

---

**Schlussbericht  
zum Forschungsvorhaben**

**„Metabolitenbildung beim Einsatz von Ozon“**

**(Kurzfassung)**

**AZ IV-7-042 600 001J**

**Vergabenummer 08/058.1**

**Elimination von Arzneimitteln und organischen  
Spurenstoffen: Entwicklung von Konzeptionen und  
innovativen, kostengünstigen Reinigungsverfahren**

**gerichtet an das**

**Ministerium für Klimaschutz, Umwelt,  
Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz  
des Landes Nordrhein-Westfalen**



Für die Arbeitsgemeinschaft:

Mülheim, den 10.10.2011

IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für  
Wasserforschung gemeinnützige GmbH

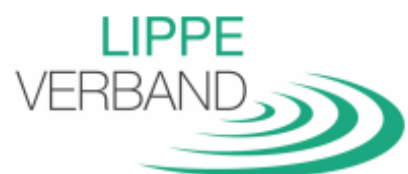
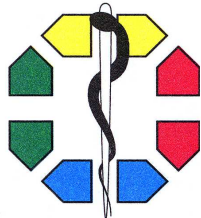
ppa.

K.-D. Neumann

Dr.-Ing. W. Merkel

Prof. Dr. T. C. Schmidt

## Projektpartner



## Autorenteam (Langfassung)

Autor(in)	bearbeitete(s) Kapitel inkl. der entsprechenden Anhänge
Prof. Dr. Torsten C. Schmidt	1
Dr. Friedrich Werres	3.5.2
Dr. Peter Balsaa	3.5.2
Dipl.-Ing. Sebastian Kowal	1 / 2.1 / 2.4 / 3.3 / 3.7.4 / 4.2.2 / 4.4.4
Holger Lutze M.Sc.	2.5 / 3.6 / 4.3
PD Dr. Kai Bester	2.3 / 4.4.1
Niklas Janzen M.Sc.	3.4.1 / 3.7.1
Mauro Tavian M.Sc.	2.3 / 3.4.2 / 4.4.1
Prof. Dr. Horst Fr. Schröder	2.6 / 3.7.3 / 4.4.3
Dr. Wilhelm Gebhardt	3.7.3 / 4.4.3
Dr. Jochen Türk	2.4 / 2.6 / 4.7
Andrea Börgers M.Sc.	2.4 / 3.5.1 / 4.2.1
Marco Zedda M.Sc.	2.6 / 3.7.2 / 4.4.2
Christoph Portner M.Sc.	4.4.2
Prof. Dr. Elke Dopp	2.7 / 4.5.1
Jessica Richard M.Sc	3.8.1 / 3.8.2
Dr. Monika Kasper-Sonnenberg	2.7 / 4.5.2 / 4.6.1
Dipl. Biol. David Wutschke	3.8.3 / 3.8.4 / 4.5.2
Dr. Monika Hammers-Wirtz	2.8 / 3.9.1 / 3.9.2 / 4.6.1 / 4.6.2
Dipl. Biol. Axel Magdeburg	2.8 / 3.9.3 / 4.6.3
Dr. Daniel Stalter	3.9.3 / 4.6.2
Dr.-Ing. Heinrich Herbst	3.1 / 3.2 / 3.3
Dipl.-Ing. Sven Lyko	3.3

## Inhaltsverzeichnis

Autorenteam der Langfassung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
Verzeichnis der Abkürzungen und der Symbole .....	IV
1 Einleitung .....	1
2 Projektverlauf .....	3
2.1 Untersuchungen auf den kommunalen Kläranlagen .....	3
2.2 Anreicherung und Fraktionierung (Probenvorbereitung) .....	4
2.3 Bildungspotenzial bekannter Problemstoffe aus der Ozonung .....	4
2.4 Leitparameter zur Charakterisierung der Abwasserozonung .....	5
2.5 Massenspektrometrisches Screening, Strukturaufklärung und semiquantitative Bestimmung von Transformationsprodukten.....	6
2.6 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen .....	7
2.7 <i>In-vivo</i> -Untersuchungen .....	8
3 Ergebnisse der Untersuchungen .....	10
4 Ausblick auf die zweite Projektphase.....	21
5 Literaturverzeichnis .....	22

## Verzeichnis der Abkürzungen und der Symbole

Abkürzung	Erläuterung	Einheit
AOP	Advanced Oxidation Processes (Erweiterte Oxidationsverfahren)	
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.	
CID	Collisionally Induced Dissociation (Kollisions-induzierter Dissoziation)	
DOC	Gelöster Organischer Kohlenstoff	[mg/L]
EI	Elektronenstossionisierung	
EN	Europäische Norm	
ESI	Elektrosprayionisierung	
GC	Gaschromatographie	
G-Wert	Giftigkeitswert	
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)	
MS	Massenspektrometrie	
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis	
n	Nummerische Anzahl	
NR	Neutral Rot	
pK <sub>s</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante	
Q-Steuerung	Volumensteuerung	
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	
ToF	Time of flight mass spectrometer (Flugzeitmassenspektrometer)	
SAK	Spektraler Absorptions-Koeffizient	m <sup>-1</sup>
SF	Sandfilter	
S/N	Signal to noise ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)	
SPE	Solid-Phase-Extraction (Festphasenextraktion)	
SRB	Sulforhodamin B	
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid - Natriumsalz	
Z <sub>Spezifisch</sub>	Quotient der eingesetzten Ozonkonzentration zu DOC-Konzentration	

## 1 Einleitung

Die Nutzung von Ozon als Oxidationsmittel für die Elimination von anthropogenen organischen Spurenstoffen in der Abwasserbehandlung ist ein neuer Ansatz, um den Eintrag solcher Stoffe in Oberflächengewässer zu vermindern und die Gewässergüte zu erhöhen. Die Oxidation führt bei ökonomisch sinnvollen Betriebsbedingungen einer Ozonungsstufe in der Regel nicht zu einer vollständigen Mineralisierung der organischen Stoffe, sondern zu teiloxidierten Substanzen. Ob und in welchem Maße solche Transformationsprodukte unter bestimmten Betriebsbedingungen gebildet werden – und wenn ja, welche dieser Stoffe ein ökotoxikologisches oder humantoxikologisches Potenzial besitzen –, wurde bisher nur wenig untersucht. Für die Bewertung der Ozonung in der großtechnischen Abwasserbehandlung sind solche Kenntnisse jedoch unverzichtbar.

Im Rahmen dieses gemeinschaftlichen Forschungsvorhabens (Einzelauftrag Nr.10 „Metabolitenbildung beim Einsatz von Ozon“, Laufzeit von Juli 2010 bis August 2011) wird daher auf großtechnischen kommunalen Abwasserreinigungsanlagen, die eine unterschiedliche Herkunft des Abwassers aufweisen, die Bildung und die ökotoxikologische Bewertung gebildeter Transformationsprodukte untersucht. Alle Untersuchungen werden im Praxisbetrieb durchgeführt. Die Ozonungsstufe wird hierbei in den konventionellen Prozess der kommunalen Abwasserbehandlung integriert. Weitergehende toxikologische Untersuchungen umfassen ein breites Spektrum an *In-vitro*- und *In-vivo*-Tests mit direkten und aufkonzentrierten Abwasserproben sowie in Durchflusssystemen. Für die Analytik kommen dabei wegen ihrer Selektivität und Sensitivität vor allem gas- (GC) oder flüssigchromatografische (LC) Trennverfahren in Kombination mit massenspektrometrischen Detektionstechniken zur Erkennung, Identifizierung, Strukturcharakterisierung und semiquantitativen Bestimmung von Transformationsprodukten in toxikologisch auffällig gewordenen Fraktionen zum Einsatz. Daneben wird auch die Bildung toxischer Oxidationsnebenprodukte aus unproblematischen Vorläufersubstanzen anhand der Leitparameter Bromat und Nitrosamine untersucht. Eine schematische Übersicht des gesamten Projektaufbaus ist in der Abbildung 1-1 dargestellt und wird ausführlicher im Abschnitt 2 erläutert. Aus den genannten Untersuchungen sollen in einer zweiten Projektphase geeignete Betriebsbedingungen für die Ozonungsstufe abgeleitet werden. Innerhalb des Projektes hat sich die Zusammenarbeit mit anderen Teilprojekten im Auftrag des MKULNV bislang als sehr konstruktiv und gewinnbringend erwiesen. Hier konnten Synergien bei der Bearbeitung und bei wichtigen Fragestellungen sowie der Interpretation von Ergebnissen genutzt werden.

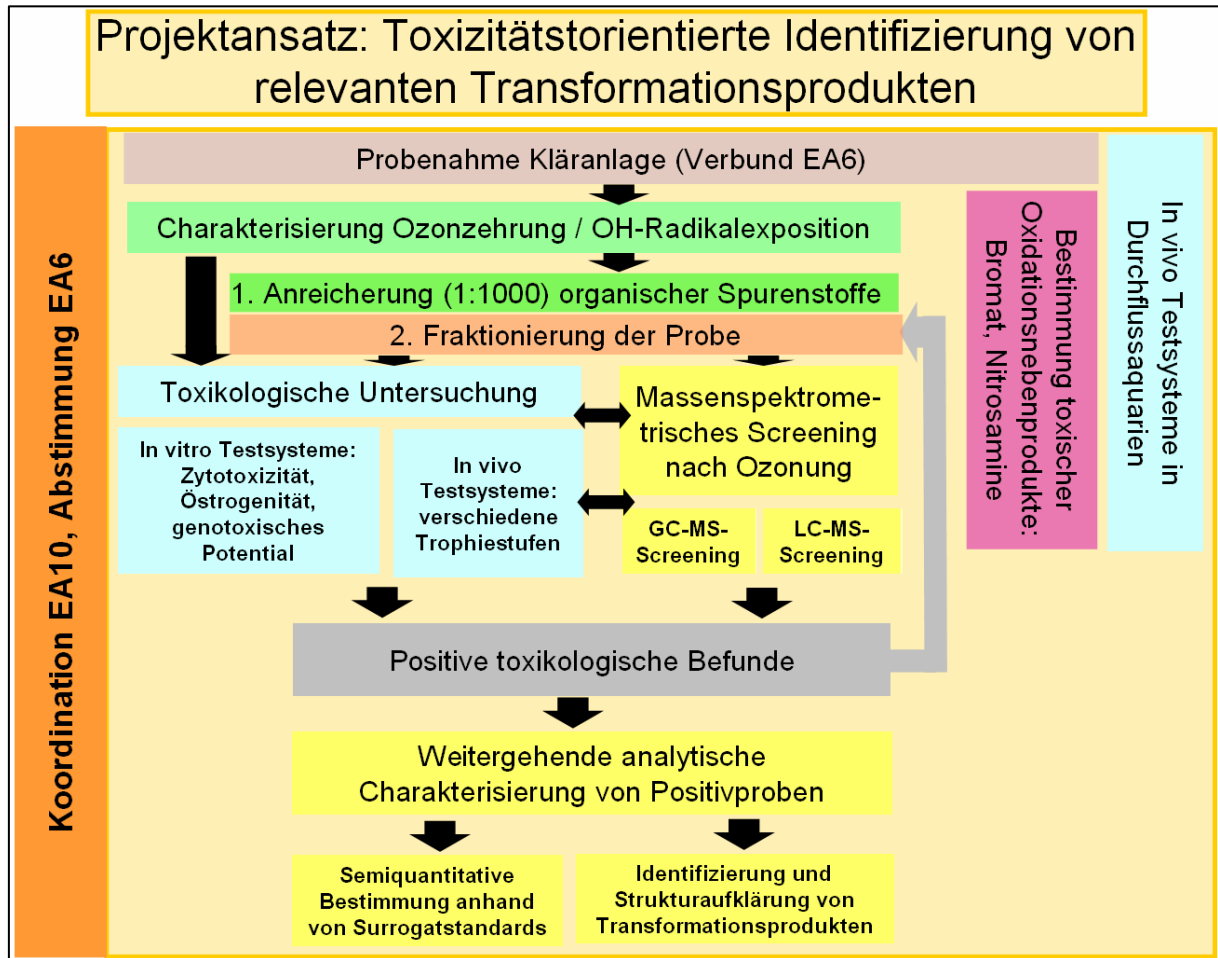


Abbildung 1-1: Schematischer Projektaufbau

## 2 Projektverlauf

### 2.1 Untersuchungen auf den kommunalen Kläranlagen

Die Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Bad Sassendorf wurde dem gesamten toxikologischen und massenspektrometrischen Untersuchungsspektrum unterzogen. Im Vorfeld wurden die verwendeten Betriebszustände der Ozonanlage in Bad Sassendorf im Rahmen des Einzelauftrags MKULNV-EA6 definiert und eingestellt. Daraus resultierende Untersuchungen umfassten zwei unterschiedliche Ozondosierungen von 2 und 5 mg/L Ozon im Abwasser bei jeweils einer mengenproportionalen Ozondosierung und bei einer Dosierung über den SAK-Wert. Diese Ozoneintragstrategien wurden in Bad Sassendorf miteinander hinsichtlich ihrer Effektivität beim Spurenstoffabbau verglichen. Parallel dazu wurden ab der 5 mg/L Ozon Einstellung die Untersuchungen in Durchflusssaquarien über einen Zeitraum von sechs Wochen direkt auf der Anlage durchgeführt. Die Betriebsparameter der Ozonung können der Tabelle 2-1 entnommen werden.

Tabelle 2-1: Betriebszustände der Ozonanlage in Bad Sassendorf

Probeentnahme- datum	Verwendete Einstellung	Abwasser- zulauf	Applizierte Ozon-Dosis [mg/L O <sub>3</sub> ]	Z <sub>Spezifisch</sub> [mgO <sub>3</sub> /mg DOC]
19. - 20. 10. 2010	2 mg O <sub>3</sub> /L Q-Regelung	> 400 m <sup>3</sup> /h	1,89	0,34
02. - 03. 11. 2010	2 mg O <sub>3</sub> /L, SAK-Regelung	≤ 400 m <sup>3</sup> /h	2,42	0,38
17. - 18. 11. 2010	5 mg O <sub>3</sub> /L, Q-Regelung	≤ 400 m <sup>3</sup> /h	4,01	0,91
22. – 23. 11. 2010	5 mg O <sub>3</sub> /L, SAK-Regelung	≤ 400 m <sup>3</sup> /h	4,89	1,02
07. – 08. 02. 2011	2 mg O <sub>3</sub> /L, Q-Regelung	≤ 400 m <sup>3</sup> /h	1,78	0,35

Die Probenahme wurde als mengenproportionale 24h-Mischprobe von 8.00 – 8.00 Uhr des nachfolgenden Tages durchgeführt und umfasste jeweils ein Volumen von insgesamt 60 L. Beprobte wurde der Zu- und Ablauf der Ozonanlage. Die Probenahme für die Durchflusssaquarien wurde kontinuierlich am Zu- und Ablauf der Ozonanlage durchgeführt. Seit Ende Mai 2011 läuft der Probebetrieb der Ozonanlage auf der Kläranlagen Duisburg-Vierlinden und seit Juli in Schwerte. Auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden wurde deshalb im Juli 2011 mit den toxikologischen Untersuchungen begonnen, während auf der Kläranlage Schwerte vorerst die systematischen Laboruntersuchungen zur Ozonzehrung und Hydroxylradikalbildung durchgeführt werden, um die Betriebsparameter zu untersuchen und optimieren. Die Ergebnisse der momentan laufenden Untersuchungen (Juli bis Ende August) bis zum Ablauf der ersten Phase werden vollständig in der zweiten Projektphase ausgewertet.



## 2.2 Anreicherung und Fraktionierung (Probenvorbereitung)

Eine Extraktion der Abwässer zur Anreicherung organischer Spurenstoffe wurde durchgeführt, um die Empfindlichkeit einiger effektbasierter Untersuchungen aber auch des massenspektrometrischen GC- und LC-MS-Screening sowie der späteren Substanz-Charakterisierung zu steigern. Zusätzlich werden mit der Extraktion der organischen Stoffe ggf. störende Substanzen (Phosphat, Nitrat, Ammonium) abgetrennt und somit Matrixeffekte minimiert.

Die Fraktionierung der Extrakte wird bei positiven toxikologischen Befunden für die Gesamtprobe durchgeführt, um die entsprechende Substanz in einem iterativen Verfahren zu isolieren und dann eindeutig charakterisieren zu können. Hierzu werden Rückstellproben der Rohextrakte zuerst mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC) nach ihrer Elutionsreihenfolge auf einer RP-Phase in 10 Fraktionen aufgeteilt (fraktioniert). Diese Fraktionen wurden dann einzeln erneut toxikologisch untersucht und bei weiterhin positiven toxikologischen Befunden wiederholt in 10 Sub-Fractionen getrennt. Die finalen Sub-Fractionen werden, wie die vorgeschalteten toxikologisch positiv getesteten Fraktionen, der massenspektrometrischen Charakterisierung zugeführt.

## 2.3 Bildungspotenzial bekannter Problemstoffe aus der Ozonung

Bromat ist ein potenzielles Kanzerogen und wird bei der Ozonung bromidhaltiger Wässer gebildet [1]. Im ersten Schritt wird Bromid durch Ozon zu hypobromiger Säure (HOBr) oxidiert. HOBr ( $pK_s$ -Wert 8,8 - 9) dissoziiert bei abwasserüblichen pH-Werten nur in geringem Maße zum Hypobromit-Anion, das anschließend unter Beteiligung von Ozon und OH-Radikalen über Bromit zu Bromat oxidiert werden kann [2]. Der Trinkwassergrenzwert für Bromat beträgt 10 µg/L [3]. Bromide sind Salze der Bromwasserstoffsäure. Einige, wie zum Beispiel Kaliumbromid und Magnesiumbromid, sind natürlichen Ursprungs. Andere Bromide werden von der Industrie hergestellt und verwendet. So findet z. B. Lithiumbromid Verwendung in Lithiumbatterien. Viele dieser Salze sind wasserlöslich und gelangen so in den Wasserkreislauf.

Die Nitrosamine umfassen eine Stoffklasse mit dem charakteristischen Strukturelement  $R_2N-NO$  und können in aliphatischer oder cyclischer Form vorkommen. Für diese Stoffklasse wurde eindeutig eine krebserzeugende Wirkung nachgewiesen [4]. Die relevanten Vertreter sind in Abbildung 2-1 dargestellt und dienten bei den Untersuchungen der ozonierten Kläranlagenabwässer als Leitsubstanzen. Der Eintrag von Nitrosaminen in die aquatische Umwelt ist hauptsächlich anthropogen und stammt sowohl aus kommunalen als auch aus industriellen Abwässern [5-6]. Die häufigsten in der aquatischen Umwelt gefundenen Vertreter sind N-Nitrosodimethylamin (NDMA) und N-Nitrosomorpholin (NMOR) [5]. Die Nitrosamine sind überwiegend polar und verfügen deshalb über eine geringe

Sorptionsfähigkeit in Böden; dadurch können sie in den Grundwasserleiter gelangen und werden beim Einsatz von adsorptiven Trinkwasseraufbereitungsprozessen nicht effektiv entfernt. Hinzu kommt, dass bei Einsatz von Ozon in einer oxidativen Abwasserbehandlung oder Trinkwasseraufbereitung, aber auch in der Trinkwasserdesinfektion, NDMA als einfachster Vertreter dieser Stoffgruppe aus Vorläufersubstanzen gebildet werden kann [5-7]. Vor diesem Hintergrund sind Bromat und die Nitrosamine besonders wichtige Stoffgruppen, die innerhalb dieses Projektes untersucht werden.

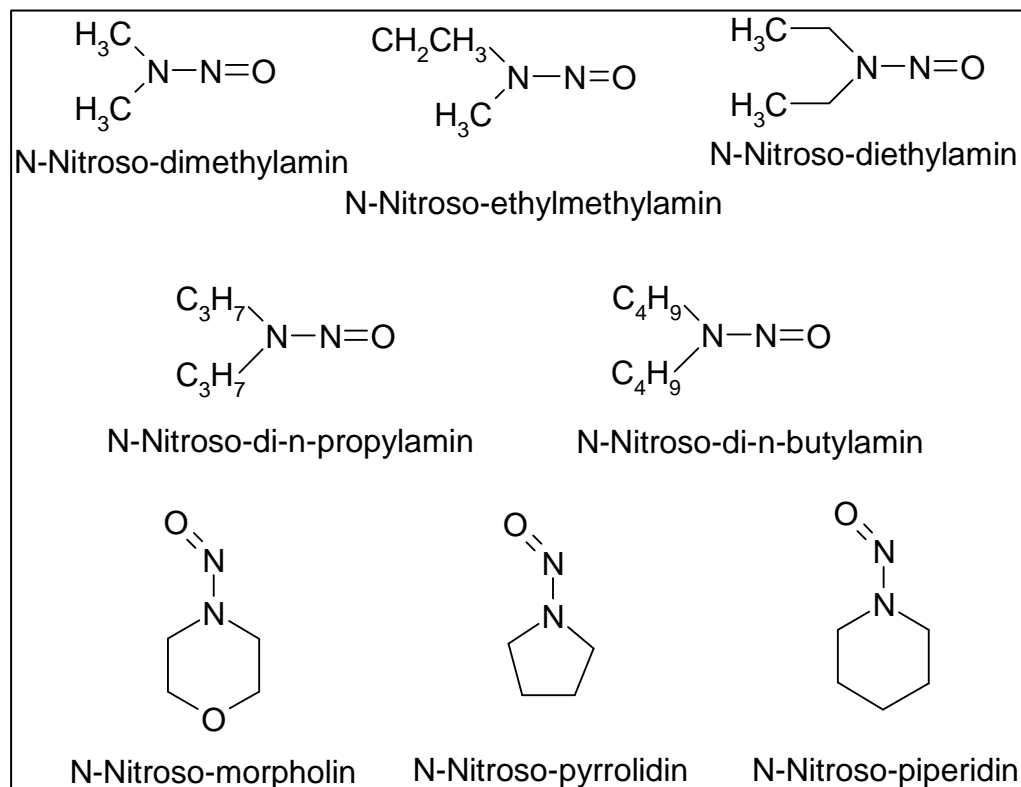


Abbildung 2-1 : Strukturformeln von relevanten Nitrosaminen

## 2.4 Leitparameter zur Charakterisierung der Abwasserozonung

Beim Abbau des Ozons kann es zur Bildung von Hydroxylradikalen kommen [15-18], die unselektiv und sehr schnell mit einer Vielzahl von antropogenen Verbindungen reagieren können. Prozesse, die auf Hydroxylradikalreaktionen beruhen, werden Advanced Oxidation Processes (AOP) genannt [16]. Da der größte Teil der Hydroxylradikale mit der Abwassermatrix abreagiert, führt ein AOP ähnlich wie die Ozonung selbst kaum zu einer vollständigen Mineralisierung der Spurenstoffe, sondern primär zur Bildung von Transformationsprodukten. Im Idealfall führt die Veränderung der Molekülstruktur eines Schadstoffes durch Ozon und/oder Hydroxylradikale zu einer Reduktion seiner negativen Eigenschaft, wie Geruch oder Toxizität [16, 17]. Beispielsweise wird die östrogene Wirkung eines Stoffes durch Ozon effektiv verringert [19]. Vor allem die Rolle des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) hinsichtlich Zehrung des Ozons, Bildung und Abfang von

OH-Radikalen ist kaum vorhersehbar. Daher sind einfache Laborversuche nützliche Instrumente zur schnellen Charakterisierung der Abwasserozonung hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit. Die gewonnenen Daten zur Ozonzehrung und Hydroxylradikalbildung sind hilfreich, um die Betriebsparameter einer großtechnischen Abwasseranlage z. B. hinsichtlich der Ozondosierung und hydraulischer Verweilzeit zu optimieren.

## **2.5 Massenspektrometrisches Screening, Strukturaufklärung und semiquantitative Bestimmung von Transformationsprodukten**

Die massenspektrometrischen Screenings der Abwasserextrakte werden sowohl auf unpolare GC-gängige Substanzen als auch auf polare LC-gängige Substanzen parallel zu den toxikologischen Untersuchungen des Probenmaterials auf das Vorkommen bekannter und unbekannter Transformationsprodukte hin analysiert. Bei dem Bestimmungsverfahren der GC-MS-Analyse werden Substanzen gaschromatographisch getrennt und anschließend werden die entsprechenden Moleküle mittels Elektronenstossionisierung (EI) ionisiert und fragmentiert und massenspektrometrisch detektiert. Die erhaltenen Massenspektren werden mit Hilfe von Spektrenbibliotheken abgeglichen und interpretiert. Zudem werden Transformationsprodukte bei diesem Screening gezielt gesucht, die aus Vorgängerprojekten in Laborversuchen bereits bekannt sind.

Die polaren Komponenten werden für das LC-MS-Screening mittels RP-HPLC flüssigkeitschromatographisch getrennt, massenspektrometrisch mit einem Hybridmassenspektrometer (Q-TRAP) detektiert und charakterisiert. Hierbei wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) des Vorläuferions mittels der Elektrospray ionisierten (ESI) Komponente bestimmt. Parallel wird das Vorläufer-Ion der Komponente mittels stoßinduzierter Dissoziation CID (Collisionally Induced Dissociation) fragmentiert und die erzeugten Produkt-Ionen dieser Substanz aufgenommen. Bei den Untersuchungen in AP 4 wird sowohl auf die im Rahmen des IGF-Forschungsvorhabens „Oxidationsnebenprodukte“ entwickelten, kombinierten Mess-Methodiken, als auch für die Auswertung auf die dort erstellte Datenbank von Massenspektren für viele Ausgangsstoffe und deren mögliche bekannte Transformationsprodukte zurückgegriffen.

Die Inhaltsstoffe der durch Fraktionierung gewonnenen Proben mit positiven Toxizitätsbefunden werden zur weitergehenden Strukturaufklärung mittels hochauflösender Massen- und multipler Tandemmassenspektrometrie (LC-(HR)MS- und -(HR)MS<sup>n</sup>-Analysen ( $n \geq 2$ )) in einem LTQ-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer des ISA analog der bei [8-14] beschriebenen Vorgehensweise untersucht. Hierzu werden zunächst aus den Zielverbindungen unter Bedingungen der Hochauflösung Fragment-Ionen erzeugt, was mittels Hybrid-MS (LTQ-Orbitrap) geschieht. Die aufgenommenen massenspektrometrischen Daten sowohl der zu identifizierenden Ausgangsverbindung als auch deren stufenweise

mittels  $MS^n$  ( $n \geq 2$ ) erzeugten Fragment-Ionen ( $MS^2$ ,  $MS^3$ ....) liegen mit exakter Masse vor. Aus dem aufgenommenen Molekülion der Ausgangsverbindung und den ebenso mit exakter Masse registrierten  $MS^n$ -Produkt-Ionen lassen sich Summenformeln mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit kalkulieren. Daraus wiederum lassen sich Rückschlüsse auf die Elementzusammensetzung der Ausgangsverbindung und ihrer Fragmente ziehen, so dass sich daraus letztendlich mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl deren Summenformel als auch ihre Struktur ermitteln lässt. Dem hier generell verfolgten Ansatz der „Toxizitätsorientierten Identifizierung“ entsprechend soll sodann entsprechend die Aufklärung möglichst aller als toxikologisch relevant erkannter Transformationsprodukte mittels hochauflösender Massenspektrometrie erfolgen. Durch Kombination dieser verschiedenen konsekutiv angewandten massenspektrometrischen Untersuchungsschritte verbessert sich die Wahrscheinlichkeit der Strukturaufklärung und somit der Identifikation der Zielsubstanzen. Für diese Transformationsprodukte, falls toxikologisch auffällig, können am IWW anhand der Molekülmasse und des Massenspektrums die entsprechenden Quantifizierungsmethoden für die Direktmessung im Abwasser im unteren Spurenbereich erarbeitet werden. Sofern die Stoffe nicht durch Synthese erzeugt und ihre strukturelle Übereinstimmung mit den Transformationsprodukten durch entsprechende Untersuchungen abgesichert wurden, müssen für die semiquantitativen Bestimmungen der Transformationsprodukte Surrogatstandards im Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) Modus verwendet werden. Falls diese Quantifizierungsansätze aufgrund von fehlenden Standardsubstanzen nicht möglich sind, erfolgt eine qualitative Beurteilung von Transformationsproduktbildung und/oder -abbau.

## 2.6 *In-vitro*-Untersuchungen

Die Untersuchungen haben zum Ziel, toxikologisch relevante Endpunkte im Hinblick auf eine mögliche akute Exposition der beim Einsatz von Ozon gebildeten Transformationsprodukte auf den Menschen zu untersuchen, zusammenzustellen und toxikologisch zu bewerten. *In-vitro*-Methoden werden zum einen für die Ermittlung der allgemeinen Toxizität (Zytotoxizität) und der Östrogenität (ER Calux) der getesteten Abwasserproben, zum anderen für die Bestimmung genotoxischer Wirkungen auf der prokaryotischen (bakterieller Mutagenitätstest) und eukaryotischen Ebene (Comet-Assay in Zellkultur mit humanen Hepatozyten) verwendet.

Zum Zytotoxizitätsnachweis werden sowohl der MTT- als auch der MultiTox-Test verwendet. Der MTT-Test basiert auf der Umwandlung von Tetrazoliumsalzen durch Oxidoreduktasen innerhalb der Mitochondrien und der Peroxisomen in ein unlösliches blaues Produkt, das photometrisch bestimmt und quantifiziert werden kann. Zellschädigende Substanzen können diese Reaktion hemmen. Dieser Test wird durchgeführt, bevor die Proben auf eine mögliche Östrogenität untersucht werden, um falsch negative Ergebnisse durch eine verringerte

Vitalität der Brustkrebszellen ausschließen zu können. Der MultiTox-Test ist eine Kombination aus vier verschiedenen Zytotoxizitätstests (LDH, XTT, NR und SRB) und liefert somit ein breites Spektrum an Informationen über eine eventuelle zelluläre Schädigung. Es können Störungen der Membranintegrität (LDH), der mitochondrialen Aktivität (XTT), der Lysosomenaktivität (NR) und der Proteinsynthese (SRB) nachgewiesen werden. Der ER Calux dient dem Nachweis östrogenen Aktivität von Substanzen im Wasser. Hierfür wird eine Brustkrebszelllinie verwendet, die mit Luziferase-Genen so modifiziert ist, dass lumineszierende Signale bei Auftreten von hormonwirksamen Substanzen photometrisch detektiert werden können. Mit dem Ames-Test und Comet-Assay können die Abwasserproben auf Genotoxizität hin überprüft werden. Der Ames-Test ist ein standardisiertes Versuchsverfahren zur genotoxikologischen Bewertung von Abwasserproben nach DIN 38415-4 [20]. Aktuelle Studien belegen sowohl seine Eignung zur Untersuchung ozonbehandelter Abwasserproben [21] als auch zur Bestimmung des genotoxischen Potenzials von Desinfektionsnebenprodukten wie NDMA [22]. Der Comet-Assay ist ein empfindliches Verfahren zum Nachweis von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA sowie alkali-labiler Stellen [25]. In einer aktuellen Studie wurde die Induktion von DNA-Schäden im Comet-Assay durch Abwasserproben eines Krankenhauses bei verschiedenen Abwasserbehandlungsmaßnahmen gezeigt [23].

## 2.7 *In-vivo*-Untersuchungen

Ökotoxikologische Testverfahren sind in der Lage, Mischungstoxizitäten integrierend zu messen, da die Testsysteme auf alle im Gemisch vorliegenden Substanzen reagieren. Eine Vorhersage der Mischungstoxizität eines komplexen Abwassergemisches ist anhand von analytischen Messungen von Leitsubstanzen meist nicht möglich. Die Erfassung der Mischungstoxizität ist für die Risikobewertung jedoch entscheidend, da verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, dass die Effekte von Stoffgemischen oft überraschend ausfallen können und aufgrund von additiven oder synergistischen Wirkungen Toxizitäten auftreten können, auch wenn die Konzentrationen der Einzelsubstanzen unterhalb der Wirkschwelle liegen [27, 28]. Daher ist gerade bei komplexen Abwasserproben eine Anwendung von biologischen Wirktests dringend notwendig. Hier kommen zum einen etablierte Standardtestverfahren zum Einsatz, zum anderen werden *in-situ*-Testverfahren angewendet, die den Vorteil haben, dass die Organismen dem unveränderten Abwasser in einem Durchflusssystem permanent ausgesetzt sind und alle darin enthaltenen Stoffe durch das Testsystem integrierend erfasst werden können. Die *In-vivo*-Tests innerhalb der ersten Projektphase wurden mit Abwasserproben der Kläranlage Bad Sassendorf mittels der folgenden Biotestverfahren untersucht: Algenwachstumshemmtest, Lemna-Wachstumshemmtest, akuter Daphnientest, Daphnien-Reproduktionstest und Fischeitertest. Der Algentest wurde zusätzlich zum Standardtestverfahren nach DIN in einem weiteren

Nährmedium untersucht, um Wachstumsförderungen in Abwasserproben zu minimieren. Dieses modifizierte, nährstoffreichere Medium hat sich in der ersten Projektphase bewährt. Aufgrund algentoxischer Effekte und verstärkter Effekte nach Ozonung wurde ein miniaturisiertes Testverfahren für den Algentest zur Untersuchung von Proben in Mikrotiterplatten etabliert.

In Durchflusssystemen wurden drei wirbellose Testorganismen eingesetzt. Es kamen ausschließlich Testverfahren zum Einsatz, die schon in vorangehenden Versuchen im Rahmen des EU-Projektes Neptune toxikologisch relevante Effekte infolge der Ozonung angezeigt hatten. Die Organismen wurden dem unveränderten Abwasser permanent ausgesetzt, um alle darin enthaltenen Stoffe durch das Testsystem integrierend erfassen zu können. Dabei wurde *Lumbriculus variegatus* und Zebrauschel *Dreissena polymorpha* eingesetzt, um die Toxizität nach der Ozonung im Vergleich zum Abwasser aus dem Nachklärbecken (also dem Zulauf zur Ozonungsstufe) zu untersuchen während der *Potamopyrgus antipodarum* Reproduktionstest eingesetzt wurde, um eine mögliche Veränderung der östrogenen Aktivität zu erkennen [31].

### 3 Ergebnisse der Untersuchungen

Bei den durchgeführten Versuchen aus Teilprojekt 6 und 10 auf der Kläranlage Bad Sassendorf mit einer Sollkonzentration von 2 mg Ozon pro Liter lag  $Z_{\text{spez}}$  zwischen 0,3 und 0,5 mg  $\text{O}_3/\text{mg DOC}$ . Bei diesen Einstellungen konnte keine erhöhte Bromatbildung beobachtet werden. Die Erhöhung der Ozondosis auf einen Sollwert von 5 mg Ozon pro Liter führte in den kalten Monaten November und Dezember (2010) zwar zu einer Erhöhung der Bromatkonzentration, jedoch lagen die Einzelwerte meist weiterhin unter dem für Trinkwasser vorgeschriebenem Grenzwert von 10  $\mu\text{g/L}$ . Lediglich im Mai 2011 wurde dieser Grenzwert bei einer Zugabe von 5 mg  $\text{O}_3/\text{L}$  überschritten, was mit üblicherweise im Mai erhöhten Außentemperaturen und einem hohen  $Z_{\text{spez}}$  erklärt werden kann. Eine Erhöhung der Ozonkonzentration auf einen Sollwert von 7 mg  $\text{O}_3/\text{L}$  führte zu einer deutlichen Zunahme des Bromats (Mittelwert 30  $\mu\text{g/L}$ ). Eine zusammenfassende Darstellung der Bromatwerte in Abhängigkeit zur Sollkonzentration ist in Abbildung 3-1 finden.

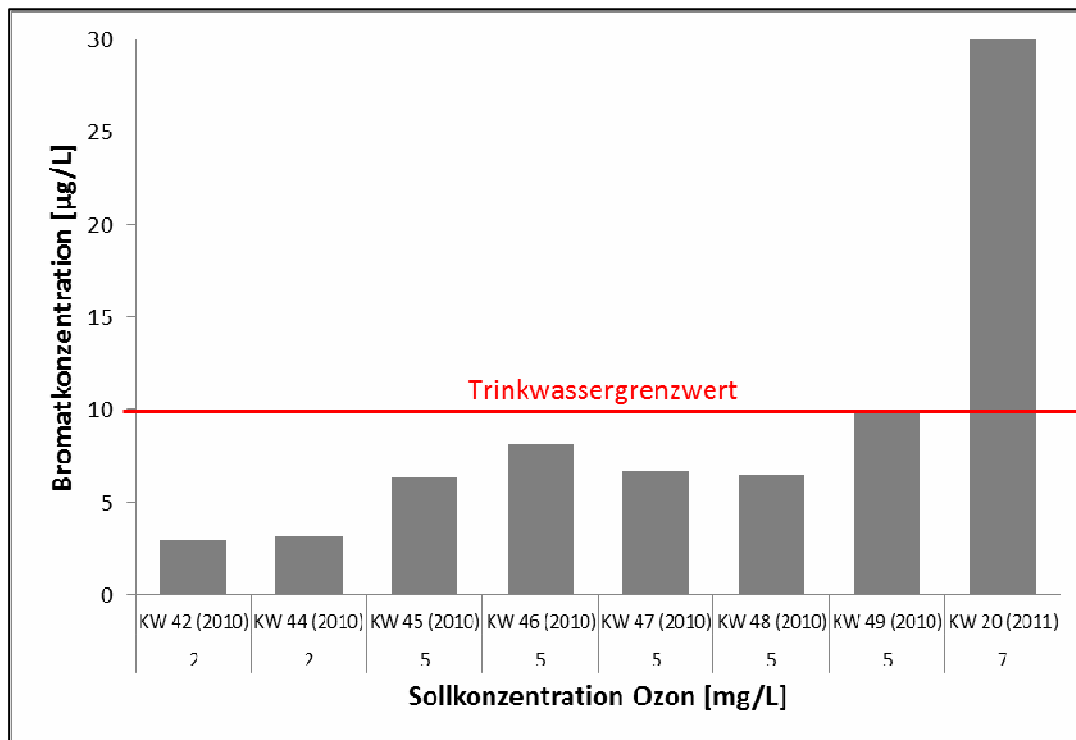


Abbildung 3-1: Zusammenfassende Darstellung der Bromat-Konzentrationen in Abhängigkeit der Ozondosis der Kläranlage Bad Sassendorf.

Die Untersuchungen der Ozonzehrung und Hydroxylradikal-Exposition haben ergeben, dass eine Ozondosierung von 2 mg/L zu einem unvollständigen Abbau ozonrefraktärer Stoffe führt, während bei einer Ozondosierung von 5 mg/L die ozonrefraktären Stoffe mit einer guten Reaktivität gegenüber Hydroxylradikalen in diesen Abwässern weitgehend abgebaut werden können. Für Stoffe mit einer geringeren Reaktivität, wie z. B. Atrazin oder MTBE, sind höhere Ozondosierungen von 7 – 10 mg/L Ozon notwendig, um eine gute Abbauleistung zu erreichen (Abbildung 3-2). Die Auswirkungen einer sinnvollen Erhöhung

der Ozondosierung auf die Kinetik des Spurenstoffabbaus und der Ozonzehrung auf die Leistungsfähigkeit des ozonbasierten Prozesses sollten im Rahmen von Laborversuchen weitergehend abgeschätzt werden.

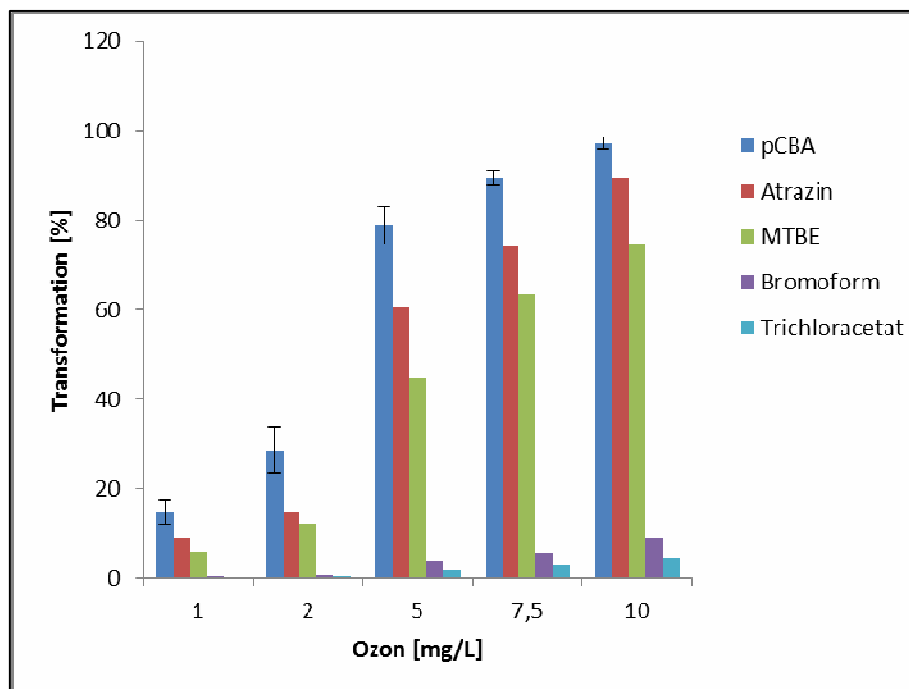


Abbildung 3-2: Transformation von 4-Chlorbenzoesäure bei verschiedenen Ozondosierungen und daraus abgeleiteter Abbau anderer Schadstoffe.

Die ersten orientierenden massenspektrometrischen GC- und LC-MS-Screening zeigen die Bildung von Transformationsprodukten an. Beim GC-MS-Screening konnten mehrere nach der Ozonung gebildete Transformationsprodukte detektiert und zwei davon durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen anhand von Retentionszeiten und spezifischen Massenfragmenten identifiziert werden. Beim LC-MS-Screening werden unter pattern-recognition Bedingungen der Totalionenstrom-Chromatogramme (TIC) des unbehandelten (Zulauf) und Ozon-behandelten Probenmaterials (Ablauf der Ozonung) deutliche Unterschiede hinsichtlich des Stoffspektrums neu detektierbarer Signale in den massenspektrometrischen Chromatogrammen (TICs) erkannt (Abbildung 3-3). Dies gilt einerseits sowohl zwischen Zu- und Ablauf der Ozonung sowie andererseits auch bei den verwendeten zwei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen. Bei allen Extrakten nach der Ozonung fiel eine Substanz mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 200 in den Messungen auf. Aufgrund von positiven toxikologischen Befunden in den Extrakten wurde diese Substanz einer weitergehenden massenspektrometrischen Charakterisierung und Identifizierung unterworfen. Ebenfalls wurde eine selektive und sensitive analytische LC-MS/MS-Methode entwickelt, um die Bildung des Transformationsproduktes beim Einsatz von Ozon im Abwasser direkt und ggf. den Abbau bei weitergehenden verfahrenstechnischen Reinigungsstufen zu untersuchen.



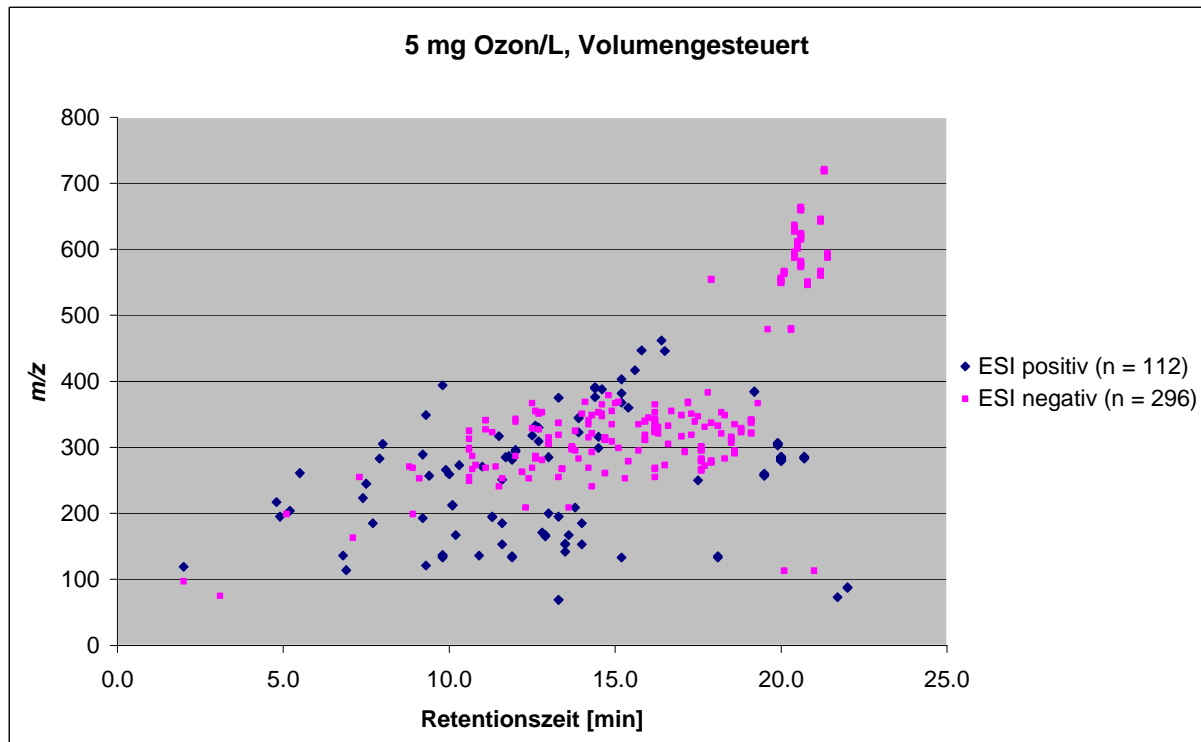


Abbildung 3-3: Darstellung der im positiven (n = 112) und negativen (n = 296) Ionisierungsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (vierte Versuchseinstellung, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert).

Die Charakterisierung des gebildeten Transformationsproduktes mit der Ionenmasse  $m/z$  200 hat gezeigt, dass es sich um eine Mischung aus zwei unterschiedlichen Komponenten handelt, die durch eine gezielt verbesserte chromatographische Trennung und hoch aufgelöste Massen- und multiple Tandemmassenspektrometrie detektiert werden konnten. Das aufgenommene Chromatogramm (TIC) und die Massenspektren sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Anhand der vorgeschlagenen Summenformeln und dem Fragmentierungsverhalten konnten den beiden Transformationsprodukten Strukturformeln, abgebildet in Tabelle 3-1 zugeordnet werden. Anhand dieser Untersuchungen konnte ein sensitives analytisches Verfahren entwickelt werden. Aufgrund Gerätespezifischer Unterschiede während der Ionisierung gelang dies jedoch nur für eine der beiden charakterisierten Komponenten. Diese sensitive analytische Methode kann bei Bedarf direkt in Abwässern verwendet werden, um die Bildung von relevanten Transformationsprodukten beim Einsatz von Ozon bzw. deren Abbau in weitergehenden standortspezifischen Reinigungsstufen zu erfassen.

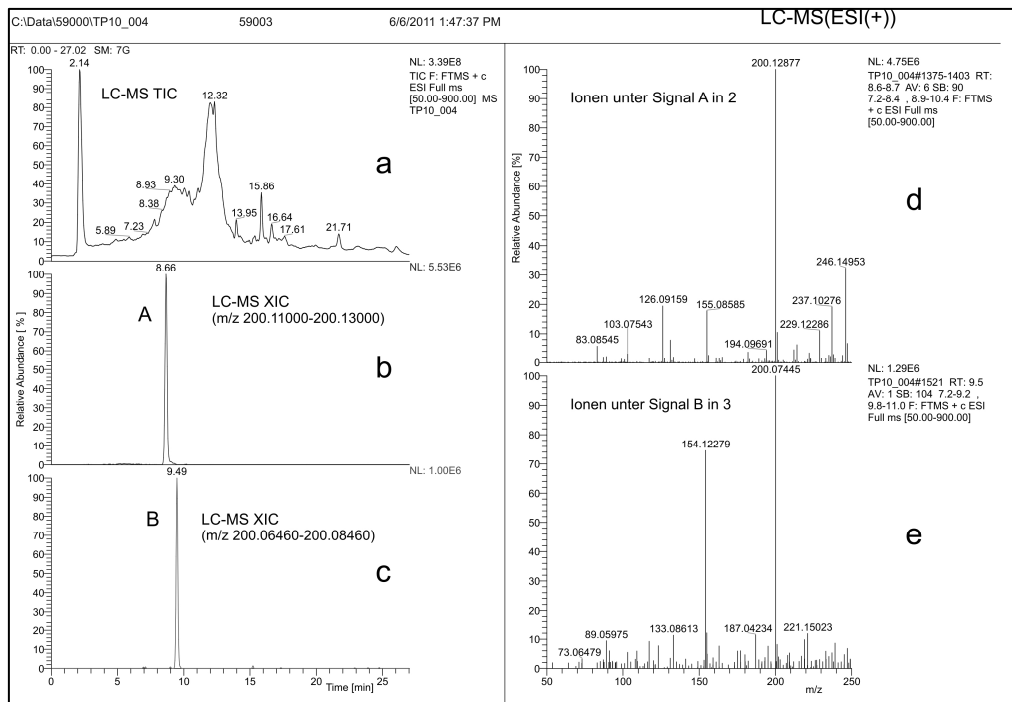


Abbildung 3-4: (a) ESI LC-MS TIC(+) des Extrakts mit toxikologisch positivem Responns, (b,c) XICs der relevanten Massenspuren, (d,e) Molekülionen mit m/z 200 (m/z 200,12877 bzw. 200, 07445) unter den Signalen A bzw. B der XICs in (b,c).

Tabelle 3-1: Strukturformel, Summenformel, IUPAC-Name und monoisotope Masse der mittels Daten aus LC-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen (n= 1,2,3) anhand „exakter Masse“ und zugehörigem Fragmentierungsverhalten identifizierten Stoffe, die die positive Ionenmasse m/z 200 zeigten.

Nr.	Strukturformel	Summenformel IUPAC-Name M <sub>mono</sub>
I A		[C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (E)-10-amino-10-oxodec-5-enoic acid [200.12877] <sup>+</sup>
I B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> N-ethyl-1-phenylmethanesulfonamide [200.07445] <sup>+</sup>
II B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> N,N-dimethyl-1-phenylmethanesulfonamide [200.07445] <sup>+</sup>
III B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> 2-(benzylsulfonyl)ethanamine [200.07445] <sup>+</sup>
IV B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> N-ethyl-(X)-methylbenzenesulfonamide X = 1, 2 oder 3 [200.07445] <sup>+</sup>
V B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> N,N,(X)-trimethylbenzenesulfonamide X = 1, 2 oder 3 [200.07445] <sup>+</sup>
VI B		[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> S] <sup>+</sup> 2-tosylethan-1-amine [200.07445] <sup>+</sup>

Die toxikologischen *In-vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass nur bei den Extrakten der Zu- und Ablaufproben geringe zytotoxische Effekte (XTT, NR, SRB) nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 3-5). Im Gegensatz dazu wurden bei den nicht aufkonzentrierten Proben keinerlei Effekte gefunden. Die Ergebnisse der Östrogenitäts-Untersuchungen zeigen, dass durch den Einsatz von Ozon sowohl eine Verringerung, als auch eine Erhöhung der östrogenen Aktivität erfolgen kann, unabhängig davon, ob die Behandlung volumen- oder SAK-gesteuert ist. Ein Grund dafür kann die unterschiedliche Zusammensetzung des Abwassers in Bezug auf die organischen Inhaltsstoffe zu den unterschiedlichen Probennahmezeitpunkten sein. Diese gegensätzlichen Ergebnisse konnten noch nicht endgültig geklärt werden, die Untersuchung weiterer Proben auch unterschiedlicher Herkunft wird daher dringend notwendig sein, um generalisierende Schlussfolgerungen ziehen zu können. Dies gilt umso mehr, als die Ergebnisse verschiedener Tests, die östrogene Wirkung anzeigen könnten, bisher aber kein eindeutiges Bild ergeben.

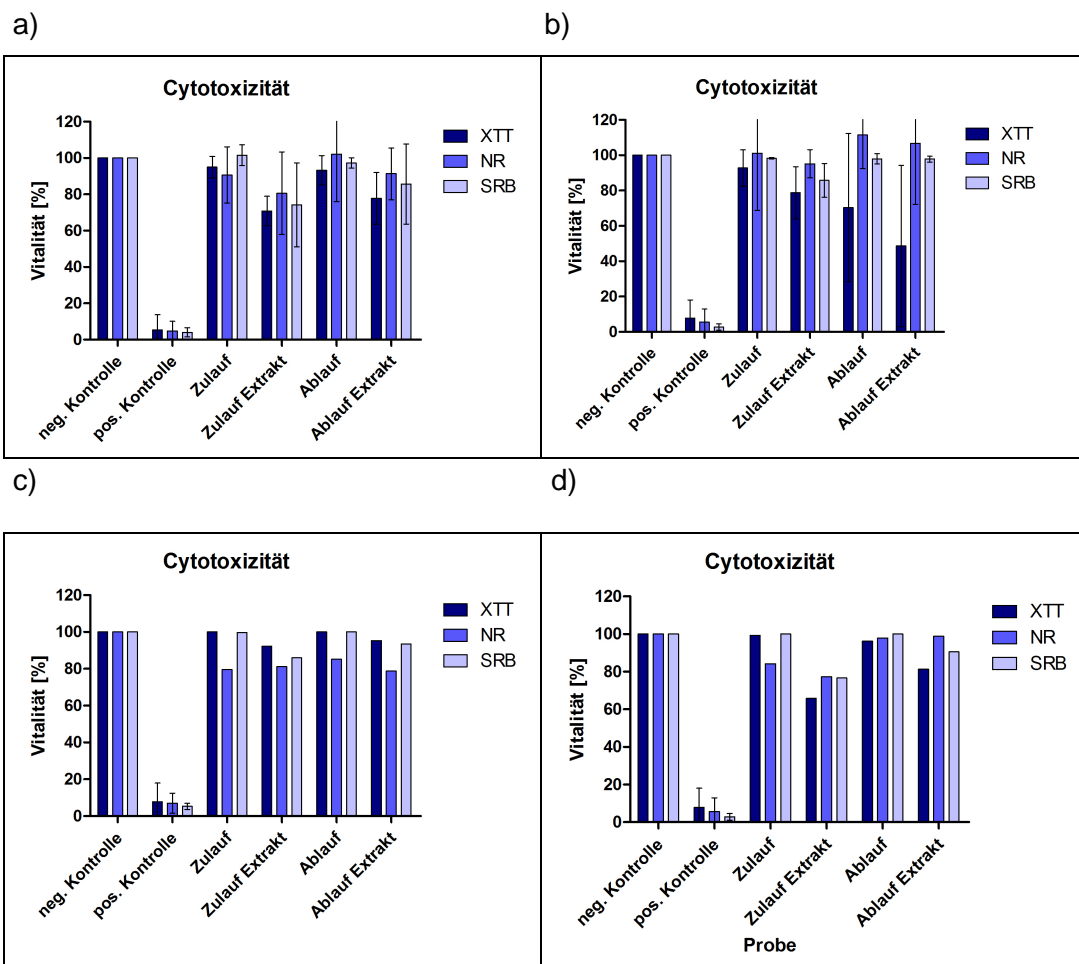


Abbildung 3-5: Untersuchung der Zytotoxizität: a) 2 mg/L Ozon volumengesteuert. b) 2 mg/L Ozon SAK-gesteuert. c) 5 mg/L Ozon volumengesteuert. d) 5 mg/L Ozon SAK-gesteuert.

Die Genotoxizitäts-Untersuchungen mittels Ames-Test und Comet-Assay zeigten bei vier von fünf untersuchten Proben aus Bad Sassendorf weder im Zulauf noch im Ablauf der Ozonung genotoxische Effekte innerhalb der Testsysteme. In einer Probe schien es einen schwachen genotoxischen Effekt gegeben zu haben, da sich im Comet-Assay schwach erhöhte DNA-Strangbruchraten im Extrakt des Zulaufs ( $p \leq 0,05$ ) gezeigt hatten, sowohl gegenüber der konzentrierten Ablaufprobe als auch gegenüber der Negativkontrolle, jedoch erst nach 24stündiger Inkubationszeit (Zusammengefasst in Tabelle 3-2). Es zeigte sich zusätzlich auch im Ames-Test eine Erhöhung der Mutationsrate im Zulauf, allerdings ohne eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung und ohne dass sich die Ergebnisse reproduzieren ließen. Da diese Effekte in der Ablaufprobe nicht mehr festgestellt wurden, schien durch die Ozonung (2mg/L Ozon, SAK-gesteuert) bei dieser Probe eine erniedrigte Genotoxizität aufgetreten zu sein. Dieser Befund müsste durch eine wiederholte Untersuchung (wiederholte Probenahmen unter konstanten Bedingungen) verifiziert werden. Die Arbeiten um [24] zeigen eine effektive Reduktion der Genotoxizität nach der Ozon-Behandlung von Abwässern, während [26] lediglich von einer um 10 % reduzierten Genotoxizität nach der Ozonung sprechen. Dagegen merken [21] an, dass Ergebnisse zur Toxizität und Mutagenität nach der Ozonbehandlung generell inkonsistent seien. Unterschiedliche Behandlungsmethoden und die Untersuchung von einzelnen Stichproben zu unterschiedlichen jahreszeitlichen Bedingungen in dieser Arbeit lassen daher bisher keine allgemeingültige genotoxikologische Bewertung der Ozonung als Abwasserbehandlung zu.

Tabelle 3-2: Probenahme 5 vom 08.02.2011 (Wiederholungsversuch).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p-Wert (Probe vs. Negativkontrolle)	p-Wert (Zulauf vs. Ablauf)
Z 1048044E 1	153	0,76 ± 0,63	0,21	0,21
A 1048045E 1	153	0,62 ± 0,81	0,18	
Z 1048044E 24	153	1,24 ± 1,60	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>
A 1048045E 24	153	0,89 ± 1,06	0,67	
Negativkontrolle	153	0,85 ± 1,01		
Positivkontrolle	102	23,12 ± 10,61		

*In-vivo*-Untersuchungen mit Stellvertreterarten der Primärproduzenten (Grünalge, Wasserlinse) zeigen, dass die untersuchten Abwasserproben der Kläranlage Bad Sassendorf vor der Ozonung mäßig toxisch für diese Primärproduzenten waren. In der Kläranlage Bad Sassendorf führte die Ozonung zu einer erhöhten Algtoxizität, dagegen war das Wachstum der Wasserlinsen vor und nach Ozonung in etwa im gleichen Maße gehemmt. Die Untersuchungen mit dem Wasserfloh *Daphnia magna* und den Fischeiern des Zebraärlings zeigten in Bad Sassendorf keine Beeinträchtigung der Invertebraten und der Fische durch die nach der Ozonung gebildeten Transformationsprodukte an.

Nachfolgend sind alle Giftigkeitswerte für die bisher untersuchten Abwasserproben der Kläranlage Bad Sassendorf in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der ökotoxikologischen Untersuchungen mit Standard-Testverfahren

Probenentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Probestelle	Probennummer	Fischiestest	Akuter Daphnia-Test	Algentest DIN-Medium	Algentest Altenburgermedium	Lemna Frondzahl	Lemna Frondfläche
19. - 20.10.2010	2 mg O <sub>3</sub> /l Q-Steuerung	Zulauf	1044015	G1	G1	G4	G8	G1	G2
		Ablauf	1044016	G1	G1	G8	G>8	G1	G2
02. - 03.11.2010	2 mg O <sub>3</sub> /l SAK-Steuerung	Zulauf	1044524	G1	G1	G4 (G1)	G>8	G4	G4
		Ablauf	1044537	G1	G1	G1	G>8	G1	G4
17. - 18.11.2010	5 mg O <sub>3</sub> /l Q-Steuerung	Zulauf	1044531	G1	G1	G1	G>8	G2	G8
		Ablauf	1044544	G1	G1	G1	G>8	G1	G4
22. - 23.11.2010	5 mg O <sub>3</sub> /l SAK-Steuerung	Zulauf	1044533	G1	G1	G1	G>8	G1	G8
		Ablauf	1044546	G1	G1	G>8	G>8	G4	G8
07. - 08.02.2011	2 mg O <sub>3</sub> /l Q-Steuerung	Zulauf	1048044	G1	G1	G4	G>8	G4	G4
		Ablauf	1048045	G1	G1	G>8	G>8	G4	G8

Die ökotoxikologischen Vor-Ort-Untersuchungen im Durchflusssystem an den Kläranlagen Bad Sassendorf und Duisburg-Vierlinden lassen zum einen auf eine leicht erhöhte Toxizität unmittelbar nach der Ozonung schließen (*Lumbriculus* Toxizitätstest: verringerte Biomasse + Reproduktion, siehe exemplarisch Abbildung 3-6). Zum anderen sind aber auch deutliche Hinweise auf eine verringerte Östrogenität *in-vivo* feststellbar (Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke siehe exemplarisch Abbildung 3-7). Der *Lumbriculus*-Test weist damit auf die Bildung toxischer Oxidationsprodukte in Folge der Ozonung hin. Ähnliche Ergebnisse wurden schon in vorangegangenen Untersuchungen an zwei verschiedenen Kläranlagen erzielt [29, 30]. Allerdings lassen sich noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die ökologische Relevanz dieser leicht erhöhten Toxizität ziehen, zumal eine verringerte endokrine Aktivität ökologische Vorteile zur Folge haben kann.

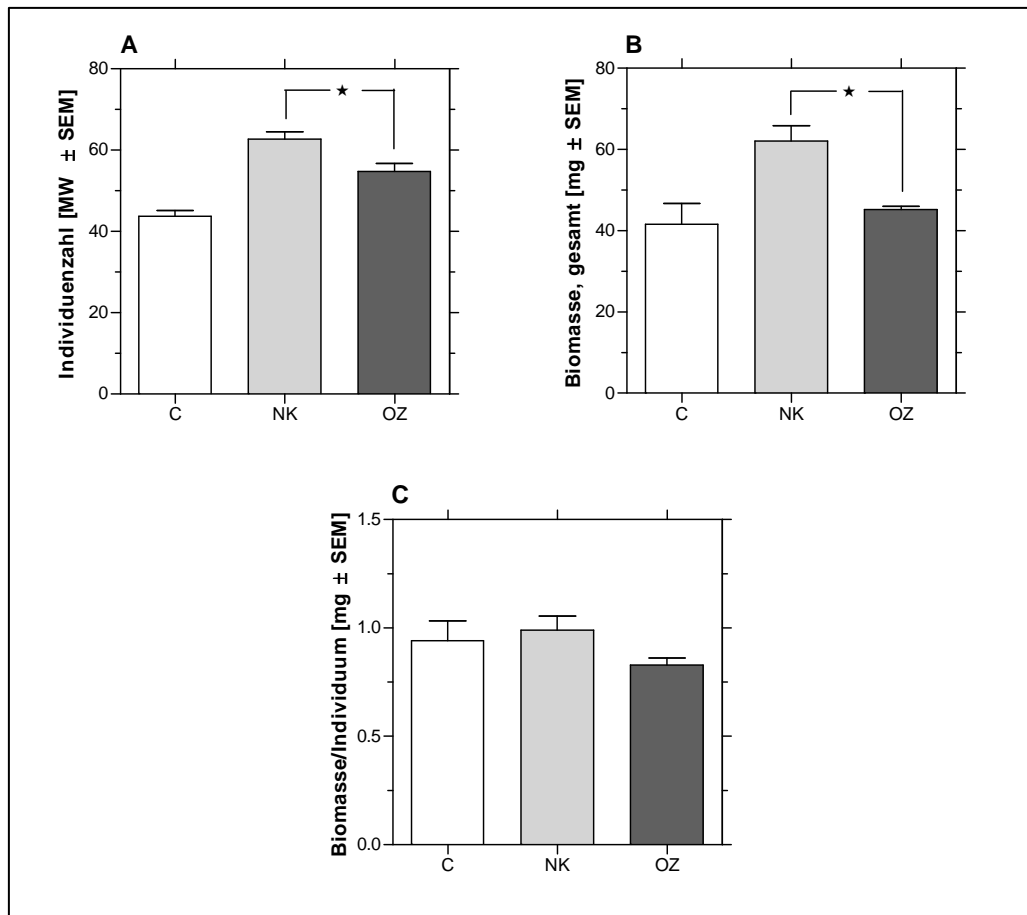


Abbildung 3-6: Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*. Individuenzahl (A) und Biomasse pro Replikat (B), Biomasse pro Individuum (C) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★,  $p < 0,05$  (t-Test).

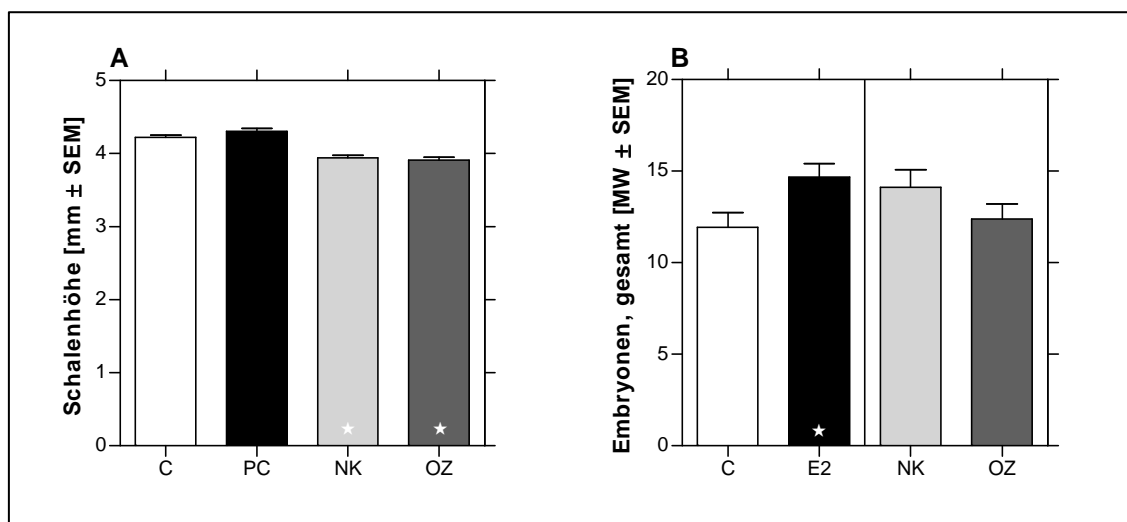


Abbildung 3-7: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Schalenhöhe (A) und Anzahl der Gesamt-Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; PC: Positivkontrolle mit  $17\beta$ -Ethinylestradiol; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★,  $p < 0,05$  (t-Test).

Die ersten Untersuchungen auf der kommunalen Kläranlage Duisburg-Vierlinden wurden während der Inbetriebnahme der Ozonung durchgeführt und konnten eine bessere Spurenstoffelimination (ermittelt innerhalb des Einzelauftrags Nr. 6) bei gleichen Ozondosen feststellen sowie einen auffällig niedrigen Bromatwert (Bromatkonzentration < 0,1 µg/L) trotz hohen Ozondosen (Zieldosis war 7 mg/L Ozon im Abwasser).

Die Folgenden beiden Tabellen 3-4 und 3-5 geben ein Überblick über die bisherigen toxikologischen Ergebnisse des Abwassers der Kläranlage Bad Sassendorf vor (Zulauf) und nach (Ablauf) der Ozonungsstufe.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der *In-vitro*-Tests

<b><i>In-vitro</i>-Tests</b>					
<b>Testsystem/-organismus</b>	<b>Getestete toxische Wirkung</b>	<b>Ergebnis Zulauf</b>	<b>Ergebnis Ablauf</b>	<b>Unterschied Zu- und Ablauf</b>	<b>Bemerkungen</b>
XTT, NR, SRB (CHO)	Zytotoxizität	Positiv (nur Extrakte)	Positiv (nur Extrakte)	Keiner	
LDHe (CHO)	Zytotoxizität	Negativ	Negativ		
MTT (T47D)	Zytotoxizität	Negativ	Negativ		
ER Callux (T47D)	Östrogenität	Zum Teil positiv	Zum Teil positiv	Uneindeutig	Effekte in Extrakten geringer
Ames-Test ( <i>S. typhimurium</i> )	Genotoxizität	Negativ	Negativ		
Comet-Assay (humane Hepatozyten HepG2)	Genotoxizität	1 von 5 positiv in Extrakten	Negativ		



Tabelle 3-5: Zusammengefassten *In-vivo*-Tests

<b><i>In-vivo</i>-Tests</b>					
<b>Testsystem/-organismus</b>	<b>Getestete toxische Wirkung</b>	<b>Ergebnis Zulauf</b>	<b>Ergebnis Ablauf</b>	<b>Unterschied Zu- und Ablauf</b>	<b>Bemerkungen</b>
Grünalge <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstumshemmung	Positiv	Positiv	Ablauf größere Effekte	Modifiziertes Medium notwendig
Wasserlinse <i>Lemna Minor</i>	Wachstumshemmung	Positiv	Positiv	Keiner	Fronfläche empfindlicher als Frondzahl
Wasserfloh <i>Daphnia Magna</i>	Schwimmfähigkeit (akute Toxizität)	Negativ	Negativ		
Wasserfloh <i>Daphnia Magna</i>	Reproduktion, Östrogenität	Negativ	Negativ		
Eier des Zebraärlings ( <i>Danio rerio</i> )	Embryonalentwicklung	Negativ	Negativ		
Glanzwurm <i>Lumbriculus variegatus</i>	Allgemeine Toxizität	Negativ	Positiv	Effekt nur im Vergleich Zu-/Ablauf	Überlagerung durch Medium/Nährstoffangebot
Zwergdeckelschnecke <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Östrogenität (Embryonenzahl)	Positiv	Negativ		
Zebrauschel <i>Dreissena polymorpha</i>	Allgemeine Toxizität	Negativ	Negativ		

## 4 Ausblick auf die zweite Projektphase

Im Hinblick auf die weitergehenden Untersuchungen der Fraktionierung mit dazugehörigen effektbasierten Untersuchungen können die fünf untersuchten Betriebseinstellungen auf der Kläranlage in Bad Sassendorf momentan noch nicht abschließend bewertet und auf alle Abwässer generalisiert angewendet werden. Hierzu müssten zunächst die Untersuchungen der Fraktionierung beendet und die Kläranlagen in Schwerte und Vierlinden untersucht werden, deren Einzugsgebiet und Abwasserzusammensetzung sich von Bad Sassendorf unterscheiden. Aufgrund der in einigen Wirkungstests leicht erhöhten Toxizität infolge der Ozonung sollen ebenfalls die auf den drei kommunalen Kläranlagen weitergehenden standortspezifischen verfahrenstechnischen Reinigungsstufen auf einen möglichen Abbau der gebildeten Transformationsprodukte bzw. deren toxische Wirkung untersucht werden. Die Kopplung mit dem Einzelauftrag Teilprojekt MKUNLV-EA6 wird die Möglichkeit bieten, in einer zweiten Projektphase auf den gewonnenen Ergebnissen und Erfahrungen aufbauend diese wichtigen Fragestellungen zu klären. Dann sollte es möglich sein, über die unmittelbar untersuchten drei Kläranlagen hinaus auch generalisierende Aussagen zur Relevanz von Transformationsprodukten aus der großtechnischen Ozonung von kommunalem Abwasser treffen zu können. Diese notwendigen weiterführenden Arbeiten sind für eine Phase 2 geplant.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Von Gunten, U. (2003): Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* 37, 1469
2. Wahl, M., Huber, A. (2005): Ionenchromatographische Verfahren zur Bromatbestimmung in Trink- und Mineralwässern. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 10/2005 Sonderteil Biotechnologie, 2-4
3. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung –TrinkwV 2001). (21. Mai 2001). Abgerufen am 29. Juli 2009 von Bundesrecht:[http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/trinkwv\\_2001/gesamt.pdf](http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/trinkwv_2001/gesamt.pdf)
4. Schmidt, C.K., Brauch, H.J. (2008): N,N-dimethosulfamide as precursor for N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation upon ozonation and its fate during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology* 42(17), 6340-6346.
5. Krauss, M., Longrée, P., Dorusch, F., Ort, C., Hollender, J. (2009): Occurrence and removal of N-nitrosamines in wastewater treatment plants. *Water Research* 43(17), 4381-4391.
6. Hung, H.W., et al. (2010): Trace Analysis of N-Nitrosamines in Water Using Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry. *Water Air and Soil Pollution* 213(1-4), 459-469.
7. Hollender, J., Zimmermann, S.G., Koepke, S., Krauss, M., Mc Ardell, C.S., Ort, C., Singer, H., von Gunten, U., Siegrist, H. (2009): Elimination of Organic Micropollutants in a Municipal Wastewater Treatment Plant Upgraded with a Full-Scale Post-Ozonation Followed by Sand Filtration. *Environmental Science & Technology* 43(20), 7862-7869.
8. Abellán, M.N., Gebhardt, W., Schröder, H.Fr. (2008a): Detection and Identification of Degradation Products of Sulfamethoxazole by means of LC/MS and -MSn after Ozone Treatment. *Water Sci. Technol.* 58(9), 1803-1812.
9. Abellán, M.N., Gebhardt, W., Schröder, H.Fr. (2008): Der Abbau des Antibiotikums Trimethoprim durch Ozon und die Verfolgung entstehender Reaktionsprodukte mit Hilfe von Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massen- (HPLC-MS) und Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MSn). Poster, Kurzsreferate S. 213-217; Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in der GDCh, 28.-30.04.2008, Trier, (Germany).
10. Abellán, M.N., Giménez, J., Schröder, H.Fr., Esplugas, S. (2009): Degradation of Sulfamethoxazole by Photocatalysis and Ozone. Poster during: AOP5; 5th

- International Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment, 30.03.-02.04.2009 Berlin (Germany).
11. Benner, J., Favier, M., Schröder, H.Fr., von Gunten, U., Ternes, T. (2008): Ozonierung von Betablockern: Kinetische Studien und Identifikation von Oxidationsprodukten. Poster, Kurzreferate S. 320-323; Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in der GDCh, 28.-30.04.2008, Trier, (Germany).
  12. Gebhardt, W., Schröder, H.Fr. (2007): LC-MS and –MS/MS for the Follow-Up of the Elimination of Persistent Pharmaceuticals During Wastewater Treatment Applying Biological Wastewater Treatment and Advanced Oxidation. *J. Chromatogr. A* 1160, 34-43.
  13. Genena, A.K., Luiz, D.B., Gebhardt, W., Moreira, R.F.P.M., José, H.J., Schröder, H.Fr.: Imazalil degradation applying ozone – Transformation products, kinetics and toxicity of treated aqueous solutions. *Ozone-Science & Engineering*, accepted for publication.
  14. Luiz, D.B., Genena, A.K., Virmond, E., José, H.J., Moreira, R.F.P.M., Gebhardt, W., Schröder, H.Fr. (2010): Identification of Degradation Products of Erythromycin A Arising from Ozone and Advanced Oxidation Process Treatment, *Water Environment Research* 82(9), 797-805.
  15. Nöthe, T., Fahlenkamp, H., von Sonntag, C. (2009): Ozonation of wastewater: Rate of ozone consumption and hydroxyl radical yield. *Environmental Science and Technology* 43(15), 5990-5995.
  16. Von Gunten, U. (2003): Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37(7), 1443-1467.
  17. Von Sonntag, C. (2008): Advanced oxidation processes: Mechanistic aspects. *Water Science and Technology*, 1015-1021.
  18. Langlais, B., Reckhow, D.A., Brink, D.R. (1991): *Ozone in water treatment - Application and Engineering*. AWWA research foundation and Lewis publishers, ISBN: 0-87371-474-1, 2.
  19. Huber, M.M., Ternes, T.A., von Gunten, U. (2004): Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environmental Science and Technology* 38(19), 5177-5186.
  20. DIN 38415-4 (1999): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 4: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames Test) (T 4).

21. Petala, M., Samaras, P., Zouboulis, A., Kungolos, A., Sakellaropoulos, G.P. (2008): Influence of ozonation on the in vitro mutagenic and toxic potential of secondary effluents. *Water Research* 42(20), 4929-4940.
22. Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., Demarini, D.M. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 636(1-3), 178-242.
23. Ferk, F., Misik, M., Grummt, T., Majer, B., Fuerhacker, M., Buchmann, C., Vital, M., Uhl, M., Lenz, K., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyanyan, A., Knasmüller, S. (2009): Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672(2), 69-75.
24. Cao, N., M. Yang, et al. (2009). "Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays." *Sci Total Environ* 407(5): 1588-1597.
25. Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
26. Vanhulle, S., M. Trovaslet, et al. (2008). "Decolorization, cytotoxicity, and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye-contaminated wastewater." *Environ Sci Technol* 42(2): 584-589.
27. Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A. (2002): Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science & Technology* 36(8), 1751-1756.
28. Flaherty, C. M., Dodson, S.I. (2005): Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61(2), 200-207.
29. Stalter, D., Magdeburg, A., Oehlmann, J. (2010a): Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an in vivo test battery. *Water Research* 44(8), 2610-2620.
30. Stalter, D., Magdeburg, A., Weil, M., Knacker, T., Oehlmann, J. (2010b): Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Research* 44(2), 439-448.
31. Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J. (2007): Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 16(1), 169-182.