden. Struktur-Aktivitätsbeziehungen dieser Verbindungsklasse im Bezug auf die Bindung zweiwertiger Metallionen wurden noch nicht umfangreich erforscht und wären eine interessante Thematik für weitere Forschungen.

2 Abstract

The contamination of natural water bodies with heavy metal ions is a known and in some regions persistent issue. In the past decades, countless studies have been made concerning the influence of heavy metals on ecosystems and humans. The results of these experiments lead to the widely accepted consensus to minimize anthropogenic emissions of heavy metals into natural environments to the highest possible degree. To achieve this, many countries have implemented maximum permissible values for heavy metal content in industrial wastewater. Therefore, companies often use cleansing methods to reduce the metal content in their wastewater. Of these methods, all have different advantages and disadvantages. One of the most commonly used methods is the so called solvent extraction, where heavy metal ions are bound by complex builders imbedded in organic solvent. Unfortunately, this can create environmental hazards as most organic solvents are toxic and very volatile. Escape into the atmosphere is a common concern.

Therefore, it is of great interest to search for environmental friendly and alternative methods for heavy metal extraction. One promising candidate seems to be the substance class of ionic liquids, abbreviated ILs. These are ionic compounds with a melting point below 100°C. They possess a couple interesting features. Most of them are non-volatile, which minimizes the risk of atmospheric contamination. Also, it is quite easy to tailor their physical and chemical properties to a certain task (in this case binding of specific heavy metal ions).

However, not much is known about their toxicity. Correlations between lipophilicity and toxicity of ILs have been found, but many questions still remain unanswered. Some results show that even lipophilic ILs are capable of mixing with the aqueous phase, at least to a small degree. Consequently, before an IL can be safely used for wastewater cleansing, it is necessary to investigate its ecotoxicological profile.

Therefore, this thesis dealt with investigating the extraction capabilities of selected ILs and testing these substances for their toxicity on two freshwater green algae species, *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acuminatus*.

For extraction purposes, three different ionic liquids were used, an alkylammonium-, a pyridinium- and a thiouronium-compound, named [A336][TS], [4MOPYR][NfO] and THIOU.

Extraction efficiency and toxicity for algae has already been investigated for [A336][TS] by other researchers. Therefore, experimentation focused on immobilising [A336][TS] in PVC-membranes. By doing this, we hoped to minimize leaching into the aqueous phase while retaining the affinity for heavy metal. The immobilisation itself was indeed successful, but no increased affinity for heavy metals compared to pure PVC was found.

Extraction of mercury(II) with [4MOPYR][NfO] brought good results, but only if the pH of the extraction media was alkaline. Considering the pyridinium-cation is positively charged as well as the mercury-ion, it is possible that the IL-metal binding is dependent on the formation of a negatively charged or neutral mercury-complex. An attempt to immobilize [4MOPYR][NfO] in PVC failed.

Before my work was started, THIOU has only been investigated for its extraction capabilities concerning platinum and silver. Consequently, extraction of copper and cadmium was investigated. It has been found that THIOU is quite capable of absorbing copper. Also, a slight affinity for cadmium was determined.

THIOU and [4MOPYR][NfO] have both been tested for their toxicity on *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acuminatus* using 72h toxicity assays. The test was performed following ISO-Norm 8692. Samples were taken daily and the chlorophyll a content and PAM-fluorescence was measured. These parameters give information regarding biomass growth and state of photosynthetic activity. It was shown that [4MOPYR][NfO] is toxic to both species. THIOU didn't show significant toxicity. Interestingly, at concentrations close to 5 mg/l, an increase in growth was observed.

The conclusion can be drawn that [4MOPYR][NfO] is too toxic and mixes with the aqueous phase too readily to be of use in cleansing plants.

THIOU, with its melting point of 49,8°C is also not suitable for industrial use. Its affinity for copper is an interesting property and should be investigated in the future. The thiouronium-functionality might prove itself to be capable of binding copper-ions. Structure-activity-relationships have not yet been researched and could yield even more promising substances.

3 Einleitung

Was sind Schwermetalle? In der Technik fallen unter diesen Begriff für gewöhnlich Metalle mit einer Dichte von über 5g/cm^3 . Dies trifft für alle in dieser Arbeit für Extraktionszwecke eingesetzten Metalle zu. Im Bezug auf die Ökotoxizität wird aber statt der Dichte häufig die Position im Periodensystem als Kriterium für die Benennung herangezogen. Klaus Appenroth, Privatdozent an der Friedrich-Schiller Universität in Jena, machte den Vorschlag, alle Übergangsmetalle, Lanthanoide, Actinoide sowie Al, Ga, In, Tl, Sn, Pb, Sb, Bi, und Po unter dem Begriff „Schwermetalle“ zusammenzufassen. (Appenroth, 2010)

Verteilung von Schwermetallen in der Umwelt

Es gibt prinzipiell drei verschiedene Hauptverteilungswege für Schwermetalle. Einige Schwermetalle können in Gasform (Quecksilber) oder an Staubpartikel gebunden in die Atmosphäre gelangen und von Luftströmungen weite Strecken getragen werden, bis sie eingeatmet werden oder z.B. durch Niederschläge aus der Atmosphäre ausgewaschen werden und so auf Wasser- oder Bodenoberflächen gelangen. Doch auch über die Nahrung können Schwermetalle transportiert werden. So sind viele Pflanzen imstande, Schwermetalle aus dem Boden aufzunehmen und zu speichern. Bei aquatischen Organismen können, was die Reaktion auf Schwermetalle in der Umgebung betrifft, zwei Hauptkategorien unterschieden werden: „Regulators“, die nur geringe Mengen an Schwermetallen aufnehmen und „Accumulators“, die ihre Aufnahme nicht kontrollieren können, aber körpereigene Entgiftungsmechanismen besitzen. (Bradl et al., 2005)

Ein weiterer möglicher Verteilungsweg ist der Wasserkreislauf. Dabei spielen vor allem folgende Vorgänge eine Rolle: Verteilung im Wasserkörper, Verflüchtigung in die Atmosphäre, Verfrachtung in die Sedimente, abiotische chemische Umwandlungen, biotische chemische Umwandlungen und

Aufnahme in Organismen. Chemische Umwandlungen können entweder zur Ausbildung von weniger toxischen Produkten führen (Deaktivierung), die Toxizität erhöhen (Aktivierung) oder keine Änderung der Toxizität bewirken. (Fent, 2003)

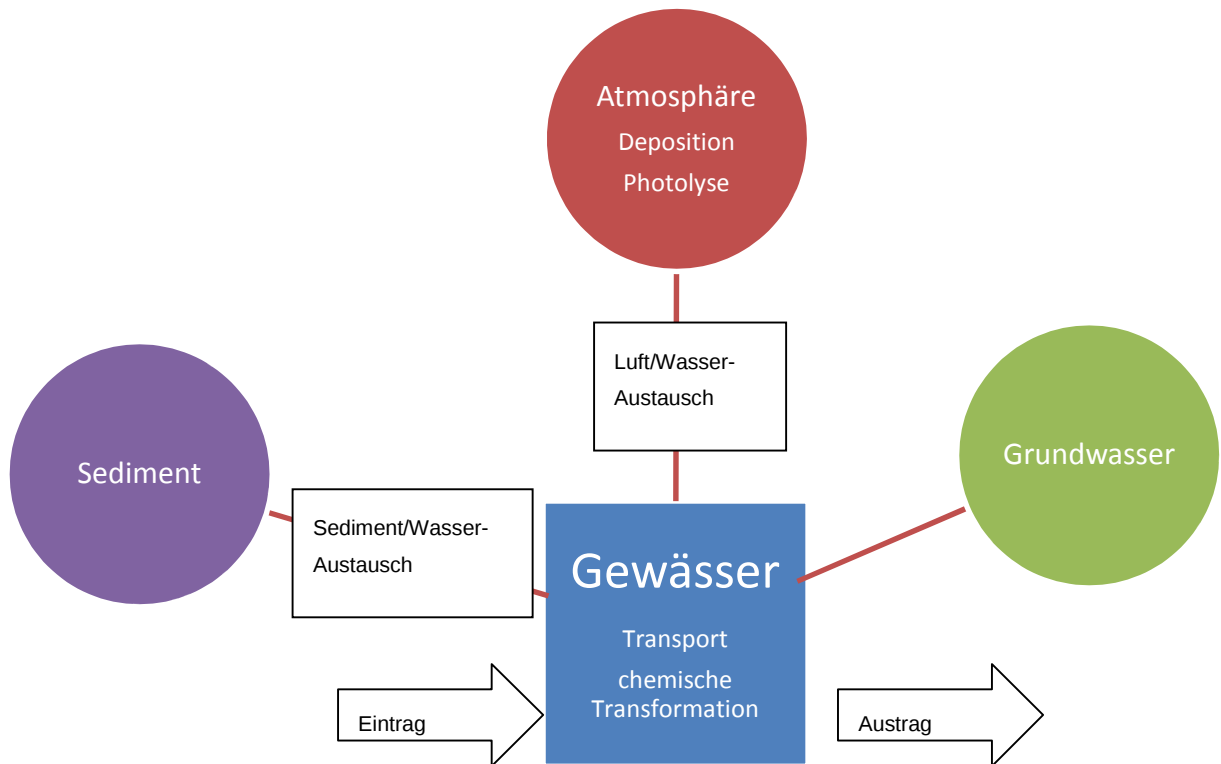


Abb. 1: Skizze der Verteilung von Schadstoffen in Oberflächengewässern. Verändert nach Fent 2003

Eine Aufnahme von Schwermetallen durch Organismen ist jedoch nur möglich, wenn sie in bioverfügbarer Form vorliegen. Als bioverfügbar werden jene Metallverbindungen bezeichnet, die von einem Organismus adsorbiert oder absorbiert und zumindest theoretisch verteilt, metabolisiert, eliminiert oder bioakkumuliert werden können. Als Bioakkumulation versteht man die Netto-Anreicherung eines Metalls entweder in einem bestimmten Organ oder im gesamten Organismus aufgrund von Exposition. Dabei können die Metalle aus verschiedenen Quellen in der Umwelt aufgenommen werden, wie aus der Luft, Gewässern, Feststoffphasen (organische und anorganische Phasen in Boden und Sediment) sowie aus der Nahrung. (McGeer et al., 2004)

Die Toxizität von Schwermetallen

Generell ist die Toxizität eines Schwermetalls auf einen Organismus meist von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig, nicht zuletzt von seiner Bioverfügbarkeit. (Bradl et al., 2005)

Quecksilber kommt in der Umwelt sowohl elementar als Flüssigkeit als auch als einwertiges oder zweiwertiges Salz vor. $\text{Hg}(0)$ ist besonders flüchtig, kann daher leicht in die Atmosphäre gelangen und von den atmosphärischen Strömungen weite Strecken transportiert werden. In der Erdkruste ist Quecksilber am häufigsten als Quecksilbersulfid vorzufinden, eine Verbindung, die wegen ihres extrem geringen Löslichkeitsprodukts in Wasser gemeinhin als ungiftig gilt. Eine weitere wichtige Form ist das Methylquecksilber, das durch einfache oder zweifache Methylierung des Quecksilbers z.B. durch bestimmte Bakterienstämme gebildet wird. Auch Methylquecksilber kann über den Atmosphärenweg transportiert werden. (Boening, 2000)

Im aquatischen Milieu zeigt Quecksilber bei etlichen unterschiedlichen Spezies eine erhebliche Toxizität. So führte zum Beispiel eine Konzentration von 0,25mg/l Hg zu einer 50%igen Wachstumsinhibition an zwei Tage alten Keimlingen der Rotalge *Plumaria elegans*. (Boney, 1971) 0,8mg/l Quecksilber im Wasser verursachte bei der kanadischen Wasserpest *Elodea canadensis* eine Verminderung der Sauerstoffproduktion und Photosyntheseaktivität um 50%. (Brown und Rattigan, 1979) Toxizitätstests, die über 96 Stunden hinweg an verschiedenen Süßwasserfischen durchgeführt wurden, ergaben LC_{50} -Werte zwischen 33 und 400µg/l. Organische Quecksilberverbindungen wie etwa Methylquecksilber erwiesen sich bei vielen Versuchen an aquatischen Organismen als toxischer im Vergleich zu anorganischen. (WHO, 1989)

Auch Kupfer ist dafür bekannt, sich negativ auf aquatische Organismen auswirken zu können. So wurde in einer Studie der Wirkmechanismus von Kupfer auf die Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von Kupfer-Ionen bei einer Konzentration von $7,9 \times 10^{-4} \text{ mmol/l}$ (50 µg/l) eine Halbierung der Zellteilungsrate als auch eine Verminderung der Photosyntheseaktivität bewirkte. (Stauber und

Florence, 1987) Weiters ist bekannt, dass hohe Kupferkonzentrationen das Schlüpfen der Larven des Zebrafisches *Brachydanio rerio* inhibieren bzw. hinauszögern. Der NOEC, also die Konzentration, bei der kein Effekt im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden konnte, war für die Schlupfzeit 0,05 µg/l. Für die Überlebenszeit nach dem Schlüpfen der Larven betrug er 0,25 µg/l. (Dave und Xiu, 1991)

Cadmium kann in Pflanzen zu Chlorophyll-Mangel und einer verminderten Wachstumsrate verursachen. Ersteres scheint aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Eisen im Blattinneren begründet zu liegen. (Das et al., 1997) Die Inkubation der Eier der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* mit 0,1mg/l Cadmium führte zu verfrühtem Schlüpfen, vermindertem Wachstum, höheren Mortalitätsraten, Deformierungen des Rückgrats und die Bildung von Blutgerinnseln. (Woodworth und Pascoe, 2006)

Schwermetalle in Oberflächengewässern

Diese und noch etliche andere Ergebnisse legen nahe, dass es von zentraler Bedeutung sein sollte, Oberflächengewässer in gutem Zustand zu erhalten. Eine wichtige Rolle bei ihrem Schutz nimmt dabei im europäischen Raum die Europäische Wasserrahmenrichtlinie ein. Sie beschreibt die Maßnahmen, die zur Erhaltung natürlicher Gewässer im EU-Raum von den Mitgliedstaaten zu treffen sind. Erstens soll die Kontamination von Gewässern mit schädlichen Substanzen vermieden werden. Zweitens ist regelmäßig zu kontrollieren, dass die nach den Vorgaben in der Richtlinie ermittelten Umweltqualitätsnormen nicht überschritten werden. Falls die Wasserqualität eines Gewässers als unzureichend einzustufen ist, sind Sanierungsmaßnahmen zu treffen. Als prioritär gefährlich wurden unter anderem Quecksilber und Cadmium sowie deren Verbindungen eingestuft. Allerdings sind in der Wasserrahmenrichtlinie keine Grenzwerte dafür festgesetzt, wie hoch die Konzentrationen potentiell gefährlicher Substanzen in Sedimenten sein dürfen. Stattdessen existieren Grenzwerte für Böden bzw. Sedimente, die als Dünger auf Nutzflächen aufgebracht werden sollen. (EU, 2000)

Der maximale erlaubte Cadmium-Gehalt in Abwässern von Verbrennungsanlagen beträgt im EU-Raum 0,05mg/l. Für Quecksilber und Kupfer gelten Grenzwerte von 0,03mg/l bzw. 0,5mg/l. (EU, 2001)

Entfernung von Schwermetallen aus Abwässern

Es gibt vier wesentliche Methodenfamilien zur Entfernung von Schwermetallen, die Anwendung finden können: Ausfällung, Elektrolyse, Revers-Osmose, Adsorption bzw. Ionenaustausch und „solvent extraction“ bzw. Membranmethoden. Diese Hauptklassen sind wiederum in sehr viele verschiedene Einzelmethoden unterteilt, von denen einige für den praktischen Einsatz im großen Stil zu teuer sind. (Lewinsky, 2007)

Jede Methode besitzt verschiedene Vor- und Nachteile. So bieten die meisten Ausfällungs-Methoden die Möglichkeit, Schwermetallionen mit großer Gründlichkeit zu entfernen, es entsteht dabei aber auch eine Schlacke, die stark mit Schwermetallen belastet ist und daher nicht einfach auf Felder gestreut oder deponiert werden kann. Eine aufwendige Entsorgung ist vonnöten. Zudem müssen bei einer Ausfällung große Mengen von Chemikalien zum Einsatz kommen. Elektrolysemethoden zeichnen sich durch einen geringen Chemikalienverbrauch aus, sie sind aber sehr teuer und verbrauchen viel Energie. Die Materialien, die bei Adsorption- und Ionenaustauschmethoden eingesetzt werden, können die Ausbildung unerwünschter Biofilme in der Reinigungsanlage beschleunigen. Außerdem fördern sie die Korrosion und sind schwer zu entsorgen. Die „solvent extraction“ ist teuer und die dabei eingesetzten organischen Lösungsmittel sind meist giftig und leicht flüchtig. Eine Kontamination der Atmosphäre mit Lösungsmittel kann oft nicht ausgeschlossen werden. (Lewinsky, 2007)

Erwähnenswert ist in Bezug auf diese Arbeit auch das Biopolymer Chitosan, das durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird, welches natürlich in Krabben- und Insektenschalen vorkommt. Chemisch stellt es ein Amino-Polysaccharid dar und ist bereits dafür bekannt, bestimmte Schwermetalle, unter anderem auch Quecksilber, gut aufzunehmen. (Jeon und Höll, 2003) Um jedoch mit erhältlichen Ionenaustauschermaterialien konkurrieren zu können,

müsste die Substanz in der Lage sein, 2-3mmol/g Trockenmasse eines zweiwertigen Metallions aufzunehmen. (Bolto und Pawlowski 1987) Ein Ansatz zur Verbesserung der Aufnahmefähigkeit stellt die chemische Modifikation des Chitosans dar. (Visser et al., 2002)

Ionische Flüssigkeiten zur Schwermetallentfernung

In Anbetracht dessen sind viele Unternehmen und auch Forscher daran interessiert, nach Alternativen für die heute angewandten Methoden zu suchen. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist die Substanzklasse der ionischen Flüssigkeiten, kurz ILs, die teilweise eine gute Affinität für verschiedene Schwermetallkationen besitzen und allgemein als schwerflüchtig gelten, sodass bei ihrem Einsatz eine Atmosphärenkontamination ausgeschlossen werden kann. Definiert sind diese Verbindungen als Salze, die einen Schmelzpunkt unter 100°C besitzen. Dabei ist anzumerken, dass diese Grenze historisch entstanden ist und weder eine physikalische noch eine chemische Bedeutung besitzt. Eine weitere besondere Eigenschaft der ILs ist, dass die meisten von ihnen in einem großen Temperaturbereich flüssig sind. (Wasserscheid und Welton, 2002) Bei einer Reinigungsanlage, die im Freien steht, ist das in Anbetracht der natürlichen Temperaturschwankungen vorteilhaft.

Es wurde bisher auch als unmöglich angesehen, ILs zu destillieren. Eine Publikation aus dem Jahr 2006 widerlegt jedoch, dass dies für alle ILs gilt, da einige ILs bei Temperaturen im Bereich von 200-300°C destilliert werden konnten. Die angebliche nicht-Flüchtigkeit aller ILs, wie sie früher postuliert wurde, ist daher anzuzweifeln. (Earle et al., 2006)

Eine besondere Gruppe unter den ILs sind die sogenannten „task specific ionic liquids“, abgekürzt TSILs. Es handelt sich dabei um Verbindungen, in die eine funktionelle Gruppe inkorporiert wurde, welche die physikalischen und chemischen Eigenschaften stark verändert, sodass sich neue Anwendungsmöglichkeiten erschließen. TSILs können unter anderem auch erhöhte Affinitäten für bestimmte Metallkationen ausweisen. (Davis, 2004) In dieser Arbeit wurden daher hauptsächlich TSILs untersucht.

Die Toxizität von IL's.

Bevor eine IL für Extraktionszwecke eingesetzt wird, sollte jedoch zuvor ihr ökotoxikologisches Profil untersucht werden. In einigen Fällen, in denen die Toxizität von ILs mit der von konventionellen organischen Lösungsmitteln verglichen wurde, stellten sich die ILs als toxischer heraus. Doch mit der Ausnahme der Imidazolium-ILs liegen für die die meisten ionischen Flüssigkeiten leider erst wenige Ergebnisse in Hinsicht auf ihre Toxizität und Bioabbaubarkeit vor (Scammells et al., 2005).

Einer der Toxizitätstests wurde mit Pyridinium- und Imidazolium-ILs verschiedener Kettenlängen an den beiden Grünalgenspezies *Chlorella vulgaris* und *Oocystis submarina* sowie den Diatomeen *Cyclotella meneghiniana* und *Skeletonema marinoi* durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine negative Korrelation zwischen der Länge der Alkylketten und den EC₅₀-Werten. Es wurden außerdem keine erheblichen Unterschiede in der Toxizität zwischen ähnlich lipophilen Pyridinium- und Imidazolium-Verbindungen festgestellt. Zudem zeigte sich bei den Diatomeen eine größere Empfindlichkeit. Ebenso war ein Zusammenhang zwischen Zellgröße und Toxizität zu finden. (Latała et al., 2009)

Ein weiterer Toxizitätstest von 40 verschiedenen ILs am Meeresbakterium *Vibrio fischeri*, der Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* und der Süßwasserpflanze *Lemna minor* zeigte ebenfalls eine starke Korrelation zwischen der Länge der Alkylketten und der Toxizität. So führte der Einsatz von nur kurzen und funktionalisierten Seitenketten zu einer Verminderung der Toxizität um sechs bis sieben Größenordnungen. Zudem wurden starke Wechselwirkungen zwischen zwei häufigen Typen biologischer Lipidmembranen und vergleichsweise unpolaren IL-Kationen nachgewiesen. (Stolte et al., 2007)

Ein Experiment am Zebrafisch *Danio rerio* zeigte starke Unterschiede bei der Toxizität von Pyridinium-, Pyrrolidinium-, Imidazolium- und Ammonium-ILs. Erstere drei Gruppen ergaben EC₅₀-Werte über 100mg/l, die Ammoniumsalze erwiesen sich aber als weit toxischer, mit EC₅₀-Werten, die unter denen der

meisten tertiären Amine und organischen Lösungsmittel liegen. (Pretti et al., 2006)

Immobilisation von IL's

Die Löslichkeit von ILs in Wasser hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Vor allem der Typ des Anions, die Länge der Alkylketten des Kations und die Temperatur spielen eine entscheidende Rolle. Lipophile ILs sowie ILs mit einem Hexafluorophosphat-, Triflimid- oder perfluorierten Anion gelten allgemein als sehr schlecht wasserlöslich. (Laus et al. 2005)

Bei einigen Versuchen wurden jedoch Hinweise darauf gefunden, dass viele besonders lipophile ILs dennoch in die wässrige Phase ausbluten können. So wurden für verschiedene Ammonium- und Phosphonium-ILs, die Isothiocyanat-, Thiosalicylat- oder 2-(methylthio)benzoat-Anionen enthielten, die Extraktionseffizienzen für Schwermetalle ermittelt. Dabei wurde auch der Schwefelgehalt der wässrigen Phase nach der Extraktion gemessen. Es wurden Schwefelgehalte von 0,08-2,60 mg/l festgestellt. Dies könnte auf schwefelhaltige Verunreinigungen in den ILs hindeuten, jedoch auch auf eine partielle Löslichkeit der ILs in der wässrigen Phase. Sollte der letztere Fall zutreffen, würden die gemessenen Konzentrationen bedeuten, dass 1-10wt% der ILs in die wässrige Phase übergegangen sind. (Fischer, 2011) In einem anderen Versuch wurde für [A336][MTBA] (Tricaprylmethylammonium 2-(Methylthio)benzoat), [PR₄][MTBA] (Trihexyltetradecylphosphonium 2-(Methylthio)benzoat), [A336][TS] (Tricaprylmethylammonium Thiosalicylat), [PR₄][TS] (Trihexyltetradecylphosphonium Thiosalicylat) das Ausbluten der Anionen in die wässrige Phase untersucht.

Dabei wurden 2g IL heftig mit 2ml gereinigtem Wasser bzw. einer 10mM CaCl₂-Lösung geschüttelt und nach erfolgter Zentrifugation der Anionengehalt der wässrigen Phase mittels Ionenchromatografie bestimmt. Das Ergebnis war, dass maximal 0,1wt% der jeweiligen IL in der wässrigen Phase zu finden war. (Stojanovic et al., 2010) Bei einem weiteren Experiment wurde die IL [A336][Met] (Tricaprylmethylammonium Methionat) verwendet, um Uran aus einer wässrigen Lösung zu entfernen. Bei einer Zugabe von 1,5g IL zu 10ml der

Uranlösung kam es zu einer sofortigen Rotfärbung, die auf ein beträchtliches Ausbluten hindeutete. Auch bei wesentlich kleineren Mengen der IL war diese Rotfärbung zu beobachten. (Srncik et al. 2009)

Diese Resultate deuten darauf hin, dass das Ausbluten von ILs bei der Extraktion von Schwermetallen ein Problem darstellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen nach Möglichkeiten gesucht, das Ausbluten von ILs in die wässrige Phase zu verringern, dabei aber gleichzeitig die Extraktionseigenschaften der TSILs zu erhalten.

Eine Option stellt die Immobilisation in Polymermembranen dar. Das Polymer dient dabei als Trägermaterial für die IL. In einem Versuch wurde die IL Tetradecyl(trihexyl)phosphonium chlorid, auch genannt CYPHOS IL 101, in Kapseln aus einem Komposit-Biopolymer (bestehend aus Alginat und Gelatine) eingeschlossen. Danach wurde die Aufnahmefähigkeit für Quecksilber getestet. Das Granulat erwies sich als stabil bei saurem pH, nicht jedoch in alkalischer oder neutraler Lösung. In trockenem Zustand wurden für Quecksilber Aufnahmekapazitäten bis zu $150\text{--}200\text{mg g}^{-1}$ erreicht. Der Einsatz kleinerer Partikel mit einem Trockendurchmesser um $0,5\text{mm}$ führte zu einer schnelleren Einstellung des Aufnahme-Gleichgewichts als die Benutzung größerer Partikel. (Guibal et al., 2008)

Ein anderer Versuch beinhaltete die Immobilisation des quaternären Ammoniumsalzes [A336][TS] in Polyvinylalkohol-Alginat. In Bezug auf die Extraktionseffizienz hat es sich als am günstigsten erwiesen, das Granulat aus 2ml IL , 4g PVA und $0,675\text{g Natriumalginat}$ herzustellen. Die maximale Aufnahmekapazität für Quecksilber betrug bei diesem Experiment $49,89\text{mg g}^{-1}$. (Zhang et al. 2011)

In einem weiteren Experiment wurde das bereits erwähnte CYPHOS IL 101 in Polyvinylchlorid-Membranen immobilisiert, um anschließend Zn(II) aus einer 5M HCl -Lösung zu extrahieren. Dabei konnten Membranen, die bis zu $30\text{wt\% IL}$ enthielten, hergestellt werden. Bei der Extraktion aus einer Zn(II)-HCl -Lösung, die $21,5\text{mg/l Zn}^{2+}$ enthielt, konnten bis zu über 90% des Metallions entfernt werden. (Kogelnig et al. 2011)

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde ein Vorversuch gestartet, [A336][TS] in PVC zu immobilisieren. Danach wurde die Aufnahmefähigkeit der Membranen für Kupfer getestet. Um die Membranen herzustellen, wurde eine solvent casting Methode angewandt, wie sie bei Kogelnig et al. (2011) bereits beschrieben wurde. Die Immobilisation selbst war erfolgreich und die entstandenen Membranen enthielten 30wt% [A336][TS]. Sie wurden in Bezug auf ihre Aufnahmefähigkeit für Kupfer mit [A336][TS] und reinen PVC-Membranen verglichen. Es stellte sich heraus, dass die IL-Membranen ebenso viel Kupfer aufnehmen konnten wie ihre Pendanten ohne IL. Die Immobilisation von [A336][TS] in PVC erwies sich also für Extraktionszwecke als nutzlos.

Bei einem weiteren Vorversuch wurde 1-octyl-4-methylpyridinium nonafluorbutylsulfonat, auch genannt [4MOPYR][NfO], in PVC immobilisiert. Diese IL wurde ausgewählt, da sie ein gutes Extraktionsmittel für Hg^{2+} ist. Der Verteilungskoeffizient für Hg^{2+} bei pH 7 und 25°C ist größer als 1000. (Papaiconomou et al., 2008) Es wurde daher erwartet, dass die fertigen Membranen ebenfalls in der Lage wären, Hg^{2+} aufzunehmen. Die Synthese, die auf dieselbe Weise durchgeführt wurde wie für die [A336][TS]-Membranen, ergab aber extrem inhomogene Membranoberflächen, die sich für Extraktionszwecke nicht eigneten.

Da [4MOPYR][NfO] nicht erfolgreich in PVC eingeschlossen werden konnte, wurde der Entschluss gefasst, stattdessen PVA-Alginat als Trägermaterial auszutesten. Die Prozedur folgte dabei der für [A336][TS] bereits beschriebenen Anleitung zur Herstellung von PVA-Alginat-Granulaten (Zhang et al., 2011). Die Anwesenheit von 10wt% IL im Polymergemisch führte jedoch zu einem stark verminderten Quellvermögen und wesentlich größerer Sprödigkeit des Endprodukts. Das Granulat zeigte außerdem kein Aufnahmevermögen für Quecksilber.

Weitere untersuchte IL's

Abgesehen von den bereits erwähnten Substanzen wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit auch *N*-phenyl-*N'*-(pyridin-2-ylmethyl)-*S*-methylthiuronium iodid, abgekürzt THIOU, untersucht. Über ILs mit Thiuronium-Kationen liegen

bis heute erst vereinzelte Publikationen vor. Eine dieser Publikationen enthält Kristallstrukturen und Synthesevorschriften für verschiedene Thiouronium- und Uronium-ILs, darunter auch für THIOU (Stojanovic et al., 2010). Morgenbesser (2009) hat mit THIOU Mikroextraktionstests (LPME, Liquid Phase Micro Extraction) für Silber und Platin durchgeführt. Dabei wurde ein Tropfen IL mit einem Volumen von 10 µl in 20 ml Metalllösung (Konzentrationen 7 µg/l für den Silberversuch und 8 µg/l für den Platinversuch) eingetaucht, daraus alle 30 min ein Aliquot entnommen und mit ICP-SFMS (induktiv gekoppeltes Plasma Sektorfeld Massenspektrometrie) die Metallkonzentrationen gemessen. Nach 120 min Extraktion waren beim Silberversuch noch 30% des ursprünglichen Silbergehalts in der Lösung enthalten, beim Platinversuch noch 40%. Allerdings zeigte beim Platinversuch die Referenz ebenfalls einen Abfall des Plattingehalts um 20%, was darauf hindeutet, dass sich das Metall zum Teil an die Wände des Gefäßes angelagert hat (Morgenbesser 2009). In einem US-Patent, das am 13.12.2012 publiziert wurde, werden ebenfalls einige Synthesewege für Thiouronium und Uronium-ILs beschrieben (US20120316058). In einer weiteren Publikation wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Kristallstrukturen von cyclischen Thiouronium-ILs behandelt. (Taccardi et al., 2012)

Über die IL [4MOPYR][NfO], die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist neben den Extraktionseigenschaften bekannt, dass die Zersetzungstemperatur bei 298°C und der Schmelzpunkt bei 68°C liegen. Wird die IL mit Wasser in Berührung gebracht, verflüssigt sie sich auch bei Raumtemperatur. (Papaiconomou et al., 2006)

4 Materialien und Methoden

4.1 Synthese der ionischen Flüssigkeiten

Bei der Synthese der Produkte wurden "reagent grade" Chemikalien eingesetzt. Die Lagerung der Produkte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in geschlossenen Glasgefäßen.

4.1.1 Synthese von 1-octyl-4-methylpyridinium nonafluorbutylsulfonat, abgekürzt [4MOPYR][NfO]

Diese zweistufigen Synthese folgte der Anleitung von Papaiconomou et al. (2006)

1.

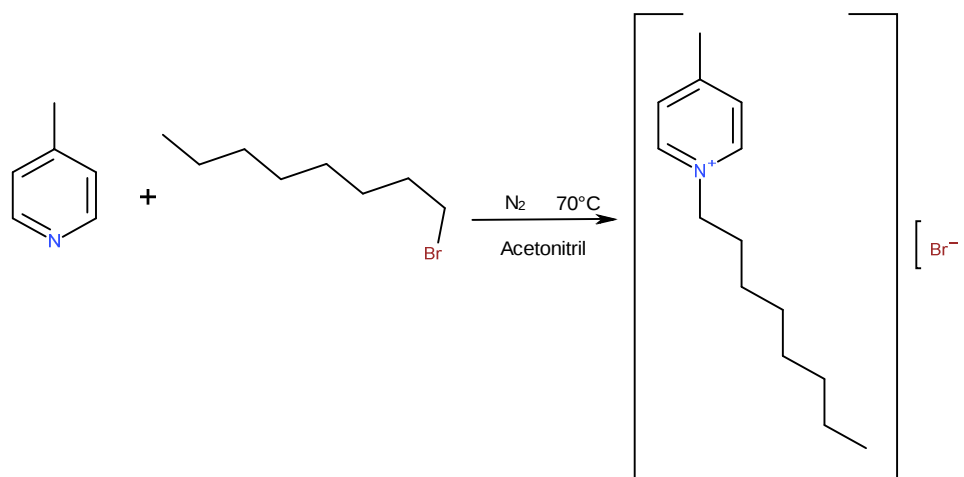


Abb. 2: Bildung des Kations von [4MOPYR][NfO]

2

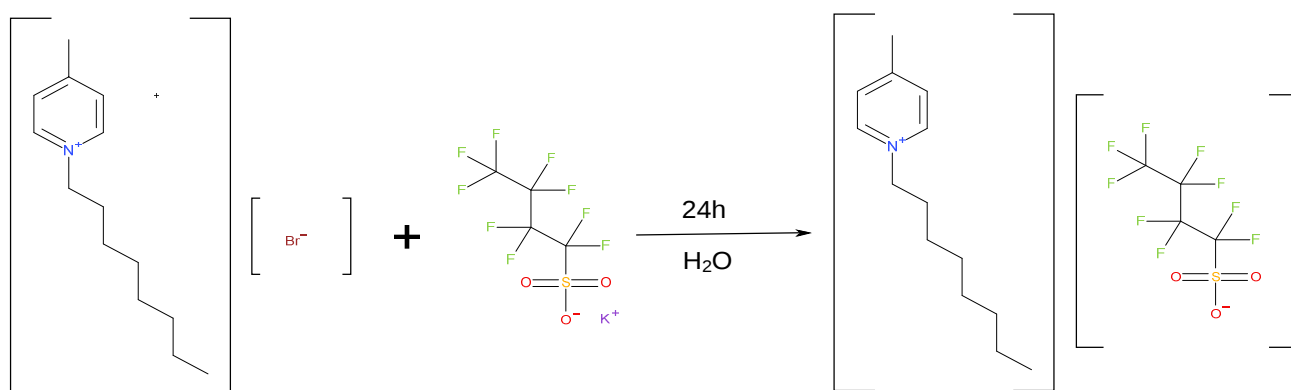


Abb. 3: Anionenaustausch zur Erzeugung von [4MOPYR][NfO]

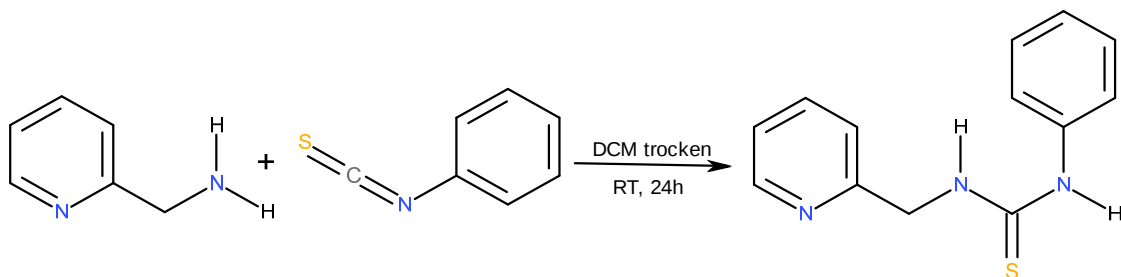
Im zweiten Syntheseschritt wurde über einen Anionenaustausch das Endprodukt erzeugt (Abb. 3). Statt dem angegebenen Lösungsmittel (Acetonitril) wurde jedoch Wasser eingesetzt, da es nicht möglich war, Kaliumnonafluorsulfonat in Acetonitril in Lösung zu bringen. Davon abgesehen folgte die Synthese exakt der Vorschrift. Wie in der Arbeit von Papaiconomou et al. (2006) vorgeschlagen, wurde außerdem ein qualitativer Bromidtest durchgeführt (Fällung mit Silbernitrat). Wurde dabei ein Restgehalt von Bromidionen festgestellt, wurden die Waschschrte wiederholt und erneut auf die Anwesenheit von Bromid hin getestet.

Nach Trocknen bei 10^{-3} bar wurde ein weißes, wachsartiges Produkt erhalten. Ein schwacher Geruch war feststellbar. Die Ausbeuten lagen um 80-90%. Die Reinheit des Produkts wurde mithilfe von ^1H -NMR und Elementaranalyse kontrolliert. NMR-Verschiebungen und errechnete Elementaranalyseprozentzahlen sind bei Papaiconomou et al. (2006) nachzulesen.

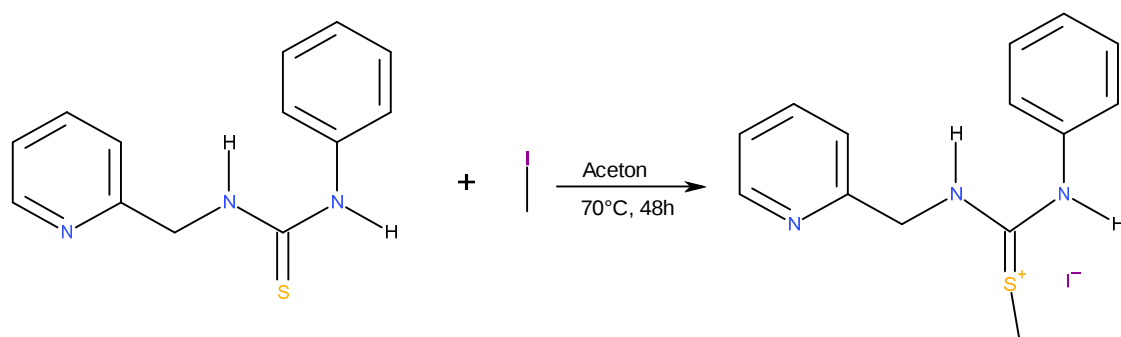
4.1.2 Synthese von *N*-phenyl-*N'*-(pyridin-2-ylmethyl)-*S*-methyl-thiuronium Bis(trifluormethylsufonyl)imid, abgekürzt THIOU

Die dreistufige Synthese folgte der Vorschrift von Stojanovic et. al. (Stojanovic et al., 2010) und ist in den folgenden Abbildungen 4–6 graphisch dargestellt.

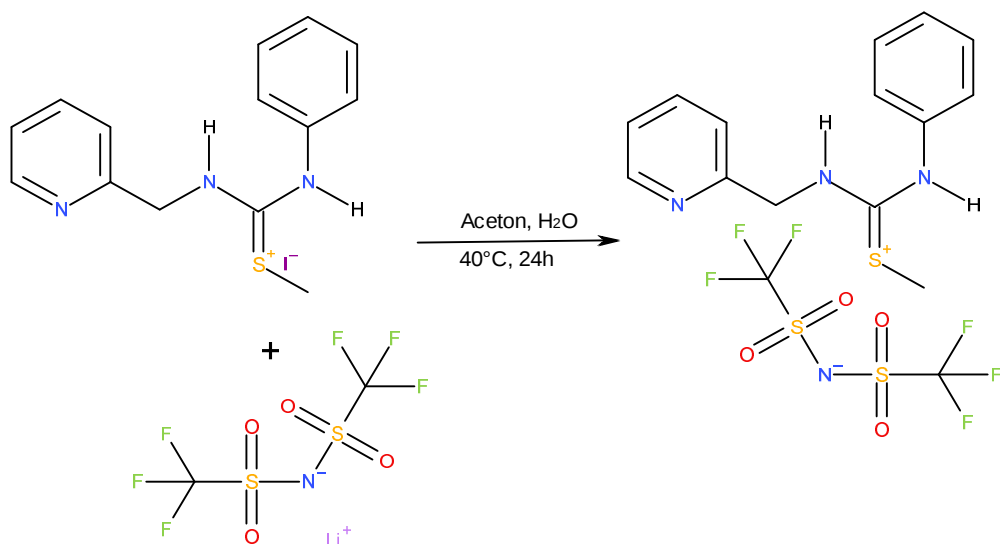
1.

**Abb. 4:** Herstellung der Thiourea-Vorstufe von THIOU

2.

**Abb. 5:** Herstellung des Thiuronium-Kations von THIOU

3.

**Abb. 6:** Anionenaustausch zur Erzeugung von THIOU

Diese Synthese ergab ein grünes, unangenehm riechendes Produkt, das nach ein paar Tagen fest wurde. Der Schmelzpunkt wurde mit einem BÜCHI Schmelzpunktgerät B-545 bei einer Temperaturänderung von 1°C/min ermittelt. Er betrug 49,8°C.

Die Reinheit des Produkts wurde mithilfe von ^1H -NMR und ^{13}C -NMR kontrolliert. NMR-Verschiebungen sind bei Stojanovic et al. (2010) nachzulesen.

4.1.3 Synthese von 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid

Diese wasserlösliche ionische Flüssigkeit wurde synthetisiert, um sie später an das Amino-Polysaccharid Chitosan (Abb. 7) anzubinden.

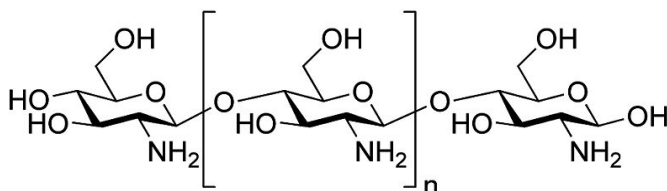


Abb. 7: Strukturformel von Chitosan

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist Chitosan in der Lage, Schwermetalle zu binden, unter anderem auch Quecksilber. [4MOPYR][NfO] ist ebenfalls ein gutes Extraktionsmittel für Quecksilber. Es schien daher naheliegend, dass es die Aufnahmekapazität für Quecksilber erhöhen würde, wenn die IL kovalent an das Biopolymer gebunden würde. Gleichzeitig sollte sich das positive Ladungszentrum der gebundenen IL jedoch nicht zu nah beim Chitosan befinden, da dies die Diffusion des Quecksilbers zum Pyridinring und damit die Bindungsfähigkeit vermindern könnte. Aus diesem Grund wurde entschieden, eine dem [4MOPYR][NfO] ähnliche Substanz zu synthetisieren, die jedoch am Ende ihrer Seitenkette eine Hydroxylfunktion besitzt.

Eine Hydroxylgruppe lässt sich sehr einfach in ein Tosylat umwandeln, bei dem es sich um eine ausgezeichnete Abgangsgruppe handelt. Bei der Reaktion mit einem primären oder sekundären Amin (wie in diesem Fall Chitosan) kann

anschließend die Tosylgruppe abgespalten werden und es resultiert ein sekundäres bzw. tertiäres Amin. (Vollhardt und Schore, 2005)

Der erste Syntheseschritt beinhaltete deswegen die Bildung des Pyridinium-Kations, das anschließend in ein Tosylat umgewandelt werden sollte (siehe Abb. 8).

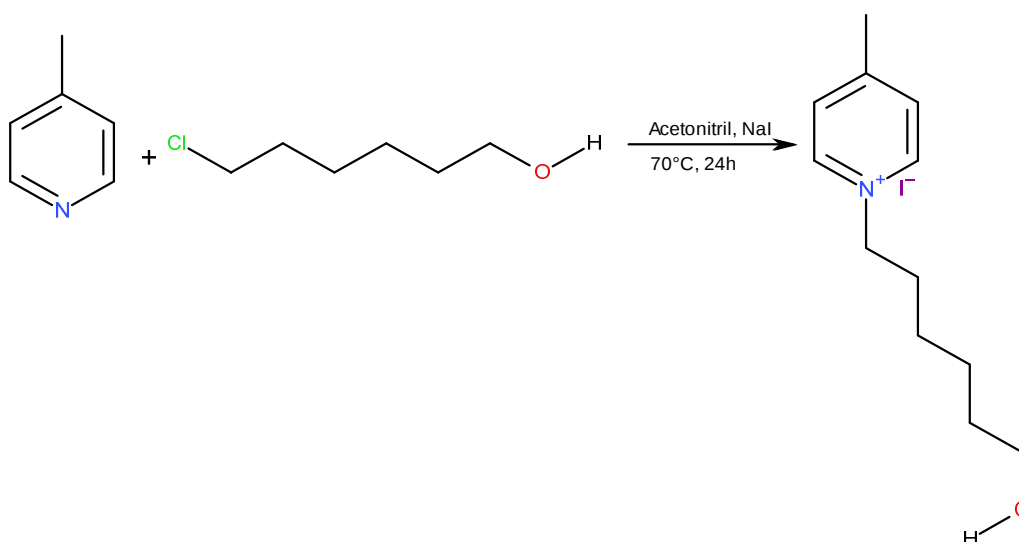


Abb. 8: Synthese von 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid

Zu diesem Zweck wurden 10,7ml 4-Picolin in 120ml Acetonitril gelöst und dann 16,49g NaI zugegeben. Dann wurde die Mischung unter Argon-Atmosphäre und ständigem Rühren auf 70°C erhitzt und tropfenweise 13,3ml Chlorhexanol hinzugefügt. Es kam zu einer sofortigen Trübung der Lösung und die Farbe wechselte von farblos zu hellgelb. Anschließend wurde bei 70°C für 24h refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde nach dem Abkühlen durch einen Weißband-Filter filtriert und der zurückgebliebene Feststoff verworfen. Das im Filtrat enthaltene Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand in 150ml Wasser (milipore) aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit je 100ml Dichlormethan und Diethylether gewaschen und die organischen Phasen verworfen. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknen bei 10^{-3} bar wurde eine intensiv rote, viskose Flüssigkeit erhalten, die sehr gut wasserlöslich ist.

4.1.4 Synthese von Pyridinium-funktionalisiertem Chitosan, abgekürzt PyrChi

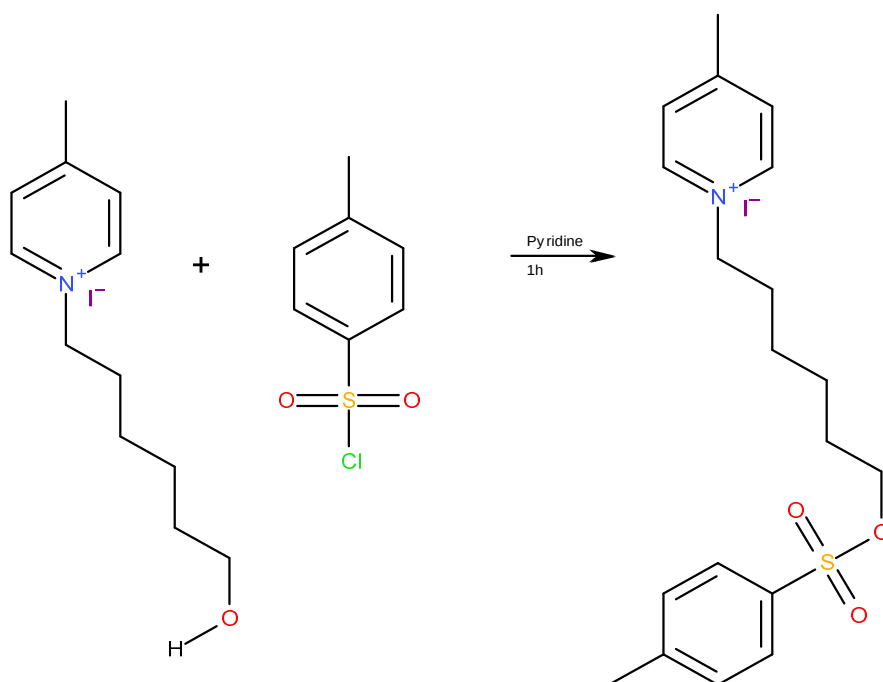


Abb. 9: Synthese des Tosylats von 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodide

Als erstes wurde das später als Lösungsmittel verwendete Pyridin getrocknet, indem so viel MgSO_4 anhydrid zugegeben wurde, bis der so genannte „Schneesturm-Effekt“ eintrat, das heißt, das Salz bei der Zugabe nicht mehr verklumpte. Dann wurde das MgSO_4 abfiltriert und mit der Synthese weiter verfahren. Zunächst wurden 2g 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid unter Argon-Atmosphäre in 25ml Pyridin gelöst und die Lösung gerührt. Dann wurden 1,24g wasserfreies Tosylchlorid zugegeben, wodurch sich die Lösung sofort schwarz verfärbte. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde gerührt. Zum Schluss wurde das Pyridin am Rotavapor entfernt und die entstandene schwarze Flüssigkeit direkt weiterverwendet.

Im zweiten Schritt wurden 2,6g NaOH in 50ml Isopropanol gelöst. Anschließend wurden 2g von 85% deacetylierten Chitosan aus Krabbenschalen zugesetzt und die Mischung unter Argonatmosphäre für 2h auf 50°C erhitzt. Dies diente

dem Zweck, möglichst viele Aminogruppen zu deprotonieren. Danach wurde das zuvor erzeugte Tosylat zugegeben und die Mischung für 48h bei 50°C und Argonatmosphäre gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und der pH der Lösung zuerst mit konzentrierter, dann mit 1M HCl auf 7,4 eingestellt. Der pH wurde dabei mit einer Schott Instruments ProLab2000 Glaselektrode bestimmt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit 100ml Wasser, 200ml Dichlormethan und 200ml Diethylether gewaschen. Dann wurde der entstandene dunkelbraune Feststoff bei 10^{-3} bar getrocknet. Er erwies sich als wasserlöslich, insbesondere unter sauren Bedingungen, aber auch bei alkalischem pH.

4.2 Charakterisierung

Folgend sind die Charakterisierungsdaten der neu synthetisierten Verbindungen aufgelistet:

4.2.1 1-hexyl(6-ol)-4-methylpyridinium iodid

Molekulargewicht: 321,20g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{20}NOI$

NMR-Daten:

1H -NMR (in d_6 -DMSO):

δ 8,928-8,915 (2H, d, CH_{pyr-o}), 7,999-7,986 (2H, d, CH_{pyr-m}), 4,533-4,504 (2H, t, N- CH_2), 3,392-3,368 (2H, t, O- CH_2) 2,617 (3H, s, CH_3-C_{pyr-o}), 1,923-1,863 (2H, m, CH_2), 1,438-1,228 (6H, m, C_3H_6).

Elementaranalyse:

	berechnet	gemessen
C	44,87	44,72
H	6,26	6,01
N	4,36	4,30

4.2.2 PyrChi

NMR-Daten:

^1H -NMR (in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$):

Aufgrund der makromolekularen Struktur des Produkts ist eine eindeutige Zuordnung aller Peaks nicht möglich. Es ist jedoch möglich, das Spektrum des reinen Chitosans mit dem des Produkts zu vergleichen, um daraus Schlussfolgerungen zu ziehen.

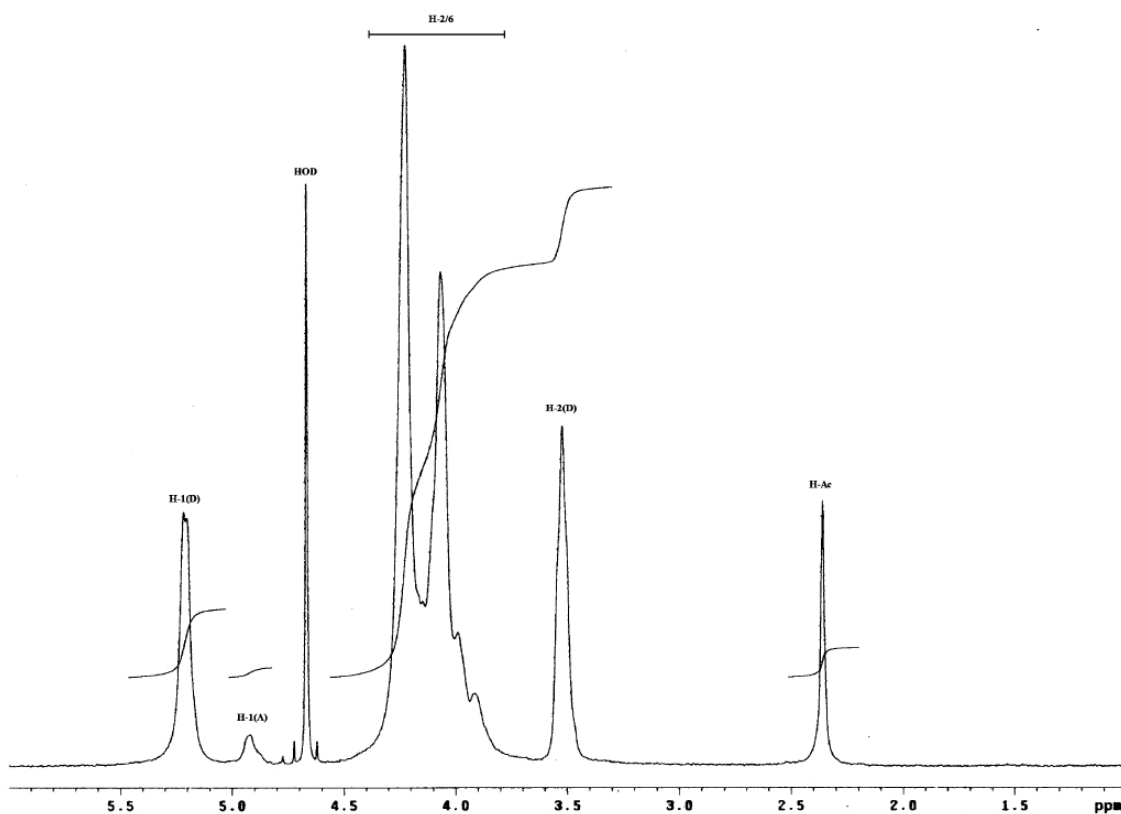


Fig. 2. Chitosan (PCCH00005) ^1H NMR spectrum at 70 °C.

Abb. 10: ^1H NMR-Spektrum von Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 87,5% in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$. Quelle: (Lavertu et al., 2003)

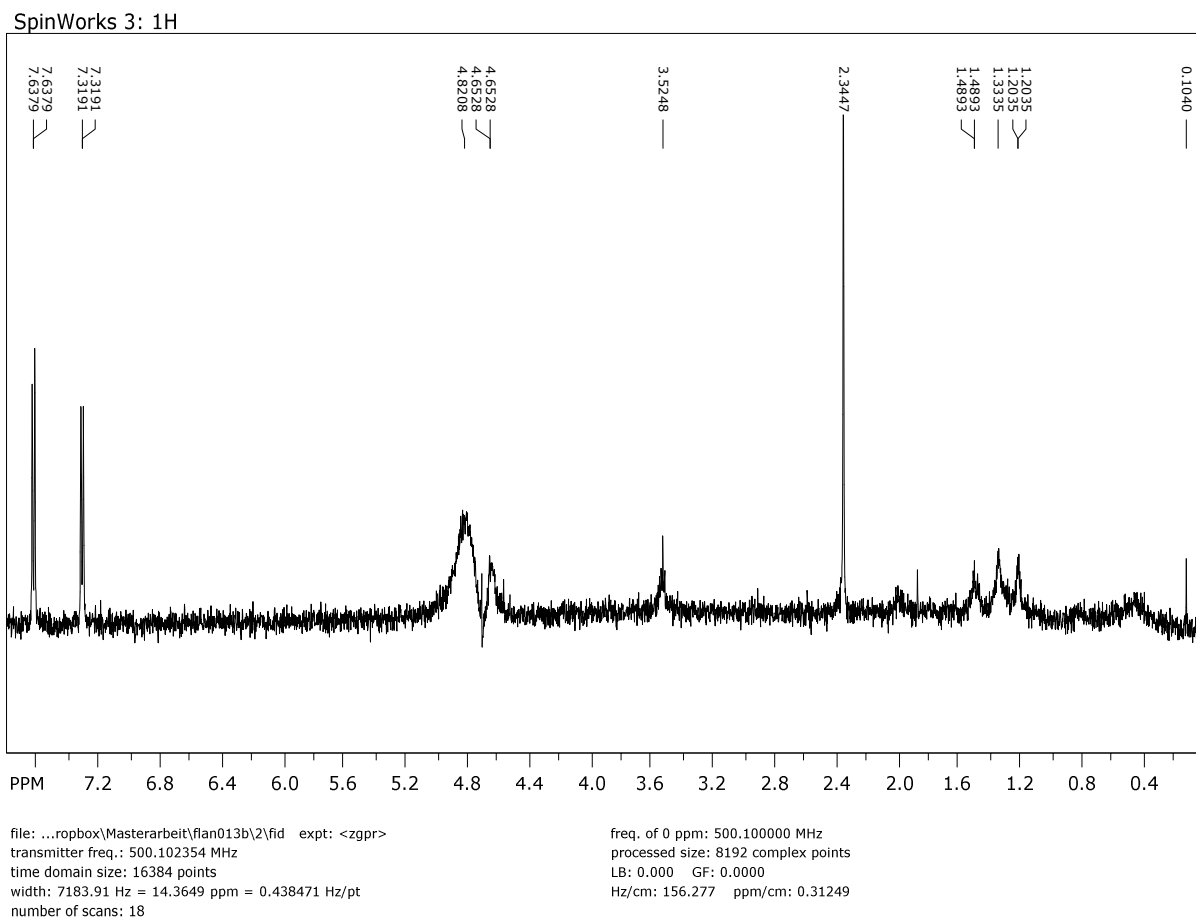


Abb. 11: ^1H NMR-Spektrum von PyrChi (Deacetylierungsgrad von 85%) in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$.

In diesem Spektrum ist die Anwesenheit von Peaks im Bereich von 1,6-1,2mg zu erkennen, was typischen Werten für Alkylsignalen entspricht (Otto, 2000). Dies spricht deutlich dafür, dass eine Alkylierung stattgefunden hat. Im Vergleich mit dem Spektrum des reinen Chitosan finden sich auch zwei Dupletts bei 7,638mg und 7,319mg. Die Verschiebungen stimmen mit jenen überein, die für p-Toluolsulfonsäure bekannt sind (Shao et al., 2006). Es ist deswegen anzunehmen, dass im Endprodukt entweder noch Edukt als Verunreinigung vorhanden war oder Tosylat-Anionen an das nun positiv geladene Makromolekül binden.

4.3 Extraktionen

Bei allen Extraktionsexperimenten, auch den in der Einleitung beschriebenen Membranexperimenten, wurde Millipore-Wasser eingesetzt. Verwendete Chemikalien hatten, wenn nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad „reagent grade“. pHs wurden mithilfe einer Glaselektrode gemessen. Das Gerät war dabei eine Schott Instruments ProLab2000. Die Quecksilberbestimmung wurde mittels Kaltdampf-Atom-Absorptionsspektroskopie (KD-AAS), in einem FIMS 400 von Perkin Elmer durchgeführt. Kupfer- und Cadmium-Konzentrationen wurden mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (F-AAS) bestimmt und das verwendete Gerät war ein Analyst 200 von Perkin Elmer. TOC-Werte wurden über die Verbrennungsmethode mit einem nicht dispersiven Infrarotdetektor (NDIR) in einem TOC-V_{CPH} von Shimadzu bestimmt. Zum Zentrifugieren wurde eine EBA20 Kleincentrifuge von Hettich verwendet. Als Rüttler diente ein Heidolph Vibramax100. Die Waage war eine Sartorius Microanalytical Balance. Für Aufschlüsse und Herstellung von Verdünnungen für die KD-AAS- oder F-AAS-Messungen wurde Suprapur® Salpetersäure verwendet.

4.3.1 Extraktionen mit [4MOPYR][NfO]

Bei diesen Versuchen handelte es sich um Flüssig-Flüssig Extraktionen, um die Extraktionseffizienz der ionischen Flüssigkeit für Quecksilber bei den bestimmten Bedingungen zu testen. Zudem sollten Informationen über das Ausbluten der IL in die wässrige Phase gesammelt werden, da dies in Bezug auf den praktischen Einsatz in Wasserreinigungsanlagen von großer Wichtigkeit ist: Je weniger IL nach der Extraktion im Raffinat enthalten ist, desto weniger IL kann im Raffinat gelöst in die Umwelt gelangen. Insbesondere bei potentiell toxischen Substanzen ist deswegen eine Minimierung des Ausblutens anzustreben. Ein anderes Ziel dieser Versuche war es, Ergebnisse zu erhalten, die mit jenen der Extraktionen mit von in PVC immobilisiertem [4MOPYR][NfO] verglichen werden können. Da die Immobilisierung von [4MOPYR][NfO] in PVC keine Steigerung der Extraktionseffizienz im Vergleich mit reinen PVC-

Membranen erbrachte (in der Einleitung beschrieben), wäre ein solcher Vergleich jedoch sinnlos gewesen.

Als Probenbehältnisse dienten verschließbare 10ml Polyethylenröhrchen.

Hg^{2+} hat die Tendenz, sich an Oberflächen anzuheften, ein Effekt, der stark von den physikalischen (Temperatur, Druck, etc.) und chemischen Bedingungen (Anwesenheit anderer Ionensorten) sowie der ursprünglichen Konzentration des Quecksilbers abhängen kann. (Lo und Wail, 1975) Um diesen Effekt bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigen zu können, wurde auch die Anhaftung des Quecksilbers an die verwendeten Probengefäße untersucht. Zu diesem Zweck wurden Proben ohne IL hergestellt, mit denen anschließend auf dieselbe Weise verfahren wurde wie mit den Proben mit IL.

Um die Stammlösungen für die Extraktionen herzustellen, wurde eine entsprechende Menge von Quecksilber(II)chlorid in Wasser gelöst und anschließend mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung (1g Salz auf 100ml Wasser) auf pH 8,5 eingestellt.

Stammlösung 1: 10mg/l Hg^{2+}

Stammlösung 2: 1mg/l Hg^{2+}

Zur Herstellung der Kontrollen wurden je 10 ml jeder Stammlösung in ein Polyethylenröhrchen hinein pipettiert. Die Proben wurden aus je 10ml Stammlösung und 1g IL hergestellt und ebenfalls in Polyethylenröhrchen eingefüllt. Anschließend wurden Proben und Kontrollen am Rüttler sechs Tage lang bei 330rpm geschüttelt.

Danach wurden die Proben bei 4 000rpm für 5min zentrifugiert, um IL und wässrige Phase voneinander zu trennen und der wässrige Überstand vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette abgenommen. Für die Messung des Quecksilbergehalts wurden die aus der Stammlösung 1 hergestellten Proben mit 2%iger Salpetersäure 1:1000 verdünnt. Die aus Stammlösung 2 hergestellten Proben wurden hingegen 1:100 verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt war erforderlich, da der kalibrierte Messbereich des Geräts zwischen 0,1 und 10 $\mu\text{g/l}$ liegt. Außerdem sollte in den Messlösungen möglichst wenig Carbonat verbleiben, da dieses sonst im Messgerät ausgasen könnte.

Nach dem Verdünnungsschritt wurden die Proben rasch vermessen, um zu verhindern, dass sich das Quecksilber in der Zwischenzeit an die Polyethylenoberfläche anlagert.

Für die DOC-Bestimmungen wurden die Proben 1:10 mit Wasser verdünnt und dann gemessen.

Ein weiteres Extraktionsexperiment wurde bei pH 4,5 durchgeführt. Da die Proben ohnehin bereits sauer waren, wurde vor der FIMS-Messung mit Wasser und nicht mit Säure verdünnt.

Glg. 1: Berechnungsformel für den Verteilungskoeffizienten:

$$D = \frac{(C_{anf} - C_{end})}{C_{end}} \frac{m_w}{m_{IL}}$$

Der in Glg. 1 definierte Gesamtmetall-Verteilungskoeffizient wurde von Papaiconomou et al. (2008) übernommen. Es ist dabei zu beachten, dass das Nernstsche Verteilungsgesetz nur auf eine Teilchenart anwendbar ist, die in beiden Phasen vorhanden ist. In der wässrigen Lösung liegt Quecksilber hauptsächlich in der Form von HgCl_2 vor. Die Quecksilber-Spezies in der ionischen Flüssigkeit sind unbekannt. Es könnten hier auch andere Spezies als HgCl_2 vorliegen. Daher handelt es sich beim Verteilungskoeffizienten D nicht um einen Nernstschen Verteilungskoeffizienten.

In Glg. 1 ist C_{anf} die ursprüngliche Konzentration des Metalls in der wässrigen Lösung in Milligramm pro Kilogramm Lösungsmittel. C_{end} ist entsprechend die Konzentration des Metalls in der wässrigen Lösung am Ende des Versuchs, ebenfalls in Milligramm pro Kilogramm Lösungsmittel angegeben. m_w und m_{IL} stehen jeweils für die Masse der wässrigen Phase bzw. der ionischen Flüssigkeit in Kilogramm.

Bei den Quecksilberextraktionsversuchen wurde diese Formel modifiziert, da sich ein Teil des Quecksilbers an die Oberfläche der eingesetzten Polyethylenröhrchen angelagert hat. Statt C_{anf} wurden die für die

Referenzproben gemessenen Konzentrationen eingesetzt, da sonst irreführend hohe Verteilungskoeffizienten resultieren würden, welche nicht die tatsächliche Aufnahmefähigkeit der IL für Quecksilber widerspiegeln und eine Interpretation der Ergebnisse stark erschweren würden.

Glg. 2: Berechnungsformel für den modifizierten Verteilungskoeffizienten:

$$D_m = \frac{(C_{ref} - C_{end})}{C_{end}} \frac{m_w}{m_{IL}}$$

4.3.2 Extraktionen mit THIOU

Es wurde die Extraktionsfähigkeit für Cadmium und Kupfer getestet, da dafür noch keine Daten vorlagen.

Da der Schmelzpunkt von THIOU bei 49,8°C liegt, wurde die Extraktion bei ständigem Rühren und 55°C in Glasröhren durchgeführt. Dies sollte gewährleisten, dass die IL-Phase und die wässrige Phase gut durchmischt werden und es zur Bildung vieler kleiner IL-Tropfen kommt, die im Verhältnis zum Volumen eine große Oberfläche besitzen.

Zunächst wurden je 0,5g IL mit 20ml Salzlösung vermengt, dann wurde diese Mischung auf 55°C erhitzt und bei Luftkühlung gerührt. Auf dieselbe Weise wurde mit den Referenzproben verfahren, die keinerlei IL enthielten. Nach 48h wurden die Proben abgekühlt und bei 40 000rpm für 10min zentrifugiert, um den Feststoff abzutrennen. Der wässrige Überstand, der schwach grün gefärbt war, wurde nun vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette aufgenommen. Anschließend wurden die Metallkonzentrationen in der wässrigen Phase mittels F-AAS bestimmt. Außerdem wurde der TOC der wässrigen Phase gemessen.

Als Stammlösungen dienten zwei Cadmiumacetat-Lösungen (mit 1mg/l Cd^{2+} und pH 4,5 bzw. 7) und zwei Kupfersulfatlösungen (mit 11,6mg/l Cu^{2+} und pH 4,5 bzw. 7). Der pH wurde mithilfe von 1M Natronlauge eingestellt.

4.3.3 Extraktionsversuche mit PyrChi

Chitosan ist in der Lage, auch in nicht-modifizierter Form verschiedene Schwermetalle zu binden. (Jeon und Höll, 2003)

Da PyrChi hergestellt wurde, um die Extraktionseigenschaften des Chitosans zu verbessern, wurde Chitosan bei den Extraktionen als Referenzsubstanz herangezogen. Wie bei allen anderen Extraktionen wurden auch hier Kontrollproben vorbereitet, die kein PyrChi enthielten. Als Extraktionsgefäße wurden verschließbare 5ml Polyethylenröhrchen verwendet.

Versuch 1:

Es handelte sich um eine zeitaufgelöste Extraktion. Zur Herstellung der Stammlösung mit 11mg/L Quecksilber wurde Hg(II)Cl_2 in Wasser gelöst und mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung auf pH 8,5 eingestellt, da die Extraktionsergebnisse für [4MOPYR][NfO] vermuten ließen, dass Pyridinium-Ionen nur bei neutralem oder alkalischen pH Quecksilber binden.

Je 0,2g PyrChi wurden mit 1ml Stammlösung versetzt und dann am Rüttler bei 330rpm geschüttelt. Ebenso wurde mit der Chitosan-Referenz verfahren. Da es sich um eine zeitaufgelöste Extraktion handelte, wurden die Proben nach einer bestimmten Zeit vom Rüttler genommen und durch 0,2µm Spritzenaufsätze filtriert, um den Feststoff abzutrennen.

Kontrolle (reine Stammlösung): „Extraktionsdauer“ 24h

Chitosan rein: Extraktionsdauer 24h

PyrChi 1: Extraktionsdauer 2h

PyrChi 2: Extraktionsdauer 4h

PyrChi 3: Extraktionsdauer 7h

PyrChi 4: Extraktionsdauer 8h

PyrChi 5: Extraktionsdauer 24h

Aus den für die [4MOPYR][NfO]-Extraktionen bereits beschriebenen Gründen wurden die Proben vor der KD-AAS-Messung mit 2%iger Salpetersäure 1:1000 verdünnt. Im Anschluss an den Verdünnungsschritt wurden die Proben rasch gemessen.

Da einige der gemessenen Werte ungewöhnlich niedrig waren, wurden die Proben erneut bei 1:10 Verdünnung gemessen.

Versuch 2:

Diesmal sollte der Einfluss von Ca^{2+} -Ionen im Extraktionsmedium getestet werden. Dafür wurde eine Stammlösung hergestellt, die 1mg/l Hg^{2+} und 50mg/l Ca^{2+} enthielt und aus Quecksilbernitrat und Calciumchlorid hergestellt wurde. Anschließend wurde der pH mit 1M Natronlauge auf 9 eingestellt.

Zum Vergleich wurde außerdem eine Probe ohne Ca^{2+} hergestellt.

Kontrolle 1 (1mg/l Hg^{2+} mit Calcium)

Kontrolle 2 (1mg/l Hg^{2+} ohne Calcium)

Chitosan rein (0,5g in 10ml Stammlösung 1)

PyrChi 1 (0,5g in 10ml Stammlösung 1)

PyrChi 1 (0,5g in 10ml Stammlösung 2)

Die Proben wurden für 96h bei 330rpm am Rüttler geschüttelt. Anschließend wurden sie wie in Versuch 1 beschrieben gemessen.

Versuch 3:

Es wurde ein Aufschluss durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei der Messung der nicht-aufgeschlossenen Proben unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Biopolymer und Messgerät stattfinden können. Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Menge Hg(II)Cl_2 in Wasser gelöst, um eine 1mg/l Hg^{2+} -

Stammlösung herzustellen. Diese wurde anschließend mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung auf pH 8,5 eingestellt.

Für die Herstellung der Proben wurden 0,2g PyrChi mit 2ml Stammlösung vermischt. Anschließend wurde damit wie in Versuch 1 bereits beschrieben verfahren. Die Extraktion dauerte 48h lang an. Danach wurde je 1ml der Extraktionslösung durch einen 0,2 μm Spritzenaufsatz filtriert, mit Salpetersäure im Verhältnis 1:1 verdünnt und in Teflon-Aufschlussbomben bei 130°C für 1h aufgeschlossen. Die Lösungen verfärbten sich gelb und wurden bei 1:500 Verdünnung per KD-AAS vermessen. Zum Vergleich wurde auch der Quecksilbergehalt der nicht-aufgeschlossenen wässrigen Phasen gemessen.

4.4 Toxizitätsversuche an Algen

4.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Diese Versuche waren an die in ISO-Norm 8692 beschriebene Methode angelehnt, unterschieden sich davon jedoch in einigen Punkten. (Internationale Organisation für Normen, 2012) Unterschiede gab es beim eingesetzten Medium, der Anzahl der Kontrollproben und den eingesetzten Testorganismen.

Bei den beiden Testorganismen handelte es sich um die Algenspezies *Selenastrum capricornutum* und *Scenedesmus acuminatus*.

Bei *Selenastrum capricornutum* handelt es sich um eine einzellige, nicht-mobile und sichelförmige Grünalge mit einem durchschnittlichen Volumen von $40\text{-}60\mu\text{m}^3$. *Selenastrum* kommt im Süßwasser häufig vor. Die Morphologie ist einheitlich und die Algen klumpen nicht zusammen. Das Wachstum ist schnell genug, um in 72h Toxizitätstests eingesetzt werden zu können. Die Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen wird als moderat eingestuft. (Hall und Golding, 1998)

Bei *Scenedesmus Acuminatus* handelt es sich um eine einzellige Grünalgenspezies, bei der 4, 8 oder 16 Einzelexemplare zusammen eine Kolonie bilden. Sie ist ebenfalls häufig im Süßwasser anzufinden. (Enzyklopädie Britannica, 2013)

Beide Spezies wurden vor dem Versuch im Bold 1NV Medium vorkultiviert, demselben Medium, das auch später für die Toxizitätstests eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in der Publikation von Starr und Zeikus (1993) angegeben. Das Vorkultivieren erfolgte bei einer Photonenflussdichte von $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 20°C und bei ständigem Schütteln.

Vor jedem Versuch wurde die Algendichte mithilfe von Utermöhl-Zählkammern bestimmt. Es handelt sich dabei um eine Methode, bei der die Algen angefärbt und anschließend abgezählt werden. (Lund et al., 1958) Bei der Gelegenheit wurde außerdem kontrolliert, dass keine Infektionen durch Pilze oder Fremdalgen vorliegen.

Als Probenbehältnisse dienten 250 Milliliter Schottflaschen von Pyrex, auf die der Deckel lose aufgesetzt wurde, um einen ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen. Um Fremdkontaminationen zu vermeiden, wurden alle Materialien, die mit den Algen in Kontakt kommen würden, vor dem Versuch autoklaviert. Auch das Medium wurde autoklaviert, dabei wurden Volumensverluste durch Verdunstung nicht ausgeglichen. Als Lichtquelle dienten 36W T5 Leuchtstoffröhren für normales Tageslicht, die den ganzen Versuch lang (72h) eingeschaltet blieben. Der Raum, in dem die Versuche durchgeführt wurden, wurde dunkel gehalten, um Einwirkung durch Fremdlicht zu vermeiden. Mit einem Hansatech Light Meter Type QRT1 wurde ermittelt, dass der optimale Abstand für die Probengefäße von der Lichtquelle 22,5 cm beträgt. Die Lichtausbeute bei dieser Entfernung betrug $75\text{--}80\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Eine Temperaturmessung bei eingeschalteter Lampe ergab eine Durchschnittstemperatur von 28°C in den Kulturen. Um eine gleichmäßige Beleuchtung der Algen zu gewährleisten, wurden sie ständig mit einer Geschwindigkeit von 16rpm gerührt. Nach jedem Tag wurden die Probengefäße vertauscht, um zu verhindern, dass die Position einen Einfluss auf das Wachstum hat, da leichte Unterschiede bei der Lichtausbeute und Temperatur der Proben nicht vermieden werden konnten.

Aus den Ergebnissen der Zellzählung wurde errechnet, welche Menge an Algenlösung zugegeben werden muss, um eine Endkonzentration von 5×10^3 bis 10^4 Zellen pro Milliliter zu erhalten. Mit diesen niedrigen Konzentrationen sollte gewährleistet werden, dass während des Versuchs keine zu großen pH-Änderungen auftreten, die sich negativ auf das Wachstum auswirken würden. pH-Messungen vor und nach den Versuchen ergaben, dass die Drift jedes Mal weniger als 1,5 Einheiten betrug und damit den in ISO 8692 angegebenen Bedingungen entsprach. Die Inokuli waren bei jedem der Versuche weniger als fünf Milliliter groß, um eine allzu große Verdünnung der Kulturen zu vermeiden.

Präpariert wurden die Kulturlösungen, indem mit IL versetztes Wasser mit Algenkulturmedium vermischt und dann das Algen-Inokulum zugegeben wurde. Das Gesamt-Volumen einer einzelnen Probe betrug zu Beginn des Versuchs 200ml. Wie die Herstellung der Probenlösungen im Detail vonstattengegangen

ist, wird unter dem Punkt „Sättigung der wässrigen Phase mit ionischer Flüssigkeit“ und unter „Probenschema“ erläutert.

Proben für die Messungen wurden mit einer 10ml Kolbenhubpipette entnommen.

Täglich wurden für die UV-VIS Messungen jeweils 30ml, für die PAM-Fluoreszenzmessungen je 10ml von den Kulturen entnommen.

Nach Abschluss des Versuchs waren also von den ursprünglichen 200ml Probenlösung nur mehr 40ml in den Kulturgefäßen übrig. Dieser Volumsverlust wurde nicht ausgeglichen.

4.4.2 Sättigung der wässrigen Phase mit ionischer Flüssigkeit

Nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion werden zwei Phasen erhalten, der Extrakt und das Raffinat. (Otto, 2000) Bei einer Extraktion von Schwermetallen aus wässriger Lösung mit ILs ist die IL-Phase der Extrakt, die wässrige Phase das Raffinat. Da ILs schwerflüchtig sind, kann folglich nur so viel IL in die Umwelt gelangen, wie im Raffinat ursprünglich enthalten war.

Um die Bedingungen einer Flüssig-Flüssig-Extraktion zu simulieren, wurde untersucht, wie viel von den ILs [4MOPYR][NfO] und THIOU beim Schütteln mit Wasser in die wässrige Phase ausblutet und wie toxisch die resultierende wässrige Phase für Algen ist.

Um die Endkonzentrationen der ILs in der wässrigen Phase zu ermitteln, wurde vor jedem Toxizitätstest der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) gemessen. Aus diesen Werten wurde anschließend die Konzentration der IL in der wässrigen Phase errechnet.

Für die Experimente mit [4MOPYR][NfO] wurde 1g der IL eingewogen und mit 10ml Millipore-Wasser in Polyethylenröhrchen eingefüllt. Dann wurde die Mischung für 48h am Rüttler bei 330rpm geschüttelt. Dabei wurde der weiße Feststoff wie von Papaiconomou (2008) beschrieben nach wenigen Stunden flüssig. Schließlich wurde 5min lang bei 4 000rpm zentrifugiert, der wässrige Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und weiter verwendet.

Bei den THIOU-Experimenten wurden 0,5g der IL und 20ml Wasser in ein Glasröhrchen gegeben und die Mischung unter ständigem Rühren und Luftkühlung für 48h auf 55°C erhitzt. Dies diente dem Zweck, erstens die Bedingungen bei den Extraktionsversuchen zu simulieren und zweitens die IL zu verflüssigen, da sie bei Raumtemperatur ein Feststoff ist. Nach den 48h wurde der Inhalt der Glasröhren in Polyethylenröhrchen überführt und 10min bei 4 000rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand zeigte eine grünliche Färbung, die auch nach Filtrieren durch einen Spritzen-Filteraufsatz mit 0,2µm Porengröße nicht verschwand. Wie zuvor wurde die wässrige Phase nach dem Zentrifugieren vorsichtig mit einer Kolbenhubpipette aufgenommen.

4.4.3 Probenschema

Um statistische Ausreißer identifizieren zu können, wurden für jede der zu testenden IL-Konzentration drei eigene Algenkulturen präpariert. Die Kontrollproben enthielten keine IL, nur Algenkulturmedium.

Die Konzentrationen der verwendeten IL-Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle 1 angegeben. Die 10% Proben wurden beispielsweise hergestellt, indem 20ml des mit IL gesättigten Wassers mit 180ml Algenkulturmedium vermischt wurde. Auf die gleiche Weise wurden die Kulturen mit IL-Konzentrationen von 1%, 0,1% und 0,01% hergestellt.

Tabelle 1: Schema der Algenkulturproben

Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
10% IL-Mischung	10% IL-Mischung	10% IL-Mischung
1% IL-Mischung	1% IL-Mischung	1% IL-Mischung
0,1% IL-Mischung	0,1% IL-Mischung	0,1% IL-Mischung
0,01% IL-Mischung	0,01% IL-Mischung	0,01% IL-Mischung

4.4.4 PAM-Fluoreszenz

Die PAM-Fluoreszenzmethode ermöglicht es, die Photosyntheseaktivität von Algenproben abzuschätzen. Der erste wesentliche Schritt bei der Photosynthese in Pflanzen stellt die Oxidation des Wassers dar. Dies findet beim Photosystem II (PSII) statt, einem Protein-Komplex und Reaktionszentrum, das Chlorophyll a enthält und sich in den Thylakoid-Membranen der Chloroplasten befindet. Die Oxidation des Wassers läuft wie folgt ab: Zunächst wird ein Elektron im PSII durch ein Photon angeregt und an ein Nachbarmolekül (Phaeophytin) weitergegeben. Dann wird PSII über einen Elektronendonator (Yz) wieder reduziert und es entsteht Yz^+ . Yz^+ oxidiert anschließend Wasser und kehrt dadurch in den Ursprungszustand Yz zurück. (Consalvey et al., 2005)

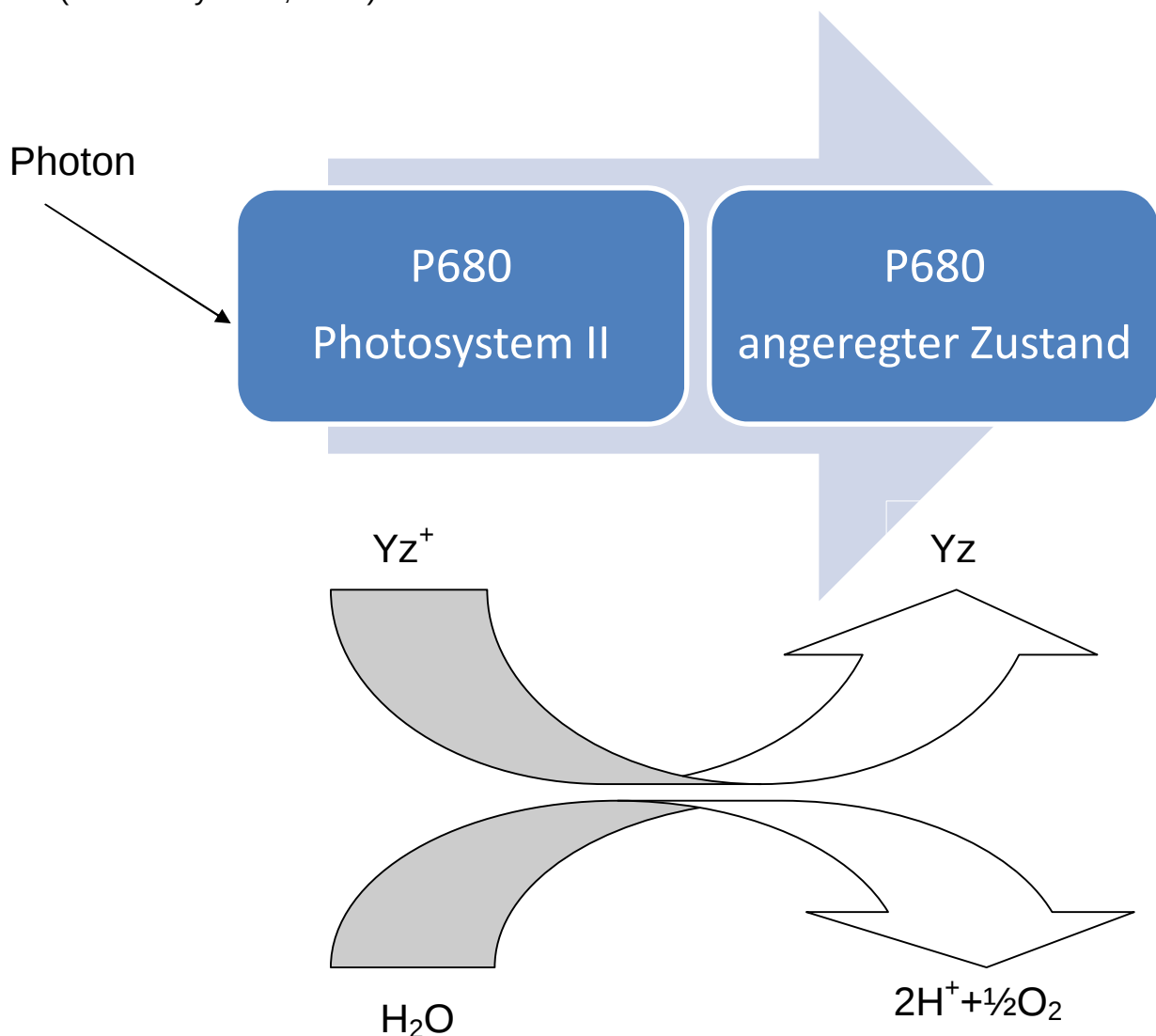


Abb. 12: Lichtreaktionen des Photosystems II. Verändert nach Consalvey et al., 2013

PSII fluoresziert im angeregten Zustand stärker als im nicht-angeregten. Eine „gesunde“ Pflanze, die in der Lage ist, Photosynthese zu betreiben, wird daher stärker fluoreszieren als eine „kranke“. Pflanzen fluoreszieren jedoch auch, wenn sie nicht Photosynthese betreiben. Dieses Grundniveau wird F_0 genannt. Die maximale Fluoreszenz, wenn die Zelle maximale Photosynthese betreibt, wird als F_m abgekürzt. Die Differenz zwischen der maximalen Fluoreszenz und dem Grundlevel wird als F_v bezeichnet. Die Fluoreszenzrate wird mit $Y(II)$ abgekürzt und ergibt sich aus der Division von F_v durch F_m . Je größer $Y(II)$ ist, desto größer ist die Photosyntheseaktivität der Zelle. (Baker, 2008)

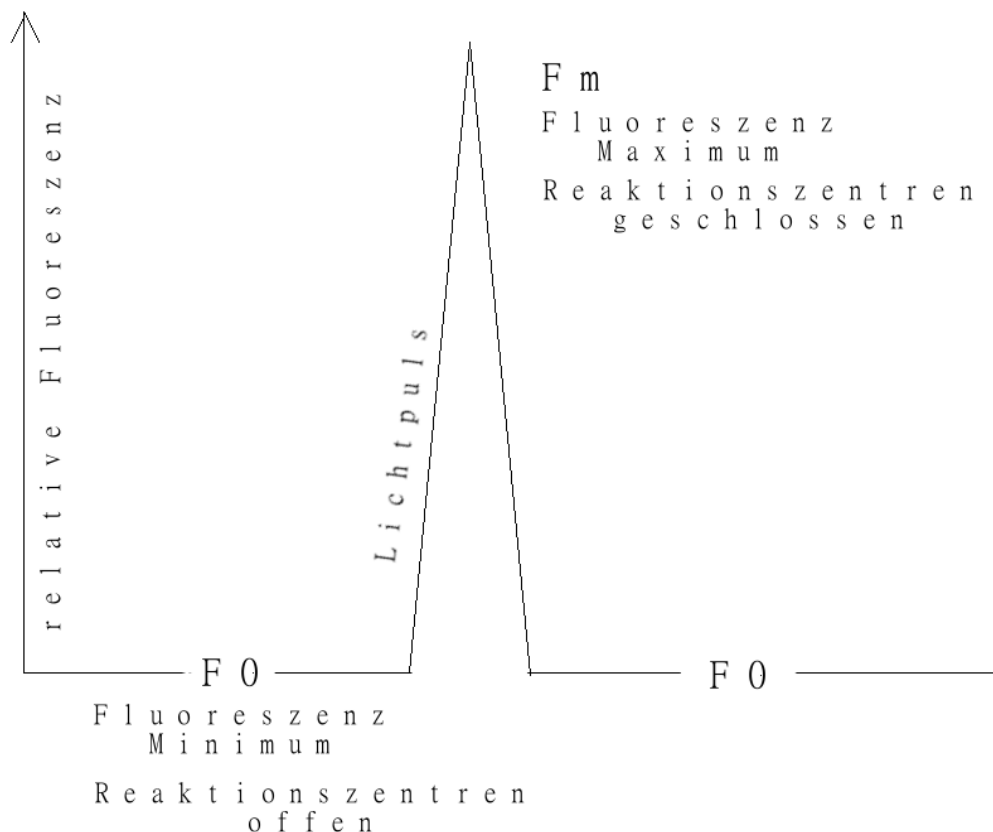


Abb. 13: Theoretische Detektion der Fluoreszenz bei dunkeladaptierten Proben. Verändert nach Consalvey et al., 2013

Die Fluoreszenz ist jedoch nicht alleine von der Aktivität der Algen abhängig. Fluoreszenzaktive Substanzen in der Zelle, Quenching und andere Effekte

können das Ergebnis verzerren. Deswegen ist die Fluoreszenzrate nur dann aussagekräftig, wenn sie mit anderen Methoden ergänzt wird, etwa der Messung des Chlorophyll a Gehalts. (Baker, 2008)

Im Zuge dieser Arbeit wurden Messungen an dunkeladaptierten Algen durchgeführt. Dabei wurden die Algenproben zunächst für 20min der Dunkelheit ($<10\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) ausgesetzt, damit sich alle Reaktionszentren öffnen. Dann wurden sie kräftig geschüttelt und je 3ml der Algenlösung in eine an allen Seiten durchsichtige Quarzküvette pipettiert. Diese wurde in die dafür vorgesehene Halterung des PAM2500-Messgeräts der Firma Walz gesteckt und Y(II) gemessen. Die Geräteeinstellungen finden sich im Anhang der Arbeit.

Die verbliebenen 7ml Probe wurden im Zweifelsfall für Kontrollmessungen herangezogen oder verworfen.

4.4.5 Chlorophyll a Bestimmung

Chlorophyll a ist der grüne Pflanzenfarbstoff und spielt bei der Photosynthese eine zentrale Rolle. Es handelt sich dabei um ein Pyrrolringssystem, das Ähnlichkeiten zum Häm im Hämoglobin aufweist. Im Zentrum des Komplexes befindet sich ein zweiwertiges Magnesiumatom. (Grimm et al., 2006)

Das Absorptionsspektrum des Chlorophyll a besitzt bei 663nm ein Maximum. Bei 750nm befindet sich kein Peak, es ist also möglich, bei dieser Wellenlänge den Probenhintergrund zu messen. (Lorenzen, 1967)

Glg. 3: Formel nach Lorenzen, 1967

$$\text{Chla}[\mu\text{g} / \text{l}] = \frac{11,4 \cdot (E_{663} - E_{750}) \cdot v}{V \cdot d}$$

Chla... Chlorophyll a

E663... Extinktion bei einer Wellenlänge von 663nm

E750... Extinktion bei einer Wellenlänge von 750nm

d... Küvettendicke in Zentimeter

v... Volumen des Extrakts in Milliliter

V... Volumen der filtrierten Wasserprobe in Litern

Die Chlorophyll a Bestimmung folgte der Methode nach Lorenzen (1967). Die Messung wurde in Quarzküvetten und mit einem Perkin Elmer Lambda35 UV-Vis-Spektrometer vorgenommen.

5 Resultate und Diskussion

5.1 Resultate der Extraktionen

5.1.1 Hg-Extraktion mit [4MOPYR][NfO]

Konzentrationen vor der Extraktion:

Stammlösung 1: 10mg/l Hg^{2+}

Stammlösung 2: 1mg/l Hg^{2+}

Ergebnisse Versuch 1 (bei pH 8,5):

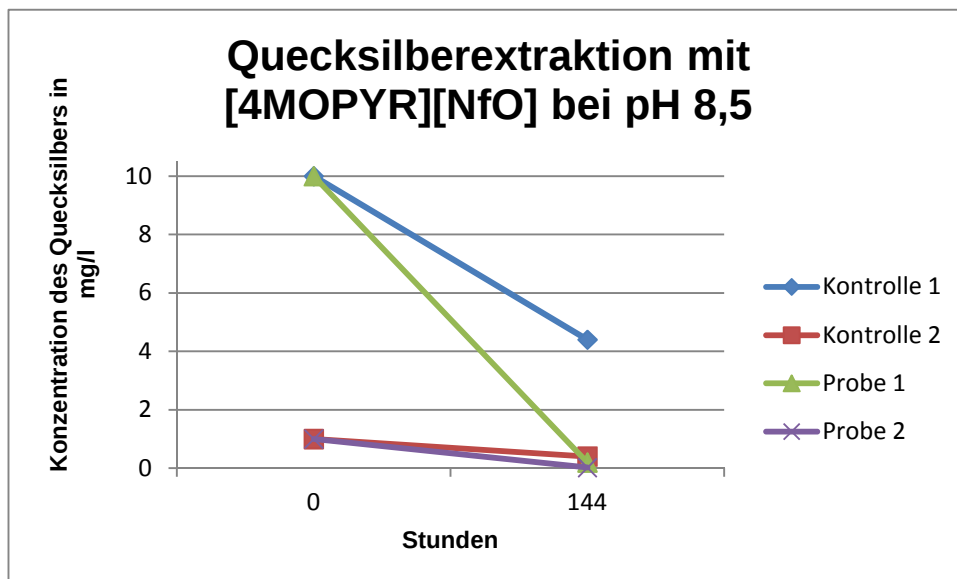


Abb. 14: Abfall des Quecksilbergehalts bei Extraktion mit [4MOPYR][NfO] innerhalb von 144 Stunden und bei pH 8,5.

Kontrolle 1: 4,40mg/l Hg^{2+}

Kontrolle 2: 0,40mg/l Hg^{2+}

Probe 1: 0,20mg/l $\rightarrow D_m = 232$

Probe 2: 0,02mg/l $\rightarrow D_m = 210$

Ergebnisse Versuch 2 (bei pH 4):

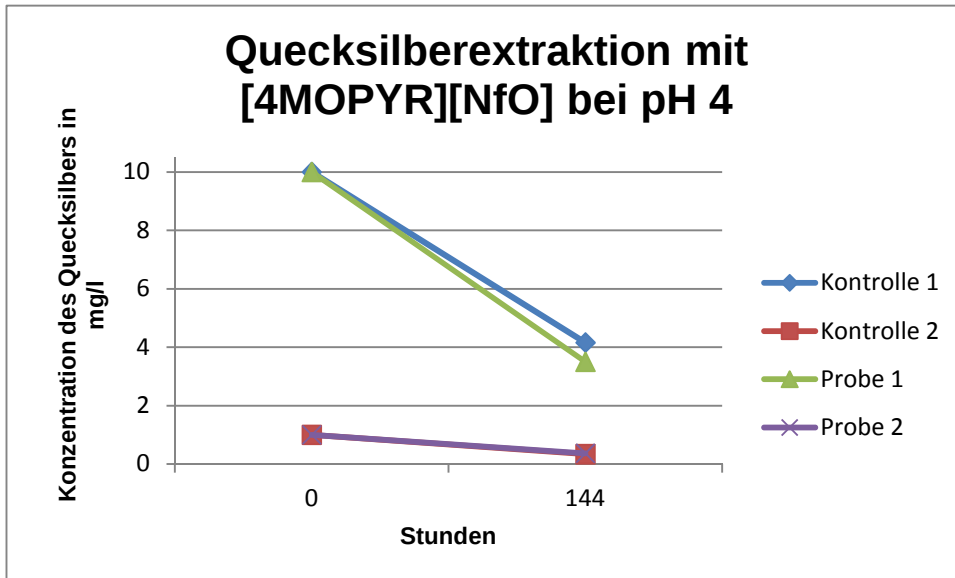


Abb. 15: Abfall des Quecksilbergehalts bei Extraktion mit [4MOPYR][NfO] innerhalb von 144 Stunden und bei pH 4.

Kontrolle 1: 4,16mg/l Hg^{2+}

Kontrolle 2: 0,34mg/l Hg^{2+}

Probe 1: 3,50mg/l

Probe 2: 0,37mg/l

Die Resultate des ersten Versuchs mit [4MOPYR][NfO] weisen auf ein gutes Extraktionsvermögen hin, auch wenn die Extraktionskoeffizienten unter jenen in der Publikation von Papaiconomou (2008) angegebenen liegen. Leider finden sich in dieser Publikation keine Informationen darüber, ob die Anlagerung des Quecksilbers an die Extraktionsbehältnisse kompensiert wurde oder aus

welchem Material die Behältnisse beschaffen waren, weswegen ein Vergleich der Resultate schwierig erscheint. (Papaiconomou et al., 2008)

Überdies ist es unerforscht, wie sich die Präsenz anderer zweiwertiger positiver Ionenspezies wie Ca^{2+} oder organischer Liganden in der Extraktionslösung auf die Extraktionseffizienz auswirkt.

Bei dem Versuch fällt auf, dass die Aufnahmefähigkeit des [4MOPYR][NfO] offenbar vom pH der Extraktionslösung abhängig ist, da bei einem pH von 4 keine Quecksilberaufnahme beobachtet werden konnte. Über den Mechanismus der Bindung des Quecksilbers an Pyridinium-ILs ist meines Wissens noch nichts bekannt. Jedoch gibt es in der Literatur einige allgemeine Beobachtungen zur Löslichkeit von Metallverbindungen in ILs: In einem zweiphasigen IL-Wasser-System partitionieren die meisten Metallionen bevorzugt in die wässrige Phase. Einfache Ionenverbindungen sind üblicherweise schlechter löslich als Komplexverbindungen und beim Löseprozess findet häufig eine Komplexbildung des Metallions statt. (Welton und Wasserscheid, 2002)

In Bezug auf zukünftige Studien an Pyridinium-ILs sollte auch die Erforschung des Bindungsmechanismus von Schwermetallen in Erwägung gezogen werden. Denn Informationen darüber könnten ermöglichen, Pyridinium-ILs nach dem TSIL-Prinzip (wurde in der Einleitung schon erläutert) für die Extraktion von Quecksilber maßzuschneidern.

5.1.2 Cu- und Cd-Extraktion mit THIOU

Cu:

Kontrolle sauer: 11,65mg/l Cu^{2+}

Nach Extraktion mit IL: 0,24mg/l Cu^{2+} → Extraktionskoeffizient 1950

Kontrolle neutral: 11,40mg/l Cu^{2+}

Nach Extraktion mit IL: 0,24mg/l Cu^{2+} → Extraktionskoeffizient 1908

Sowohl während der Extraktion des Cadmiums als auch des Kupfers kam es zu einer Schwarzfärbung der IL, ein deutlicher Hinweis auf die erfolgte Metallaufnahme.

Die Resultate für die Kupferextraktion zeigen deutlich, dass THIOU ein gutes Bindungsvermögen für Cu^{2+} aufweist. Um mit handelsüblichen ILs in Bezug auf die Extraktionseffizienz für Kupfer konkurrieren zu können, müssten Thiouronium-ILs einen Extraktionskoeffizient von $>50\,000$ aufweisen, wie es bei der IL TOMATS (trioctylmethylammonium thiosalicylat) der Fall ist (sigmaaldrich). Dies ist bei THIOU noch nicht gegeben. Für zukünftige Forschungen an Thiouronium-ILs wäre ein logischer Schritt die Erforschung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Kupferextraktion. Sobald hinreichend beantwortet wäre, welche Mechanismen für die Bindung von Kupfer an Thiouronium-ILs verantwortlich sind, wäre es möglich, ILs nach dem TSIL-Prinzip (in der Einleitung erklärt), für diesen Zweck maßzuschneidern.

Cd:

Kontrolle sauer: $0,913\text{mg/l Cd}^{2+}$

Nach Extraktion mit IL: $0,560\text{mg/l Cd}^{2+} \rightarrow$ Extraktionskoeffizient 25

Kontrolle neutral: $0,908\text{mg/l Cd}^{2+}$

Nach Extraktion mit IL: $0,565\text{mg/l Cd}^{2+} \rightarrow$ Extraktionskoeffizient 24

Die Resultate für die Extraktion von Cadmium sind deutlich weniger vielversprechend als jene für das Kupfer. Zwar scheint das Metallion bei einer Extraktion aus wässriger Lösung bevorzugt in die IL-Phase überzugehen, doch der maximale Verteilungskoeffizient liegt sehr weit unter jenem des käuflich erwerblichen TOMATS ($>50\,000$). (sigmaaldrich)

Für ILs mit der Thiourea-Funktionalität wurden teils ähnliche Verteilungskoeffizienten gefunden. So konnten bei einer 1:1 Mischung verschiedener Thiourea-funktionalisierter Imidazolium-ILs mit [1-alkyl-3-methylimidazolium][hexafluorophosphat] Extraktionskoeffizienten um 10 herum erreicht werden. Getestet wurde dies bei unterschiedlichen pHs (Visser et al., 2002).

Das Anbringen einer positiven Ladung an der Thioharnstoff-Funktionalität führt also womöglich zu einer leichten Verbesserung der Extraktionseffizienz. Allerdings muss bedacht werden, dass es sich bei den von Visser untersuchten Substanzen um Imidazolium-Verbindungen handelt, in diesem Fall aber kein Imidazolium-Ring, sondern ein Pyridinring im Molekül enthalten war. Um festzustellen, welchen Einfluss die chemische Struktur des Rings hat, müssten Thiouronium-ILs mit einem Imidazoliumring auf ihre Cadmium-Aufnahmefähigkeit getestet werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Extraktion von Cadmium mit THIOU wenig vielversprechende Aussichten für zukünftige praktische Anwendungen bietet. Die Kupferextraktion erscheint im Vergleich dazu wesentlich aussichtsreicher.

5.1.3 Extraktion von Quecksilber mit PyrChi

Versuch 1:

Messung bei 1:1000 Verdünnung mit 2% HNO_3

Kontrolle (nach 24h Extraktion): 10,8mg/l

Chitosan rein (Extraktionsdauer 24h): 0,13mg/l Hg^{2+}

PyrChi 1 (Extraktionsdauer 2h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 2 (Extraktionsdauer 4h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 3 (Extraktionsdauer 7h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 4 (Extraktionsdauer 8h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 5 (Extraktionsdauer 24h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

Messung bei 1:10 Verdünnung mit 2% HNO_3

Chitosan rein (Extraktionsdauer 24h): 42,2 $\mu\text{g/l}$ Hg^{2+}

PyrChi 1 (Extraktionsdauer 2h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 2 (Extraktionsdauer 4h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 3 (Extraktionsdauer 7h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 4 (Extraktionsdauer 8h): unter 0,1 $\mu\text{g/l}$ (Nachweisgrenze) bei Messung

PyrChi 5 (Extraktionsdauer 24h): 1,2 $\mu\text{g/l}$ Hg^{2+}

Versuch 2:

Wie bei Versuch 1 wurde auch bei diesem Versuch vor der Messung mit 2% HNO_3 verdünnt. Bei der Messung kam jedoch zu einer Aufspaltung der Messsignale und zur Signalverbreiterung. Die Messergebnisse konnten nicht

reproduziert werden, was darauf hindeutet, dass die Anwesenheit von gelöstem Chitosan oder PyrChi im Messgerät die Ergebnisse verfälscht.

Es wurde deswegen bei einigen Proben ein Aufschluss mit Suprapur® Salpetersäure durchgeführt, um bei der anschließenden Quecksilbermessung Störungen durch Chitosan oder PyrChi ausschließen zu können.

Versuch 3:

Messung nach Aufschluss (insgesamt 1:100 verdünnt):

Probe 1: 10,86mg/l Hg^{2+}

Probe 2: 10,81mg/l Hg^{2+}

Messung vor Aufschluss (1:100 verdünnt)

Probe 1: 0,4mg/l Hg^{2+}

Probe 2: 0,3mg/l Hg^{2+}

Interpretation:

Die Ergebnisse von Versuch 3 zeigen ohne Zweifel, dass PyrChi nicht in der Lage ist, zweiwertiges Quecksilber aufzunehmen. Wenn nicht aufgeschlossen wird, kann die Anwesenheit des Biopolymers im FIMS-Spektrometer zu verfälschten Ergebnissen führen.

PyrChi ist also ungeeignet, um Quecksilber zu extrahieren. Die Pyridinium-Funktion hat in kovalenter Bindung an das Chitosan ihre Fähigkeit eingebüßt, Hg^{2+} zu binden. Dies muss aber nicht bedeuten, dass der Ansatz, ILs auf Chitosan zu immobilisieren, nicht weiterverfolgt werden sollte.

Denn bei Chitosan handelt es sich um einen billigen und leicht herstellbaren Rohstoff, der in den meisten Studien nur minimale toxische Effekte gegenüber den getesteten Pflanzen- und Tierarten zeigte. Seine Bioabbaubarkeit hängt von der Masse des Polymers und vom Grad seiner Deacetylierung ab. (Kean und Thanou, 2010)

5.2 Resultate der Toxizitätstests

Die Ergebnisse der Toxizitätstests von THIOU und der Alge *S. capricornutum* sind in den nachfolgenden Abbildungen 16+17 dargestellt. Die Säulendiagramme geben die Mittewerte von jeweils 3 Proben an, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

5.2.1 Toxizitätsresultate für THIOU bei *Selenastrum capricornutum*, „Control“: Algenmedium pur.

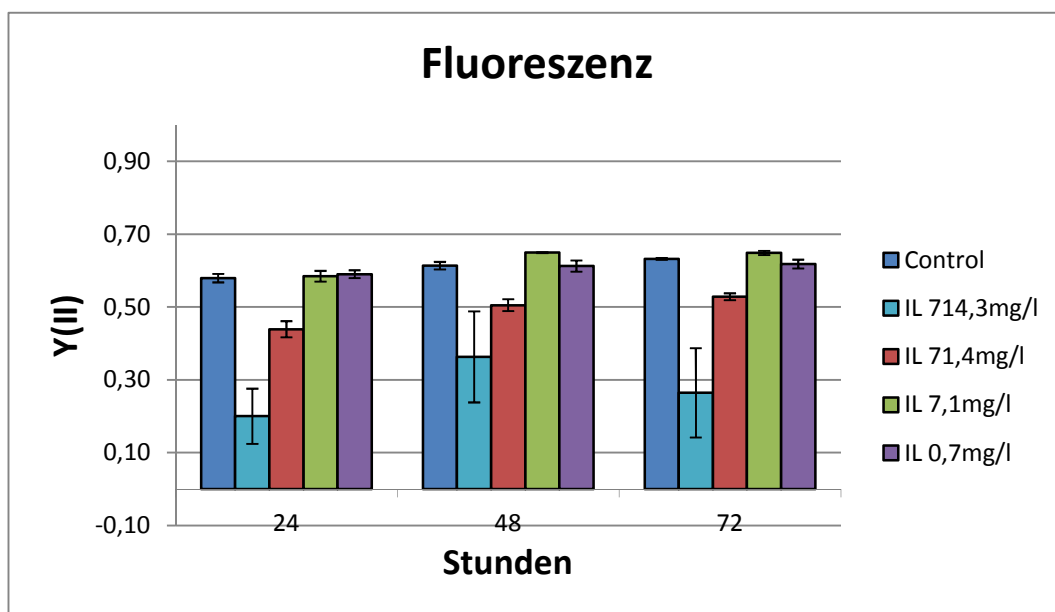


Abb. 16: Ergebnisse der Fluoreszenzratenbestimmung für *Selenastrum capricornutum* bei den mit THIOU inkubierten Proben.

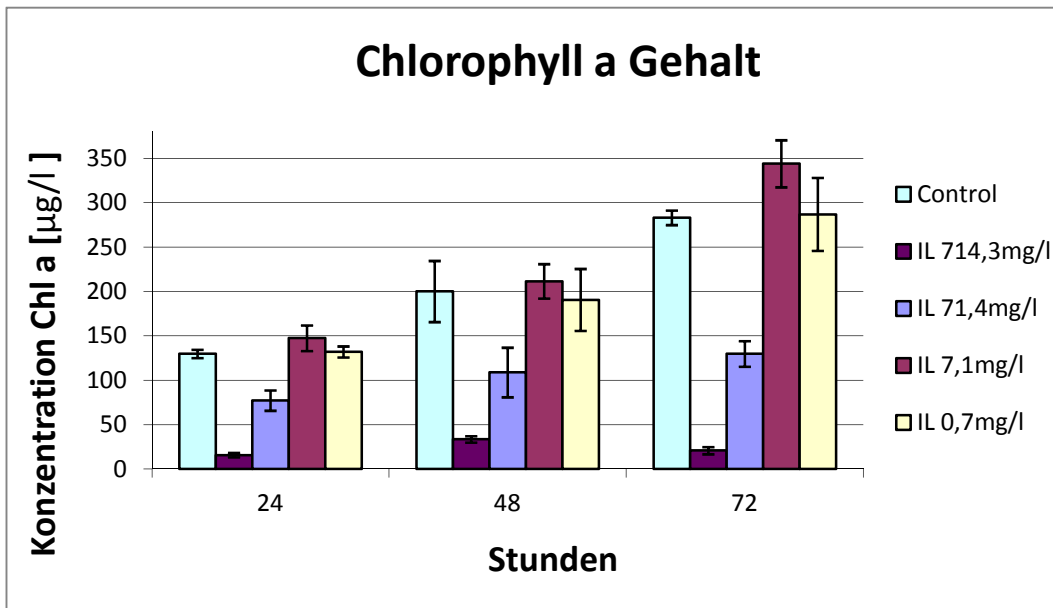


Abb. 17: Ergebnisse der Chlorophyll a Bestimmung für *Selenastrum capricornutum* bei den mit THIOU inkubierten Proben.

5.2.2 Toxizitätsresultate für THIOU bei *Scenedesmus acuminatus*

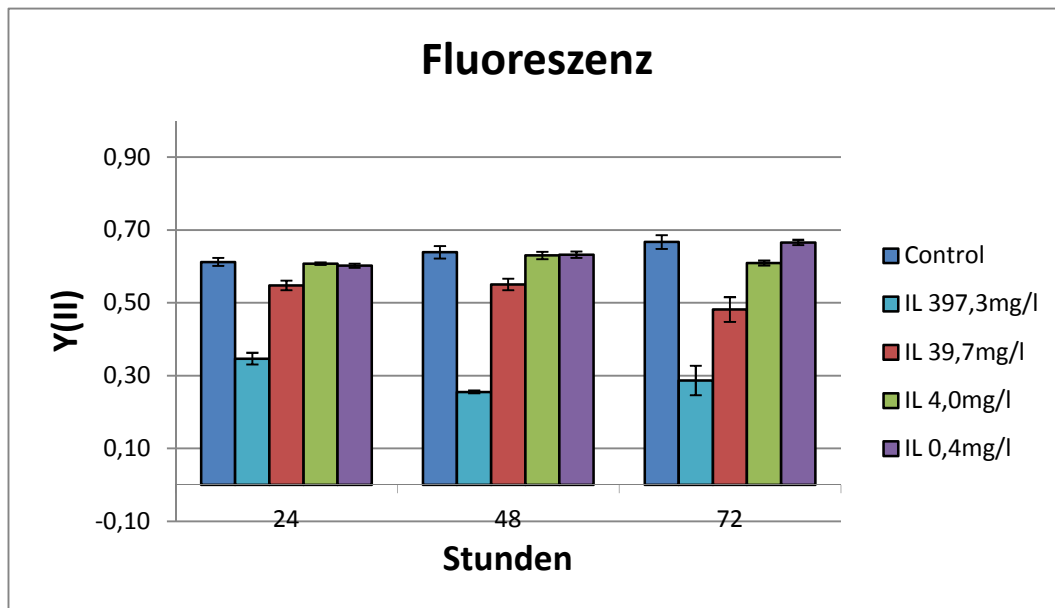


Abb. 18: Ergebnisse der Fluoreszenzratenbestimmung für *Scenedesmus acuminatus* bei den mit THIOU inkubierten Proben.

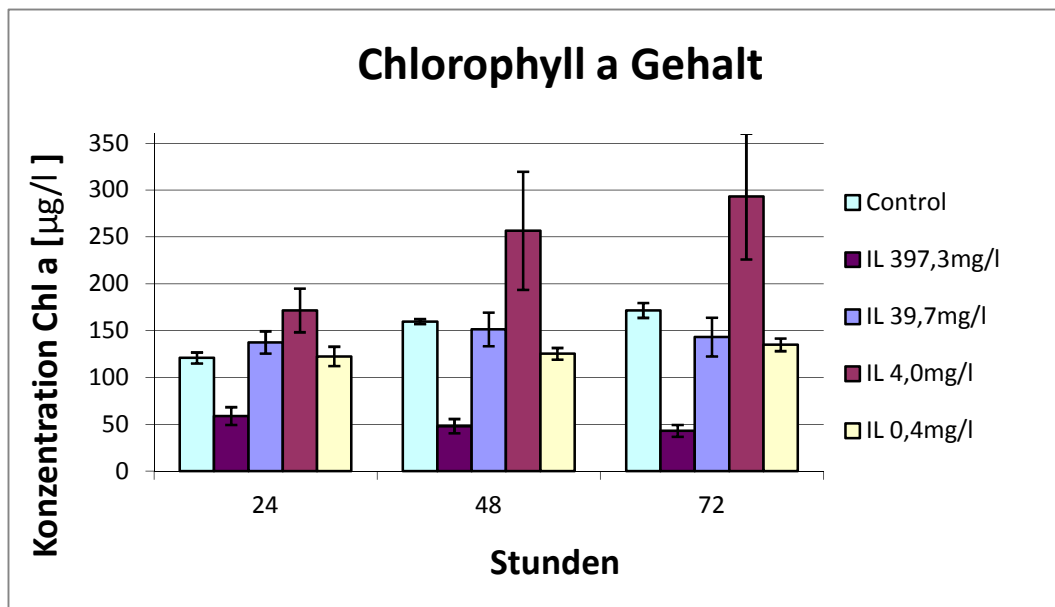


Abb. 19: Ergebnisse der Chlorophyll a Bestimmung für *Scenedesmus acuminatus* bei den mit THIOU inkubierten Proben.

S. capricornutum Ergebnisse (Abb. 16 und 17):

Bei den Kontrollen betrug das Chl a (abgekürzt für Chlorophyll a) nach 24h im Mittel 129,8µg/l und nach 72h 283,1µg/l. Die Fluoreszenzrate ist in demselben Zeitraum von 0,58 auf 0,63 angestiegen.

Bei einer Konzentration von 714,3mg/l THIOU in den Proben kam es zum Absterben der meisten Algen, erkennbar am Abfall des Chl a Gehalts auf 20,9µg/l. Die Fluoreszenzrate, die nach 72h bei 0,26 lag (Kontrolle im Vergleich über 0,63), deutet ebenfalls auf ein schlechtes Gedeihen hin. Allerdings gab es im Zeitraum zwischen 24 und 48h einen Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzrate mit einem Maximalwert von 0,36, der von einem geringen, kurzfristigen Anstieg des Chl a auf 33,6µg/l begleitet wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass in diesem Zeitraum eine kurzfristige Adaption der Algen stattgefunden hat. Auffällig sind außerdem die vergleichsweise großen Varianzen bei den Fluoreszenzraten, die zwischen 0,08-0,13 lagen.

IL-Konzentrationen von 71,4mg/l in den Proben wirkte sich ebenfalls eindeutig negativ auf *S.capricornutum* aus, das Wachstum war langsamer und die Photosyntheseaktivität geringer als in den Kontrollen. Die Chl a Werte zeigten während des Versuchs nur eine geringe Steigerung (77,3µg/l nach 24h, 129,8µg/l nach 72h). Bei der Fluoreszenzrate gab es einen Anstieg von 0,44 auf 0,53.

Bei einer Konzentration von 7,1mg/l THIOU in den Proben war ein deutlich schnelleres Wachstum im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen. Die Chl a Gehalte sind während des Versuchs von anfänglichen 147,68µg/l im Mittel auf 343,9µg/l angestiegen. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate betrug anfänglich 0,58 und nach 72h 0,65.

Die Anwesenheit von 0,7mg/l THIOU in den Proben schien keinen wesentlichen Einfluss auf das Algenwachstum und die Photosyntheserate auszuüben. Die Chl a Gehalte betrugen nach 24h 132,1µg/l und nach 72h 286,9µg/l. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate betrug anfänglich 0,59 und nach 72h 0,62.

S. acuminatus Ergebnisse (Abb. 18 und 19):

Die Werte bei den Kontrollen betrugen für das Chl a nach 24h 121,0µg/l und nach 72h 171,6µg/l. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate ist in demselben Zeitraum von 0,61 auf 0,67 angestiegen.

Auch bei *Scenedesmus* ist bei einer hohen Konzentration von 397,3mg/l IL in den Proben eine deutliche Stagnation des Algenwachstums festzustellen, sowie eine annähernd gleichbleibende Fluoreszenzaktivität. Der Chl a Gehalt rangierte zwischen 58,9µg/l und 43,1µg/l. Die Fluoreszenzrate betrug nach 24h 0,35 und nach 72h 0,29. Anders als bei *Selenastrum* konnte im Zeitraum zwischen 24 und 48h kein vorübergehender Anstieg der Algenzahlen beobachtet werden.

Bei der Konzentration von 39,7mg/l IL in den Proben war eine deutliche Wachstumsstagnation festzustellen (Chl a nach 24h 137,4µg/l, nach 72h 143,1µg/l). Die durchschnittliche Fluoreszenzrate ist im Verlauf des Versuchs um 13% gesunken, von 0,55 auf 0,48.

Bei einer Konzentration von 4mg/l IL in den Proben fand aber eine überaus deutliche Wachstumssteigerung statt mit Chl a Gehalten von 171,6µg/l nach 24h und 293,2µg/l nach 72h, was einer um 170% größeren Endkonzentration an Algen entspricht. Die Fluoreszenzraten waren etwas niedriger als bei den Kontrollen mit 0,61 nach 24h und 0,61 nach 72h.

Interessanterweise wirkte sich eine Konzentration von 0,4mg/l IL in den Proben jedoch negativ auf das Wachstum aus. Chl a Gehalte lagen nach 24h bei 122,6µg/l und nach 72h 134,9µg/l. Die Fluoreszenzraten entsprachen etwa jenen der Kontrollen (zwischen 0,60 und 0,67).

Sowohl bei *Selenastrum* als auch bei *Scenedesmus* führte die Anwesenheit geringer Konzentrationen von THIOU (7mg/l bzw. 4mg/l) in den Proben zu einem deutlich schnelleren Wachstum als bei den Kontrollen.

Einige Algenspezies sind dafür bekannt, Stickstoff aus organischen Molekülen aufzunehmen und für sich nutzen zu können. In einem Experiment (Berman und Chava, 1999) wurden verschiedene im Phytoplankton vorkommende

Spezies darauf getestet, wie sie sich verhalten, wenn der Stickstoff des Nährmediums ausschließlich in organischen Molekülen gebunden vorliegt. Die Substanzen, die auf diese Weise getestet wurden, waren Harnstoff, Hypoxanthin, Guanin, Ornithin, Glucosamin und Lysin. Es zeigte sich, dass die Spezies *Pediastrum duplex* (Grünalge), *Cyclotella* (Diatomee) und *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobakterium) in Kulturen mit organischem Stickstoff ebenso gut gedeihen können wie in den Kontrollen mit Ammonium und Nitrat. *Cyclotella* erreichte in den Testkulturen mit Ornithin oder Lysin sogar höhere Zellzahlen als in den Kontrollen. (Berman und Chava, 1999)

In einer anderen Publikation wurde untersucht, ob der DON (gelöster organischer Stickstoff) von Abwasserproben, aus denen jeglicher anorganischer Stickstoff entfernt wurde, für *S. capricornutum* bioverfügbar ist. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass der DON aus den Proben nicht für *Selenastrum* verfügbar ist. Wenn jedoch Bakterien mit der Alge vergesellschaftet leben, war innerhalb von 2 Wochen ein Abfall des DON-Gehalts um 50% festzustellen. (Pehlivanoglu und Sedlak, 2004)

Es ist wohlbekannt, dass hohe Konzentrationen von Stickstoff in Gewässern Algenblüten begünstigen können (Redfield, 1958). Üblicherweise liegen Phosphor und Stickstoff in zu geringen Konzentrationen vor, als dass ein maximales Algenwachstum möglich wäre. Das Einbringen von zusätzlichem Stickstoff oder Phosphor kann daher das Algenwachstum beschleunigen (Paerl et al., 2001).

Das vermehrte Wachstum von *Selenastrum* und *Scenedesmus* bei Konzentrationen von 7mg/l bzw. 4mg/l ist also möglicherweise durch die zusätzliche Aufnahme des in der IL gebundenen Stickstoffs zu erklären. Sollte dies zutreffen, erscheint es außerdem wahrscheinlich, dass zumindest bei den *Selenastrum*-Proben die mit vergesellschafteten Bakterien dafür verantwortlich waren, die IL in eine für die Alge verfügbare Form umzuwandeln. Um sicherzustellen, ob diese Hypothese zutrifft, wären jedoch noch umfangreiche Studien zu den Stoffwechselwegen der IL in den Algen erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erst wenige Informationen darüber vorliegen, wie stickstoffhaltige-ILs in Ökosystemen metabolisiert werden. Wie in

dieser Arbeit gezeigt wurde, können stickstoffhaltige ILs sich jedoch nicht nur toxisch auf Grünalgen auswirken, sondern auch wachstumsfördernd.

5.2.3 Toxizität von [4MOPYR][NfO] auf *Selenastrum capricornutum*

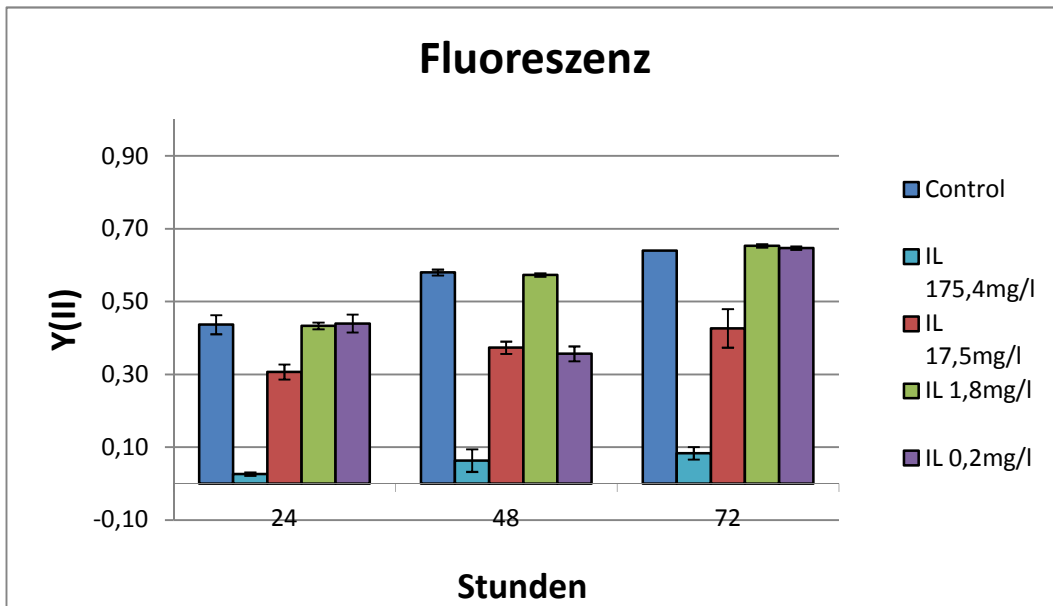


Abb. 20: Ergebnisse der Fluoreszenzratenbestimmung für *Selenastrum capricornutum* bei den mit [4MOPYR][NfO] inkubierten Proben.

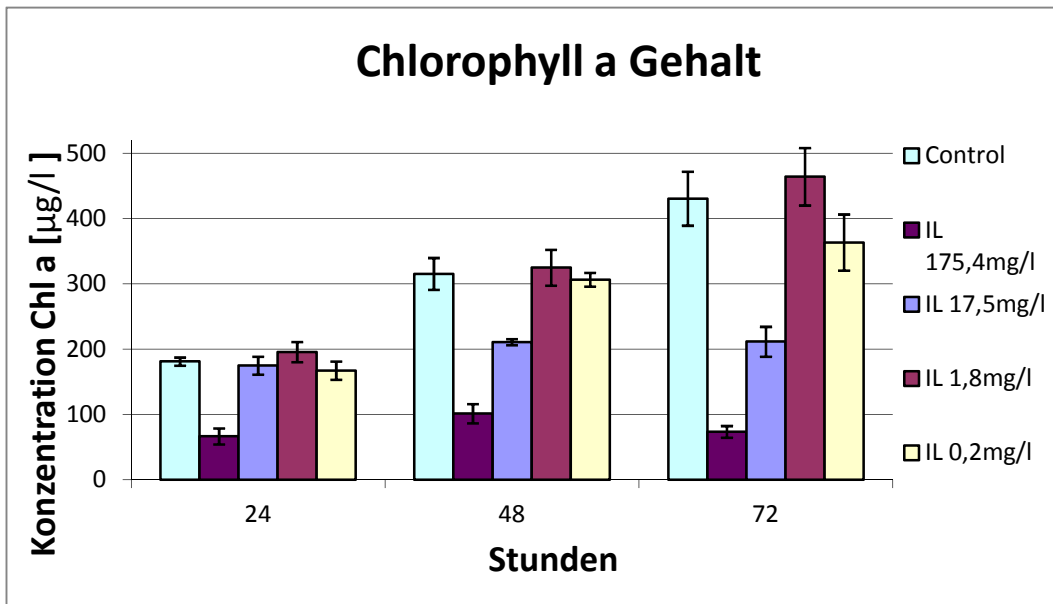


Abb. 21: Ergebnisse der Chlorophyll a Bestimmung für *Selenastrum capricornutum* bei den mit [4MOPYR][NfO] inkubierten Proben.

5.2.4 Toxizität von [4MOPYR][NfO] auf *Scenedesmus acuminatus*

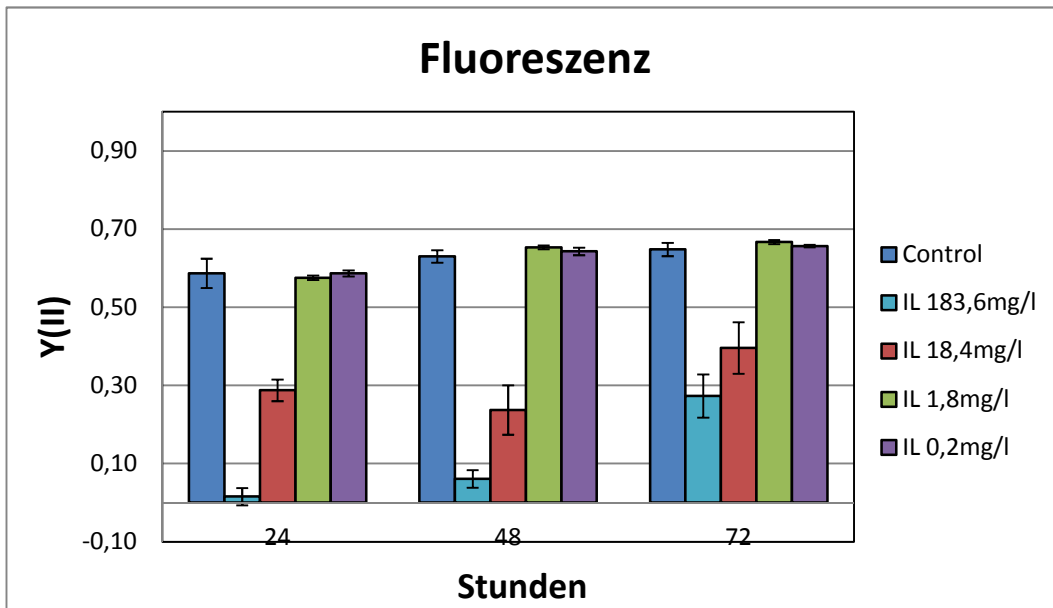


Abb. 22: Ergebnisse der Fluoreszenzratenbestimmung für *Scenedesmus acuminatus* bei den mit [4MOPYR][NfO] inkubierten Proben.

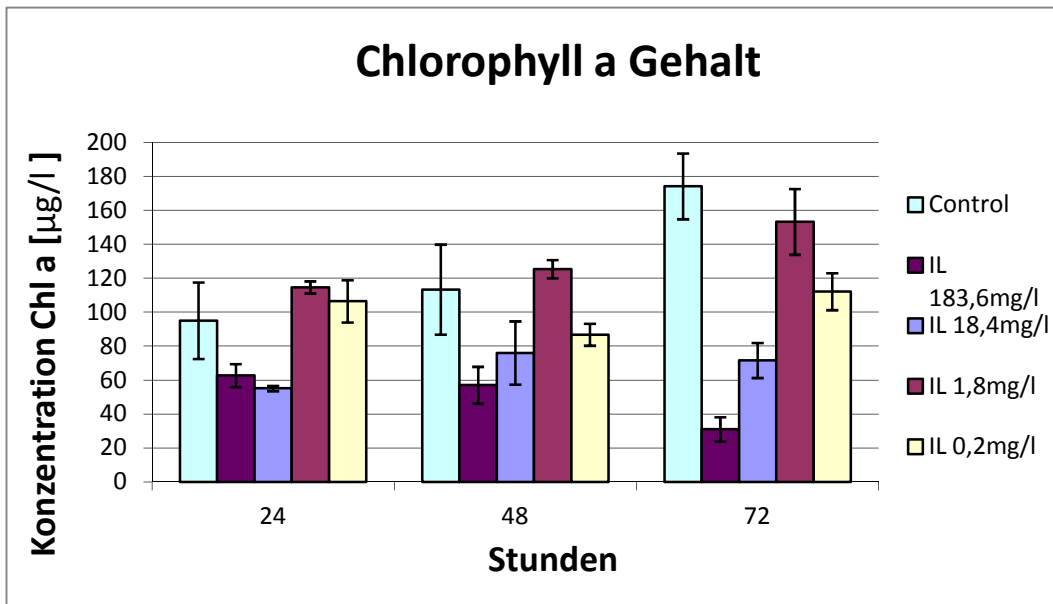


Abb. 23: Ergebnisse der Chlorophyll a Bestimmung für *Scenedesmus acuminatus* bei den mit [4MOPYR][NfO] inkubierten Proben.

Selenastrum Ergebnisse (Abb. 20 und 21):

Bei den Kontrollen konnte ein rasanter Anstieg des Chl a Gehalts festgestellt werden, von ursprünglichen 181,1µg/l auf 430,7µg/l. Bei der durchschnittlichen Fluoreszenzrate gab es einen Anstieg von 0,44 auf 0,64.

Eine Konzentration von 175,4mg/l [4MOPYR][NfO] in den Proben führte zu einem Absterben der meisten Selenastrum-Zellen. Nach 24h betrug der Chl a Gehalt 66,5µg/l, nach 72h 73,5µg/l. Zwischen Tag 1 und Tag 2 kam es zu einem leichten Anstieg des Chl a Gehalts auf 101,3µg/l. Bei der durchschnittlichen Fluoreszenzrate war ein leichter Anstieg zu beobachten, von 0,03 auf 0,08.

Bei einer Konzentration von 17,5mg/l IL in den Proben war der Chl a Gehalt nach 24h 174,8µg/l und damit ähnlich groß wie bei den Kontrollen (181,1µg/l). Innerhalb der folgenden Tage kam es jedoch zu einer deutlichen Retention des Wachstums. Am letzten Versuchstag lag der Chl a Gehalt bei 211,5µg/l und war damit um 51% niedriger als bei den Kontrollen. Bei der durchschnittlichen Fluoreszenzrate war ein Anstieg von 0,31 auf 0,43 festzustellen, was auf eine Anpassung der Algen an die Anwesenheit der IL hindeutet, da wieder vermehrt Photosynthese stattfand.

Konzentrationen von 1,8mg/l IL in den Proben schienen eine leichte Wachstumssteigerung im Vergleich zu den Kontrollen herbeizuführen, mit einer Konzentration von Chl a nach 24h von 195,7µg/l und einer Endkonzentration von 464,2µg/l. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate ist innerhalb des Versuchs von 0,43 auf 0,65 angestiegen. Wenn man jedoch die Varianzen zwischen den einzelnen Proben in Betracht zieht, kann keine definitive Aussage über einen wachstumssteigernden Effekt von [4MOPYR][NfO] getroffen werden.

Bei einer IL-Konzentration von 0,2mg/l in den Proben lag die Endkonzentration des Chl a mit 363,5µg/l unter jener der Kontrolle mit 430,7µg/l. Die Fluoreszenzrate zeigte einen ähnlichen Anstieg von 0,44 auf 0,65. Bei dieser Konzentration überwiegen die negativen Effekte auf die Algen also jegliche möglichen positiven Effekte.

Scenedesmus Ergebnisse (Abb. 22 und 23):

Bei den Kontrollen stieg der Chl a Gehalt während des Experiments von 95,0µg/l nach 24h auf 174,2µg/l nach 72h. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate ist im selben Zeitraum von 0,59 auf 0,65 angestiegen.

Eine Konzentration von 183,6mg/l [4MOPYR][NfO] in den Proben führte zu einem Abfall des Chl a Gehalts von 62,7µg/l nach 24h bis unter 31,0µg/l, was bedeutet, dass bis zum zweiten Versuchstag die meisten Algen in den Proben abgestorben sind und sich die Restpopulation nicht mehr davon erholen konnte. Die durchschnittliche Fluoreszenzrate jedoch zeigte einen Anstieg von 0,02 auf 0,27. Jene Algen, welche bis zum Ende des Versuchs überlebt haben, waren also offenbar imstande, sich an die Bedingungen anzupassen und vermehrt Photosynthese zu betreiben.

Konzentrationen von 18,4mg/l der IL in den Proben führte zu einer Retention des Wachstums. Der Chl a Gehalt betrug nach 24h nur 55,1µg/l und am Ende des Versuchs 71,6µg/l. Die Fluoreszenzrate zeigte einen Anstieg von 0,29 auf 0,40. Auffällig ist, dass die Varianz bei den Fluoreszenzraten größer war als bei den übrigen Proben. Dies war für die Proben mit 17,5mg/l [4MOPYR][NfO] auch schon für *Selenastrum* der Fall.

Die Proben mit 1,8mg/l [4MOPYR][NfO] enthielten nach 24h den größten Chl a Gehalt aller Proben, nämlich 114,6µg/l. Am Ende des Versuchs war die Chl a Konzentration mit 153,3µg/l jedoch etwas kleiner als jene der Kontrollen (174,2µg/l). Die Fluoreszenzraten zeigten einen Anstieg von 0,58 nach 24h auf 0,67 nach 72h.

Konzentrationen von 0,2mg/l IL in den Proben führten zu einer deutlichen Wachstumsstagnation. Nach 24h betrug die Chl a Konzentration 106,4µg/l und nach 72h 112,1µg/l. Dies entspricht der Erhöhung der Algenkonzentration um 1%. Es erscheint paradox, dass 0,2mg/l IL einen stärker ausgeprägten negativen Effekt zeigen als 1,8mg/l, allerdings ist es denkbar, dass sich bei dieser Konzentration eventuelle positive Effekte weniger stark bemerkbar machen. Die Fluoreszenzrate ist im Laufe des Versuchs von 0,59 nach 24h auf 0,66 nach 72h angestiegen.

Im Gegensatz zu THIOU führte die Anwesenheit von [4MOPYR][NfO] während keines der Versuche zu einem eindeutigen schnelleren Wachstum der Algen.

Bei IL-Konzentrationen ab 18mg/l kam es zur Stagnation der Algenzahlen mit eingehender starker Verminderung der Photosynthesaktivität. Demzufolge muss der NOEC bei beiden Spezies bei einer höheren Konzentration liegen.

Auffallend ist allerdings, dass es bei der Konzentration von 1,8mg/l IL in den Proben beider Algenspezies zu einer geringeren Wachstumsbeeinträchtigung kam als bei IL-Konzentrationen von 0,2mg/l. Dies bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der IL-Konzentration und dem Algenwachstum zu bestehen scheint.

6 Literaturverzeichnis

- Appenroth K., 2010. Soil Heavy Metals. *Springer* 19, pp.19–30. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-02436-8>
- Baker N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual review of plant biology*, 59, pp.89–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444897>
- Berman T., Chava S., 1999. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *Journal of Plankton Research*, 21(8), pp.1423–1437
- Boening D.W., 2000. Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, pp.1335-1351
- Bolto B. A., Pawlowski L., 1987. Wastewater treatment by ion-exchange. *E. and F. N. SPON New York*, 262
- Boney A.D., 1971. Sub-lethal effects of mercury on marine algae. *Marine Pollution Bulletin* 2(5): pp.69-71
- Bradl H., Kim C., Kramar U., Stüben D., 2005. Heavy Metals in the Environment. *Elsevier Ltd*. Chapter 2: Interactions of Heavy Metals
- Brown B.T., Rattigan B.M., 1970. Toxicity of soluble copper and other metal ions to *Elodea canadensis*. *Environmental Pollution*, 20(4), pp.303-314
- Consalvey M., Perkins R.G., Paterson D.M., Underwood G.J.C, 2005. PAM FLUORESCENCE : A BEGINNERS GUIDE FOR BENTHIC DIATOMISTS. *Diatom Research*, 20(1), pp.1-22
- Das P., Samantaray S., Rout G.R., 1998. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98, pp.29-36
- Dave G., Xiu R., 1991. Toxicity of Mercury, Copper, Nickel, Lead, and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, pp.126-134
- Davis J.H., 2004. Task-Specific Ionic Liquids. *Chemistry Letters*, 33(9), pp.1072-1077
- Earle, M.J., Esperança, J.M.S.S., Gilea, M.A., Canongia Lopes, J.N., Rebelo, L.P.N., Magee, J.W., Seddon, K.R., Widegren, J.A., 2005. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 439, pp.831-834

- Encyclopedia Britannica Online, 2013.
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/526885/Scenedesmus>
- Fent K., 2007. Ökotoxikologie. *Georg Thieme Verlag*
- Fischer L., 2011. Entwicklung von Multielement- und Spezierungsmethoden für die Untersuchung von Fließgewässern und Abwasser
- Gotsis-Skretas O., 1991. Effects of mercury on cell population, chlorophyll a and rates of photosynthesis and excretion of *Dunaliella minuta* lerche. *Toxicological & Environmental Chemistry* 33(3-4), pp.261-275
- Grimm, B., Porra R.J., Rüdiger W., Scheer H., 2006. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. *Springer*, ISBN: 978-1-4020-4515-8
- Guibal E., Campos Gavilan K., Bunio P., Vincent T., Trochimczuk A., 2008. CYPHOS IL 101 (Tetradecyl(Trihexyl)Phosphonium Chloride) Immobilized in Biopolymer Capsules for Hg (II) Recovery from HCl Solutions. *Separation Science and Technology*, 43, pp.2406–2433
- Hall J.A., Golding L.A., 1998. Freshwater algae (*Selenastrum capricornutum*) Chronic Toxicity Test Protocol. *NIWA report for the Ministry of Environment, Wellington, New Zealand*
- Ignatyev N., Welz-Biermann U., Bissky G., Willner H., Kucheryna A., 2012. United States Patent Application Publication US20120316058
- ISO 8692, 2012. Water quality - Fresh water algae growth inhibition test with unicellular green algae
- Jeon C., Höll W.H., 2003. Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal. *Water Research*, 37, pp.4770-4780
- Kean T., Thanou M., 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), pp.3–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800377>
- Kogelnig D., Regelsberger A., Stojanovic A., 2011. A polymer inclusion membrane based on the ionic liquid trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride and PVC for solid–liquid extraction of Zn(II) from hydrochloric acid solution. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 142(8), pp.769–772. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00706-011-0530-6>
- Latała A., Nedzi A., Stepnowski P., 2009. Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina* (green algae) and *Cyclotella meneghiniana*, *Skeletonema marinoi* (diatoms). *Green Chemistry*, 11(4), pp.580-588

- Laus G., Bentivoglio G., Schottenberger H., Kahlenberg V., Kopacka H., Röder T., Sixta H., 2005. IONIC LIQUIDS : CURRENT DEVELOPMENTS , POTENTIAL AND DRAWBACKS FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS. *Lenzinger Berichte*, 84, pp.71–85
- Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta A., 2003. A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), pp.1149–1158. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708503001559>
- Lewinsky, A.A., 2007. Hazardous Materials And Wastewater: Treatment, Removal And Analysis. *Nova Publishers*
- Lo J.M., Wail C.M., 1975. Mercury Loss from Water during Storage : Mechanisms and Prevention. *Analytical Chemistry*, 47(11), pp.1869–1870
- Lorenzen C.J., 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *American Society of Limnology and Oceanography*, 12(2), pp.343-346.
- Lund J.W.G., Kipling C., Cren E.D., 1958. The Inverted Microscope Method of Estimating Algal Numbers and the Statistical Basis of Estimations by Counting. *Hydrobiologia*, pp.143–170
- McGeer J., Henningsen G., Lanno R., Fisher N., Sappington K., Drexler J., 2004. ISSUE PAPER ON THE BIOAVAILABILITY AND BIOACCUMULATION OF METALS. *U.S Environmental Protection Agency*
- Morgenbesser C., Stojanovic A., Kogelnig D., Fischer L., Hann S., Krachler R., Keppler B.K., 2009. Urea- and thiourea-functionalized hydrophobic ionic liquids for silver and platinum extraction from aqueous solutions
- Otto M., 2000. Analytische Chemie. *Wiley-VCH*
- Papaiconomou N., Salminen J., Lee J-M., Prausnitz J.M., 2007. Physico-chemical properties of hydrophobic ionic liquids containing 1-octylpyridinium , 1-octyl-2- methylpyridinium or 1-octyl-4-methylpyridinium cations. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52(3), 833-840
- Papaiconomou N., Salminen J., Lee J-M., Prausnitz J.M., von Stosch M., 2008. Selective Extraction of Copper, Mercury, Silver, and Palladium Ions from Water Using Hydrophobic Ionic Liquids. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 47(15), pp.5080–5086
- Paerl H.W., Fulton R.S., Moisander P.H., Dyble J., 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *TheScientificWorld*, 1, pp.76–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805693>

- Pehlivanoglu E., Sedlak D.L., 2004. Bioavailability of wastewater-derived organic nitrogen to the alga *Selenastrum Capricornutum*. *Water research*, 38(14-15), pp.3189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15276734>
- Pretti C., Chiappe C., Pieraccini D., Gregori M., Abramo F., Monni G., & Intorre L., 2006. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chemistry*, 8(3), 238240. doi:10.1039/b511554j
- Ravi Kumar M.N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), pp.1–27. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514800000389>
- Redfield A.C., 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46(3), pp.205–221. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/27827150>
- Richtlinie 2000/76/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, 2000. Über die Verbrennung von Abfällen
- Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, 2001. Zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik
- Scammells P.J., Scott J.L., Singer R.D., 2005. Ionic Liquids: The Neglected Issues. *Australian Journal of Chemistry*, 58, pp.155-169
- Shao G., Kautz R., Peng S., Cui G., Giese R. W. 2007. Calibration by NMR for quantitative analysis: p-toluenesulfonic acid as a reference substance. *Journal of chromatography. A*, 1138(1-2), 305–308. doi:10.1016/j.chroma.2006.10.010
- Srncik M., Kogelnig D., Stojanovic A., Körner W., Krachler R., Wallner G. 2009. Uranium extraction from aqueous solutions by ionic liquids. *Applied radiation and isotopes*, 67(12), 2146–2149. doi:10.1016/j
- Starr R.C., Zeikus J.A., 1993. UTEX - the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, 29 (suppl. s2): 1-106
- Stauber J.L., Florence T.M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology*, 94, pp.511-519
- Stolte S., Matzke M., Arning J., Bösch A., Pitner W.-R., Welz-Biermann U., Jastorff B., Ranke J., 2007. Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chemistry*, 9(11), 1170-1179. doi:10.1039/b711119c
- Stojanovic A., Morgenbesser C., Galanski M., Kogelnig D., Roller A., Krachler R., Keppler B.K., 2010. Synthesis and crystal structure of N-phenyl-N'-(pyridin-2-ylmethyl)-S-methyl-thiuronium iodide. *Journal of Molecular*

- Structure*, 965(1-3), pp.50–55. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286009007376>
- Stojanovic A., Kogelnig D., Fischer L., Hann S., Galanski M., Groessl M., Krachler R., Keppler B.K. 2010. Phosphonium and Ammonium Ionic Liquids with Aromatic Anions: Synthesis, Properties, and Platinum Extraction. *Australian Journal of Chemistry*, 63(3), 511-524.
 doi:10.1071/CH09340
- Taccardi, N., Niedermaier, I., Maier, F., Steinrück, H-P., Wasserscheid, P., 2002. Cyclic Thiouronium Ionic Liquids: Physicochemical Properties and their Electronic Structure Probed by X-Ray Induced Photoelectron Spectroscopy. *Chemistry-A European Journal*, 18(27)
- Visser A.E., Swatloski R.P., Reichert W.M., Mayton R., Sheff S., Wierzbicki A., Davis J.H., Rogers R.D., 2002. Task-specific ionic liquids incorporating novel cations for the coordination and extraction of Hg²⁺ and Cd²⁺: synthesis, characterization, and extraction studies. *Environmental science & technology*, 36(11), pp.2523–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075816>.
- Vollhardt, P.C., Schore N.E., 2005. Organische Chemie. Verlag Wiley-VCH
- Wasserscheid P., Welton T., 2002. *Ionic Liquids in Synthesis* Weinheim. Wiley-VCH Verlag
- WHO, 1989. Environmental Health Criteria 86: Mercury - Environmental Aspects
- Wisely B., Blick RAP, 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **18**, pp.63–72.
- Woodworth J., Pascoe D., 1982. Cadmium toxicity to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: a study of eggs and alevins. *Journal of Fish Biology* 21(1), pp. 47-57
- Zhang Y., Kogelnig D., Morgenbesser C., Stojanovic A., Jirsa F., Lichtscheidl-Schultz I., Krachler R., Li Y., Keppler B.K., 2011. Preparation and characterization of immobilized [A336][MTBA] in PVA-alginate gel beads as novel solid-phase extractants for an efficient recovery of Hg (II) from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*, 196, pp.201–209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21974850>

7 Abkürzungsverzeichnis

[4MOPYR][NfO]: 1-octyl-4-methylpyridinium Nonafluorbutylsulfonat

[A336][Met]: Tricaprylmethylammonium Methionat

[A336][MTBA]: Tricaprylmethylammonium 2-(Methylthio)benzoat

[A336][TS]: Tricaprylmethylammonium Thiosalicylat

Chl a: Chlorophyll a

CYPHOS IL 101: Tetradecyl(trihexyl)phosphonium chloride

DON: dissolved organic nitrogen = gelöster organischer Stickstoff

EC₅₀: mittlere effektive Konzentration

F-AAS: Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie

FIMS: flow injection mercury system = Fließinjektion Quecksilbermessgerät

F_m: maximale Fluoreszenz

F₀: Fluoreszenz im Grundzustand

F_v: Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz und der Fluoreszenz im Grundzustand

IL: Ionic Liquid bzw. Ionische Flüssigkeit

ICP-SFMS: induktiv gekoppeltes Plasma Sektorfeld Massenspektrometrie

KD-AAS: Kaltdampf-Atom-Absorptionsspektroskopie

LC₅₀: mittlere letale Konzentration

LPME: Liquid Phase Micro Extraction = Flüssigphasen Mikroextraktion

NOEC: No observed effect concentration = Konzentration, ab der ein Effekt beobachtet werden kann

[PR₄][MTBA]: Trihexyltetradecylphosphonium 2-(Methylthio)benzoate

[PR₄][TS]: Trihexyltetradecylphosphonium Thiosalicylat

PSII: Photosystem II

PVA: Polyvinylalkohol

PVC: Polyvinylchlorid

PyrChi: Mit Pyridinium-IL funktionalisiertes Chitosan

THIOU: *N*-phenyl-*N'*-(pyridin-2-ylmethyl)-*S*-methylthiuronium iodide

TOC: Total organic carbon = gelöster organischer Kohlenstoff

TOMATS: trioctylmethyllammonium thiosalicylat

TSIL: task specific ionic liquid = für bestimmten Zweck maßgeschneiderte
Ionische Flüssigkeit

Y(II): Fluoreszenzrate

8 Anhang

Lebenslauf

1992-1996	Volksschule (Keplerplatz 7, 1100 Wien)
1996-2004	Realgymnasium (Laaerbergstraße 25-29, 1100 Wien)
2004	Matura mit gutem Erfolg
ab Oktober 2004	Studium der Chemie an der Universität Wien
Sommer 2005	Praktikum bei Oktapharma
Sommer 2006	Praktikum am Institut für Anorganische Chemie/Materialchemie der Universität Wien
Sommer 2008	Aufenthalt in den USA
Sommer 2007	Bürotätigkeit
Sommer 2009	Praktikum am Institut für Anorganische Chemie/Bioanorganik der Universität Wien
Sommer 2010 bis heute	Geringfügige Tätigkeit bei Manpower Hospitality
April 2012 bis jetzt	Masterarbeit am Institut für Anorganische Chemie/Umweltchemie der Universität Wien

Pam-Fluoreszenz Geräteeinstellungen

Measuring Light: 5

MF-L: 200

MF-H: 20000

Actinic Light Intensity: 20

Actinic Light Widths: 0

Colour: Red

PS I Light Intensity: 4

PS I Light Widths: 5

Colour: Far Red

Saturation Pulse/MT Intensity: 10

Saturation Pulse/MT Sp-Width: 5

Saturation Pulse/MT Duration:100ms

Slow Induction Delays: 40

Slow Induction Clocks: 20

Slow Induction Widths: 310

Gain: 1

Damping: 1