
**Schlussbericht
zum Forschungsvorhaben**

„Metabolitenbildung beim Einsatz von Ozon“

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

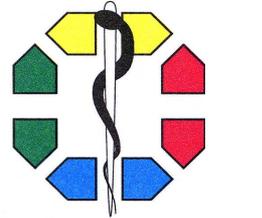
ppa.

K.-D. Neumann

Dr.-Ing. W. Merkel

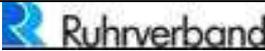
Prof. Dr. T. C. Schmidt

Projektpartner

Projektleiter	Prof. Dr. Torsten C. Schmidt
Partner	Bearbeiter
	IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH Prof. Dr. Torsten C. Schmidt Moritzstraße 26 45476 Mülheim an der Ruhr Tel.: 0208/40303-310 t.schmidt@iww-online.de
	Universität Duisburg-Essen Ingenieurwissenschaften FG Siedlungswasser und Abfallwirtschaft Prof. Dr. R. Widmann Universitätsstraße 15 45141 Essen Tel.: 0201/183-2686 Renus.Widmann@uni-due.de
	Institut für Siedlungswasserwirtschaft (ISA), Umweltanalytisches Laboratorium Prof. Dr. H. Fr. Schröder Krefelder Strasse 299 52070 Aachen Tel.: 0241/80-25 197 schroeder@isa.rwth-aachen.de
	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Dr. Jochen Türk Bliersheimer Straße 58-60 47229 Duisburg Tel.: 02065/418-179 tuerk@iuta.de
	Universitätsklinikum Essen Prof. Dr. Elke Dopp Hufelandstraße 55 45122 Essen Tel.: 0201/723 4578 elke.dopp@uni-due.de
	Ruhr-Universität Bochum Institut für Hygiene und Mikrobiologie Abt. f. Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin Prof. Dr. Michael Wilhelm Universitätsstraße 150 44801 Bochum Tel.: 0234/32-27365 wilhelm@hygiene.rub.de
Prof. Dr. Torsten C. Schmidt Dr. Friedrich Werres Dr. Peter Balsaa Dipl.-Ing. Sebastian Kowal Holger Lutze M.Sc. Ursula Neuhaus	
Prof. Dr. R. Widmann PD Dr. Kai Bester Niklas Janzen M.Sc. Mauro Tavian M.Sc.	
Prof. Dr. Horst Fr. Schröder Dr. Wilhelm Gebhardt	
Dr. Jochen Türk Fritz Luther Andrea Börgers M.Sc. Marco Zedda M.Sc. Christoph Portner M.Sc.	
Prof. Dr. Elke Dopp Jessica Richard M.Sc. Melanie Gerhards	
Prof. Dr. Michael Wilhelm Dipl. Biol. David Wutschke Dr. rer.nat. Monika Kasper-Sonnenberg, Dipl. Biol. Dr. J. Hölzer	

 <p>GOETHE UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN</p>	<p>Goethe-Universität Frankfurt am Main Prof. Dr. Jörg Oehlmann Senckenberganlage 31 60325 Frankfurt am Main Tel.: 069/798-24872 oehlmann@bio.uni-frankfurt.de</p>	<p>Prof. Dr. J. Oehlmann Dipl. Biol. Axel Magdeburg Dr. Daniel Stalter</p>
	<p>Forschungsinstitut gaiac Dr. Monika Hammers-Wirtz RWTH Aachen c/o: Institut für Umweltforschung (Biologie V) Worringerweg 1 52074 Aachen Tel.: 0241/8027601 hammers-wirtz@gaiac.rwth-aachen.de</p>	<p>Dr. Monika Hammers-Wirtz Dipl. Biol. Katrin Liedtjens Birgitta Goffart Dipl. Biol. Julia Bless Dipl. Biol. Melanie Grolms-Aal</p>
	<p>Grontmij GmbH Dr.-Ing. Heinrich Herbst Graeffstraße 5 50823 Köln Tel.: 0221/57402-711 heinrich.herbst@grontmij.de</p>	<p>Dr.-Ing. Heinrich Herbst Dipl.-Ing. Sandra Ante Stefan Ingenhaag</p>

Kooperierende Partner:

	<p>Ruhrverband Kronprinzenstraße 37 45128 Essen</p>	<p>Prof. Dr. Ralf Klopp Dr.-Ing. Thomas Grünebaum Dr.-Ing. Dieter Thöle Dipl.-Lab.-Chem. Christian Högel</p>
	<p>Emschergenossenschaft/Lippeverband Kronprinzenstraße 24 45128 Essen</p>	<p>Dipl.-Ing. Peter Jagemann Dipl.-Ing. Sven Lyko</p>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Verzeichnis der Bilder	VI
Verzeichnis der Tabellen	XI
Verzeichnis der Abkürzungen und der Symbole	XV
1 Einleitung	1
2 Projektverlauf	4
2.1 Überblick	4
2.2 Durchgeführte Untersuchungen auf den Kläranlagen	4
2.3 Extraktion und Fraktionierung von Abwasserproben (AP 1).....	5
2.4 Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2).....	5
2.5 Ozonzehrung und Hydroxylradikalexposition (AP 3).....	7
2.6 Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening, Strukturaufklärung und semiquantitative Bestimmung (AP 4-6).....	7
2.7 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen (AP 7 und 8)	9
2.8 <i>In-vivo</i> -Untersuchungen (AP 9)	10
3 Experimentelles.....	11
3.1 Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Duisburg-Vierlinden	11
3.2 Ozonanlage und Anlage zur Pulveraktivkohledosierung auf der kommunalen Kläranlage Schwerte	13
3.3 Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Bad Sassendorf:.....	15
3.4 Fraktionierung und Anreicherung der Abwässer (AP 1)	18
3.4.1 Anreicherung.....	18
3.4.2 Fraktionierung.....	19
3.5 Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2).....	20
3.5.1 Bestimmung von Bromat	20
3.5.2 Bestimmung von Nitrosaminen.....	21
3.6 Ozonzehrung und Hydroxylradikalexposition (AP 3).....	24

3.7	Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening sowie anschließende Strukturaufklärung (AP 4 und 5)	27
3.7.1	GC-MS-Screening.....	27
3.7.2	LC-MS-Screening.....	27
3.7.3	Strukturaufklärung ausgewählter Stoffe mittels hochauflösender multipler Tandemmassenspektrometrie (AP 5)	28
3.7.4	Semiquantitative Bestimmung von Transformationsprodukten (AP 6)	29
3.8	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen auf Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7 und 8).....	30
3.8.1	Material Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7)	30
3.8.2	Durchführung der Versuche Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7)	31
3.8.3	Material Ames-Test und Comet-Assay-Test (AP 8)	33
3.8.4	Durchführung der Versuche Ames- und Comet-Assay-Test (AP 8)	35
3.9	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen (AP 9)	37
3.9.1	Material und Methoden ökotoxikologische <i>In-vivo</i> -Tests (AP 9.1).....	37
3.9.2	Durchführung der Versuche ökotoxikologische <i>In-vivo</i> -Tests (AP 9.1)	38
3.9.3	Material, Methoden und Durchführung: <i>In-vivo</i> -Tests im Durchfluss (AP 9.2)....	43
4	Ergebnisse und Diskussion	46
4.1	Fraktionierung und Anreicherung (AP 1).....	46
4.2	Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2).....	47
4.2.1	Bromatbildung (2.1).....	47
4.2.2	Bildung von Nitrosaminen (2.2)	49
4.3	Ozonzehrung und Hydroxylradikalexposition (AP 3).....	50
4.4	Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening sowie anschließende Strukturaufklärung (AP 4 und 5)	55
4.4.1	Massenspektrometrisches GC-MS-Screening (4.1, 4.2).....	55
4.4.2	Massenspektrometrisches LC-MS-Screening (4.1; 4.2).....	59
4.4.3	Strukturaufklärung (AP 5).....	63
4.4.4	Semiquantitative Bestimmung (AP 6)	66
4.5	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen (AP 7 und 8)	68
4.5.1	Östrogenität und Zytotoxizität (AP 7.1-7.2).....	68

4.5.2	Genotoxizität (AP 8)	73
4.6	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen (AP 9)	89
4.6.1	Ökotoxikologische <i>In-vivo</i> -Tests (9.1).....	89
4.6.2	Zusammenfassung der ökotoxikologischen <i>In-vivo</i> -Tests (9.1)	101
4.6.3	<i>In-vivo</i> -Tests im Durchfluss (9.2).....	103
4.7	Erste Ergebnisse der Untersuchungen auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden ..	112
5	Fazit und Ausblick	113
6	Literaturverzeichnis	120
7	Autorenverzeichnis	125
8	Anhang.....	126
8.1	Ames-Test (AP 8).....	127
8.2	Bromid und Bromatkonzentrationen	134

Verzeichnis der Bilder

Abbildung 1-1: Schematischer Projektaufbau.....	2
Abbildung 1-2: Schematischer Probenlogistikplan, dargestellt an Probenmaterial der KA Bad Sassendorf	3
Abbildung 2-1 : Strukturformeln von relevanten Nitrosaminen.....	6
Abbildung 3-1: Fließschema der KA Duisburg-Vierlinden. ÜSS: Überschussschlamm, SF: Sandfang	12
Abbildung 3-2: Fließschema der großtechnischen Versuchsanlage der KA Schwerte. PN: Probenahmestellen, VK: Vorklärung, NK: Nachklärung, N: Nitrifikation, D: Denitrifikation, PAK: Pulveraktivkohle	14
Abbildung 3-3: Verfahrensschema der KA Bad Sassendorf. ÜSS: Überschussschlamm, SF: Sandfang	15
Abbildung 3-4: Aufbau eines Reaktionsgefäßes für die Indigomethode [23].....	26
Abbildung 3-5: Comet-Assay: Beispielhaftes Olive Tail Moment zur Auswertung.....	36
Abbildung 4-1: Extrakte vor und nach der Ozonung, a) 2mg/L Ozon (Volumensteuerung), b) 5mg/L Ozon (Volumensteuerung)	46
Abbildung 4-2: Zusammenfassende Darstellung der Bromat-Konzentrationen in Abhängigkeit der Sollkonzentration von Ozondosis in Bad Sassendorf.....	48
Abbildung 4-3: Ozonzehrung für 5 mg/L Ozondosierung	50
Abbildung 4-4: Ozonzehrung für 2 mg/L Ozondosierung	51
Abbildung 4-5: Ozonhalbwertszeit und Abbau von 4-Chlorbenzoesäure (pCBA) vs. DOC-Konzentration.....	51
Abbildung 4-6: Abbaukinetik von 4-Chlorbenzoesäure bei Dosierung von 2 und 5 mg/L Ozon	52
Abbildung 4-7: Transformation von 4-Chlorbenzoesäure bei verschiedenen Ozondosierungen und daraus abgeleiteter Abbau anderer Schadstoffe.....	54
Abbildung 4-8: Ozonung in Bad Sassendorf (Probenahme Nr. 3 vom 18.11.2010) mit ca. 5 mg/L Ozon. Vergleich der Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) von Zulauf und Ablauf (t_R -Bereich 6 – 16 min). Mögliche Transformationsprodukte im Ablauf wurden nummeriert (1 – 4).....	55
Abbildung 4-9: Ozonung in Bad Sassendorf (Probenahme Nr. 3 vom 18.11.2010) mit ca. 5 mg/L Ozon. Vergleich der Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) von	

- Zulauf und Ablauf (t_R -Bereich 16 – 29 min). Mögliche Transformationsprodukte im Ablauf wurden nummeriert (5 – 8).56
- Abbildung 4-10: Vergleich der Chromatogramme des Standards von Nonanal, des Ablaufs und Zulaufs von Probenahme Nr. 3 (5 mg O₃/L) bei den charakteristischen Massenfragmenten $m/z = 98$ und 114 im t_R -Bereich 6,5 – 8,5 min und das Massenspektrum des Ablaufs bei $t_R = 7,78$ min.58
- Abbildung 4-11: Strukturformel von HHCB-Lacton58
- Abbildung 4-12: Darstellung der im positiven ($n = 186$) und negativen ($n = 293$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (erste Versuchseinstellung, 2 mg/L Ozon, volumengesteuert).....59
- Abbildung 4-13: Darstellung der im positiven ($n = 148$) und negativen ($n = 237$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (zweite Versuchseinstellung, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert).....60
- Abbildung 4-14: Darstellung der im positiven ($n = 60$) und negativen ($n = 229$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (dritte Versuchseinstellung, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert).....60
- Abbildung 4-15: Darstellung der im positiven ($n = 112$) und negativen ($n = 296$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (vierte Versuchseinstellung, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert).....61
- Abbildung 4-16: (a) Extrahiertes Chromatogramm für die Massenspur m/z 200 mit einem S/N-Verhältnisses von 8,9, b) Massenspektrum zur Retentionszeit des Peaks mit m/z 200 aus Abbildung 4-16 a), c) Fragmentierungsmuster des Peaks mit m/z von 200 aus der Abbildung 4-16 a)62
- Abbildung 4-17: (a) ESI LC-MS TIC(+) des Extrakts mit toxikologisch positivem Respon, (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).63
- Abbildung 4-18: (a) LC-MS TIC(+) wie in Abb. 3-14 (a); (b) XIC der Massenspur m/z 200,12877 des Signals A und (f) des Massenspektrums wie in Abb. 3-14 (b bzw. d). (c) ESI LC-MS² Produkt-Ionenscan (CID) mit (g) zugehörigem MS²-Produkt-Ionenspektrum. (d,e) ESI LC-MS³ Produkt-Ionenscans (CID) der

Fragmentationen m/z 126 aus (g) bzw. m/z 168 aus (g). (h,i) zugehörige MS ³ -Produkt-Ionenspektren.....	64
Abbildung 4-19: (a) LC-MS TIC, (b) XIC des Ions mit m/z 200, 07445, sowie (c) -MS ² und (d) -MS ³ Produkt-Ionenscans wie in Abb. 3-15 (a bzw. b bzw. c bzw. d) mit zugehörigen MS-Spektrum (e) sowie (f) MS ² - und (g) MS ³ -Produkt-Ionenspektren des Molekülions mit m/z 200 bzw. Produkt-Ions m/z 155 wie in Abb. 3-15.	64
Abbildung 4-20: Zytotoxizität der Matrixprobe (Reinstwasser, Millipore) und der Blindwertprobe der Extraktion (n=3).	68
Abbildung 4-21: 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.	70
Abbildung 4-22: Zytotoxizität der verschiedenen Abwasserproben, getestet an T47D Zellen	72
Abbildung 4-23: Olive-Tail-Moment der Probenahme 1 vom 20.10.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.	79
Abbildung 4-24: Olive-Tail-Moment der Probenahme 2 vom 03.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.	81
Abbildung 4-25: Olive-Tail-Moment der Probenahme 3 vom 18.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden, * p < 0,001 Zulauf / Ablauf, p < 0,01 Ablauf / Negativkontrolle.	83
Abbildung 4-26: Olive-Tail-Moment der Probenahme 4 vom 23.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.	85
Abbildung 4-27: Olive-Tail-Moment der Probenahme 5 vom 08.02.2011, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden, * p < 0,01 Zulauf / Ablauf, p < 0,05 Zulauf / Negativkontrolle.....	87
Abbildung 4-28: Ergebnisse des DIN-Algenhemmtests mit Rohwasserproben in verschiedenen Verdünnungsstufen G in DIN-Medium (—: 5 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).	91
Abbildung 4-29: Ergebnisse des DIN-Algenhemmtests mit Rohwasserproben in verschiedenen Verdünnungsstufen G in Altenburger-Medium (—: 5 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).....	91

- Abbildung 4-30: Mittlere Wachstumskurven von *Desmodesmus subspicatus* in den Kontrollansätzen des miniaturisierten Algenhemmtests mit Altenburger-Medium.....94
- Abbildung 4-31: Wachstumskurven von *Desmodesmus subspicatus* in den Kontrollansätzen und Ansätzen mit Konzentrat einer Rohwasserprobe (1044016) im miniaturisierten Algenhemmtest mit Altenburgermedium.....95
- Abbildung 4-32: Ergebnisse des Wachstumshemmtests mit *Lemna minor* für den Beobachtungsparameter Frondzahl (—: 10 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).....97
- Abbildung 4-33: Ergebnisse des Wachstumshemmtests mit *Lemna minor* für den Beobachtungsparameter Frondfläche (—: 10 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).....97
- Abbildung 4-34: Ergebnisse des Reproduktionstests mit *Daphnia magna*. Darstellung der kumulativen Anzahl an Nachkommen (*:signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$).100
- Abbildung 4-35: Ergebnisse des Fischei-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils 2 unabhängigen Tests.101
- Abbildung 4-36: 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); $n=5$104
- Abbildung 4-37: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Schalenhöhe (A) und Anzahl der Gesamt-Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; PC: Positivkontrolle mit 17β -Ethinylestradiol; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n=40$106
- Abbildung 4-38: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Anzahl unbeschalteter Embryonen (A) und Anzahl der beschalteten Embryonen pro Schnecke (B) 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); $n=40$106
- Abbildung 4-39: 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_I, Abwasser nach dem Ozoninjektor; OZ_D, Abwasser nach dem Ozondiffusor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$; ★★★, $p < 0,001$ (t-Test); weiße Sterne, Signifikanz gegenüber Kontrolle; schwarze Sterne, Signifikanz gegenüber anderen Testwässern; n=5.....109
- Abbildung 4-40: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Schalenhöhe (A) und Anzahl der Gesamt-Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; PC: Positivkontrolle mit 17β-Ethinylestradiol; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); n=40.110
- Abbildung 4-41: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Anzahl unbeschalteter Embryonen (A) und Anzahl der beschalteten Embryonen pro Schnecke (B) 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); n=40.....111
- Abbildung 4-42: Vergleich der Eliminationsleistungen der Injektor- und der Diffusorstraße der Kläranlage Duisburg-Vierlinden.....112

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3-1:	Betriebszustände der Ozonanlage in Bad Sassendorf.....	17
Tabelle 3-2:	Verwendete Geräte	18
Tabelle 3-3:	Verwendete Einstellungen.....	19
Tabelle 3-4:	Systemparameter der Ionenchromatographie.....	20
Tabelle 3-5:	Verwendete Geräte und Materialien	21
Tabelle 3-6:	Verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 3-7:	Ausgewählte Molekül- und Fragment-Ionen die für die Identifizierung und Quantifizierung (fett gedruckte Massenzahlen) der Nitrosamine verwendet wurden.	23
Tabelle 3-8:	Übersicht der verwendeten Geräte.....	24
Tabelle 3-9:	Übersicht der HPLC-UV-Komponenten	25
Tabelle 3-10:	Übersicht verwendeter Chemikalien	25
Tabelle 3-11:	Parameter der HPLC-UV-Messung	26
Tabelle 3-12:	HPLC-Messparameter der Q-Trap-Messung	27
Tabelle 3-13:	Geräteparameter und verwendete Chemikalien.....	29
Tabelle 3-14:	Verwendete Geräte	30
Tabelle 3-15:	Verwendete Geräte	33
Tabelle 3-16:	Verwendete Chemikalien.....	34
Tabelle 3-17:	Verdünnungsstufen (G) und Anteile von Abwasser [%] in den Biotests.	38
Tabelle 3-18:	Einstellungen des Multifunktionsreaders (Tecan, infinite M200) zur Messung der Fluoreszenz der Grünalge <i>Desmodesmus subspicatus</i> im miniaturisierten Algentest.....	40
Tabelle 4-1:	Kinetische Konstanten für ozonrefraktärere Stoffe.....	53
Tabelle 4-2:	Liste vermuteter Transformationsprodukte (siehe Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Die Retentionszeit (t_R) und die fünf häufigsten Massenfragmente sind angegeben.	56
Tabelle 4-3:	Liste der vermuteten Transformationsprodukte aus Tabelle 4-2 und deren Verifizierung mittels Spektrendatenbank.	57
Tabelle 4-4:	Strukturformel, Summenformel, IUPAC-Name und monoisotope Masse der mittels Daten aus LC-MS ⁿ -Untersuchungen (n= 1,2,3) anhand „exakter	

	Masse“ und zugehörigem Fragmentierungsverhalten identifizierten Stoffe, die die positive Ionenmasse m/z 200 zeigten.	65
Tabelle 4-5:	Ergebnisse der Östrogenitätsmessung (pM ER Calux EEQ) mittels ER Calux. Die Zahlen in den Klammern stellen die Werte für den jeweiligen Extrakt dar.	72
Tabelle 4-6:	Blindprobe der Extraktion im Ames-Test.....	73
Tabelle 4-7:	Probenahme 1 vom 20.10.2010, 2 mg/L Ozon, volumengesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.....	74
Tabelle 4-8:	Probenahme 2 vom 03.11.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.....	74
Tabelle 4-9:	Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.....	75
Tabelle 4-10:	Probenahme 4 vom 23.11.2010, 5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.....	75
Tabelle 4-11:	Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.....	76
Tabelle 4-12:	Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 1 vom 20.10.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).	78
Tabelle 4-13:	Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 2 vom 03.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).	80
Tabelle 4-14:	Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 3 vom 18.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).	82
Tabelle 4-15:	Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 4 vom 23.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).	84
Tabelle 4-16:	Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 5 vom 08.02.2011, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung,	

	Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).	86
Tabelle 4-17:	Probenahme 5 vom 08.02.2011 (Wiederholungsversuch).	88
Tabelle 4-18:	Wachstumsraten der Grünalge <i>Desmodesmus subspicatus</i> in den Kontrollansätzen nach 72 h im miniaturisierten Algentest mit AltenburgerMedium.....	93
Tabelle 4-19:	Kenngößen der Wachstumsrate über 72 h in den Kontrollansätzen des miniaturisierten Algentests mit <i>Desmodesmus subspicatus</i> (***: signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm- Sidak-Test, $p < 0,05$).....	93
Tabelle 4-20:	Hemmung der Wachstumsrate [%] im Algenhemmtest mit <i>Desmodesmus subspicatus</i> in Rohwasserproben und Konzentraten von Abwässern (Faktor 1, Faktor 10; ***: signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$).....	95
Tabelle 4-21:	Ergebnisse des akuten Tests mit <i>Daphnia magna</i>	98
Tabelle 4-22:	Ergebnisse des Reproduktionstests mit <i>Daphnia magna</i> in direkten Abwasserproben. Darstellung der Mortalität und der Männchenbildung.	99
Tabelle 4-23:	Zusammenfassung der ökotoxikologischen Untersuchungen mit Standard- Testverfahren.....	101
Tabelle 5-1:	Zusammenfassung der <i>In-vitro</i> -Tests	117
Tabelle 5-2:	Zusammengefassten <i>In-vivo</i> -Tests.....	118
Tabelle 8-1:	Probenahme 1 vom 20.10.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	127
Tabelle 8-2:	Probenahme 2 vom 03.11.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	128
Tabelle 8-3:	Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, Volumengesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	129
Tabelle 8-4:	Wiederholte Untersuchung der Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, Volumengesteuert, Abwasser, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	130
Tabelle 8-5:	Probenahme 4 vom 23.11.2010, 5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	131

Tabelle 8-6:	Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	132
Tabelle 8-7:	Wiederholte Untersuchung Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.	133
Tabelle 8-8:	Detailergebnisse der Bromid und Bromatkonzentrationen (AP 2 und Teilergebnisse aus TP 6)	134

Verzeichnis der Abkürzungen und der Symbole

Abkürzung	Erläuterung	Einheit
AOP	Advanced Oxidation Processes (Erweiterte Oxidationsverfahren)	
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf	[mg/L]
CHO	Chinese Hamster Ovary Cells	
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.	
CID	Collisionally Induced Dissociation (Kollisions-induzierter Dissoziation)	
DOC	Gelöster Organischer Kohlenstoff	[mg/L]
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DWA	Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.	
EI	Elektronenstossionisation	
EN	Europäische Norm	
ESI	Elektrosprayionisierung	
GC	Gaschromatographie	
G-Wert	Giftigkeitswert	
LDHe	extrazelluläre Lactatdehydrogenase	
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 _s	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante	
Q-Steuerung	Volumensteuerung	
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	
ToF	Time of flight mass spectrometer (Flugzeitmassenspektrometer)	
SAK	Spektraler Absorptions-Koeffizient	m ⁻¹
SF	Sandfilter	
S/N	Signal to noise ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)	

Abkürzung	Erläuterung	Einheit
SPE	Solid-Phase-Extraction (Festphasenextraktion)	
SRB	Sulforhodamin B	
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid - Natriumsalz	
Z _{Spezifisch}	Quotient der eingesetzten Ozonkonzentration zu DOC-Konzentration	
ÜSS	Überschussschlamm	
ESI	Electrospray-Ionisation	

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. Der Stand der Technik bezüglich des Einsatzes von Ozon in der weitergehenden Abwasseraufbereitung wurde im Angebot zur Phase 1 dieses Projektes ausführlich dargestellt. 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 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 flüssigchromatographische (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 Kapitel 2 erläutert. Aus den genannten Untersuchungen sollen später geeignete Betriebsbedingungen für die Ozonungsstufe abgeleitet werden.

Im Vorfeld der Untersuchungen wurden gemeinsam mit den Kläranlagenbetreibern die aussichtsreichsten Betriebseinstellungen der Ozonanlagen im Hinblick auf die spätere Praxisnutzung ausgewählt. Diese sollten dann im Rahmen des Forschungsvorhabens hinsichtlich einer Bildung von Transformationsprodukten untersucht werden. Alle geplanten Untersuchungen wurden an die anlagenspezifischen Gegebenheiten der Kläranlagen angepasst und mit dem Zeitablauf in Einzelauftrag MKULNV-EA6 „Elimination von

Arzneimittelrückständen in kommunalen Kläranlagen“ abgestimmt. Probenentnahmekriterien wurden gemeinsam erarbeitet, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund der umfangreichen Untersuchungen und den vielen daran beteiligten Partnern wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, die Probennahme einschließlich Homogenisierung, Verteilung und Transportlogistik möglichst effizient zu gestalten. Hierzu wurde ein Logistikplan ausgearbeitet (Abbildung 1-2). Außerdem wurde durch die RWTH Aachen (ISA) ein Server zur Verfügung gestellt (BSCW-Server) und als interaktive Plattform aufgebaut. Dieser wurde zur Optimierung der Koordination und des Ergebnistransfers der stark miteinander verknüpften Untersuchungen genutzt.

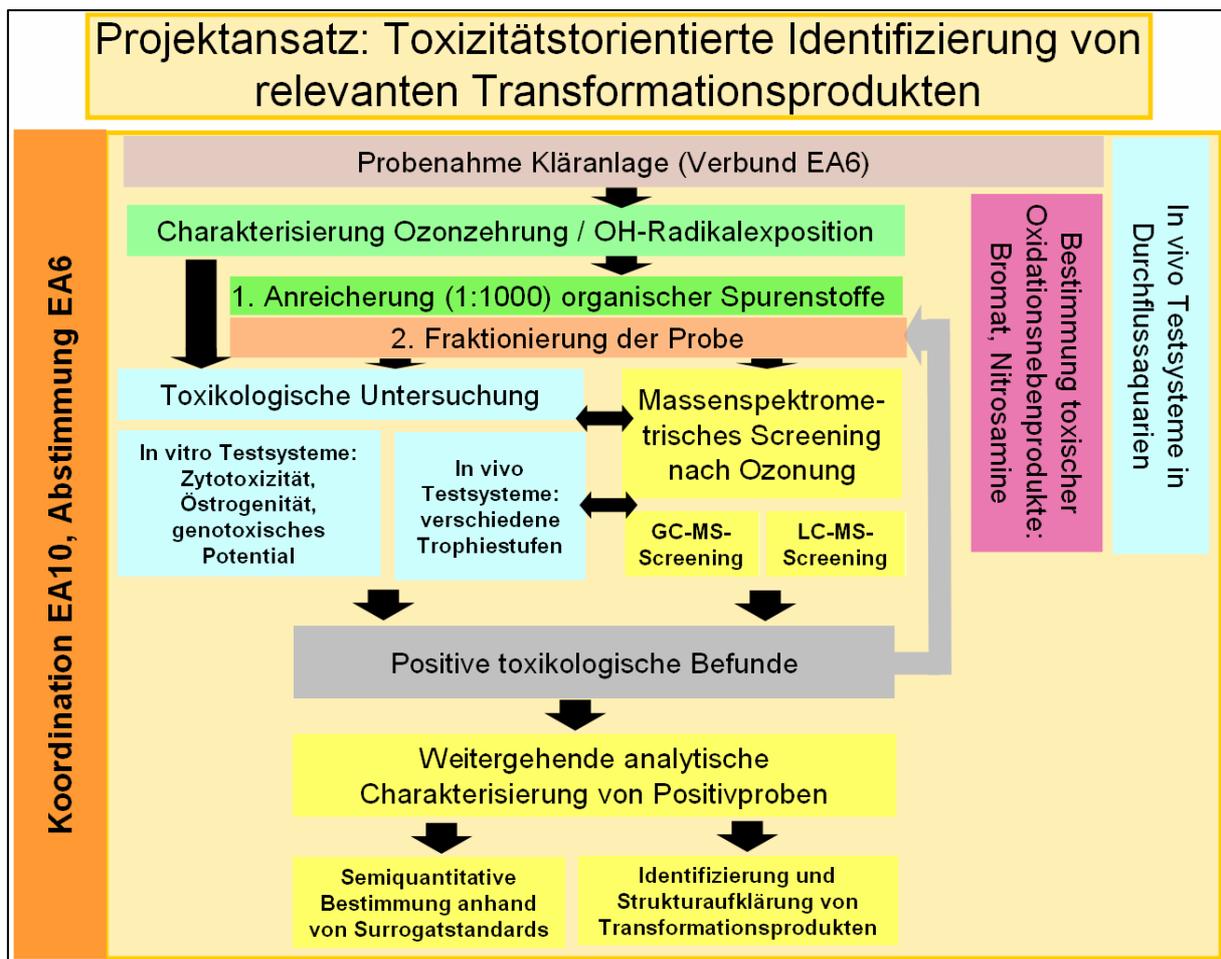


Abbildung 1-1: Schematischer Projektaufbau

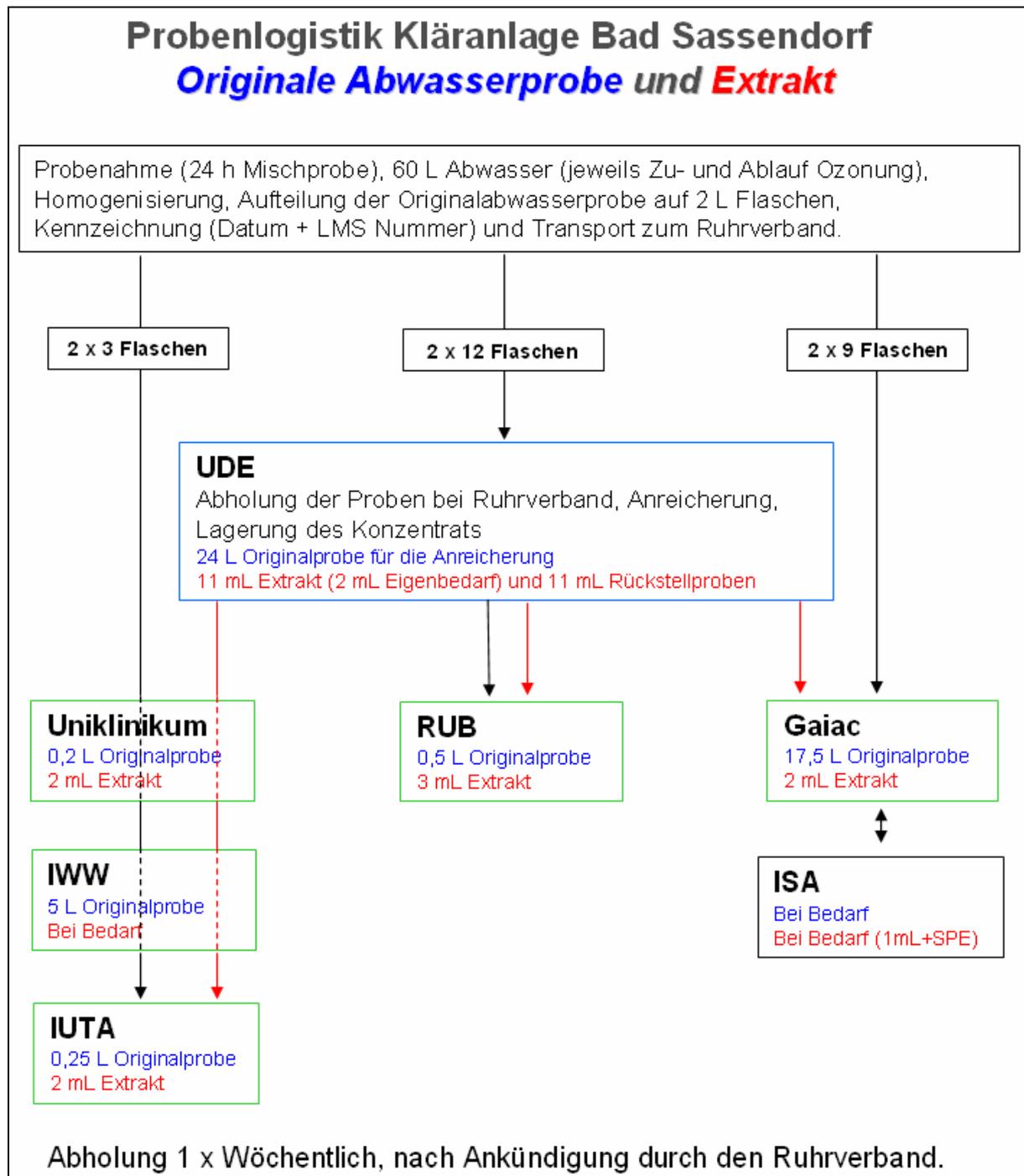


Abbildung 1-2: Schematischer Probenlogistikplan, dargestellt an Probenmaterial der KA Bad Sassendorf

Die Ergebnisse wurden auf regelmäßig stattfindenden Projekttreffen vorgestellt und gemeinsam besprochen. Das weitere Vorgehen erfolgte stets in Abstimmung mit den Kläranlagenbetreibern und wurde durch das LANUV begleitet.

2 Projektverlauf

2.1 Überblick

Organische Substanzen in den entnommenen Abwasserproben werden mittels Festphasenextraktion um den nominellen Faktor 1000 angereichert (AP 1.1), um eventuell gebildete Transformationsprodukte effizienter zu identifizieren und ggf. störende Abwassermatrix zu minimieren. Die so erhaltenen Rohextrakte werden anschließend toxikologisch von der RUB, dem Uniklinikum Essen und der Gaiac (AP 7 – 9.1) untersucht. Parallel erfolgt eine orientierende Charakterisierung mittels massenspektrometrischen GC- und LC-MS-Screening an der Universität Duisburg-Essen sowie am IUTA (AP 4). Werden in den Abwasserproben oder den Rohextrakten toxische Effekte gefunden, können Rückstellproben der Rohextrakte fraktioniert (AP 1.2), die Teilfraktionen nochmals toxikologisch untersucht und nach einem wiederholten GC- und LC-MS-Screening am ISA gezielt massenspektrometrisch mittels Messung der akkuraten Massen charakterisiert werden (AP 5). Aus diesen Daten wird am IWW eine semiquantitative analytische Methode entwickelt (AP 6), die im unteren Spurenbereich verwendet werden kann, um das Bildungspotenzial der charakterisierten Transformationsprodukte bei verschiedenen Betriebseinstellungen der Ozonung auf den Kläranlagen zu ermitteln.

Parallel zu diesen Untersuchungen werden am IUTA und im IWW die Bildungspotenziale von Bromat sowie Nitrosaminen (AP 2) im Spurenbereich direkt im Abwasser analytisch erfasst und gemeinsam mit den Spurenanalytikmessungen aus Einzelprojekt 6 ausgewertet. Zudem werden vor Ort auf der Kläranlage *In-vivo*-Tests im Durchflusssystemen von der Universität Frankfurt durchgeführt (AP 9.2), um die Ökotoxizität sowie die endokrine Wirkung über alle Trophiestufen zu betrachten. Schließlich werden am IWW im Labormaßstab die spezifische Ozonzehrung und Hydroxylradikal-Bildung des Abwassers charakterisiert (AP 3), um die Umsetzung refraktärer Verbindungen in ozonbasierten Prozessen bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten schnell und kostengünstig zu simulieren. Die gewonnenen Daten sind auch für den Einzelauftrag MKULNV-EA6 von erheblicher Bedeutung.

2.2 Durchgeführte Untersuchungen auf den Kläranlagen

Die Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Bad Sassendorf wurde dem gesamten toxikologischen und massenspektrometrischen Untersuchungsspektrum unterzogen. Seit Ende Mai 2011 läuft der Probetrieb der Ozonanlage auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden und seit Juli in Schwerte. Auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden wurde 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 zu Ablauf der ersten Phase werden vollständig in der zweiten Projektphase ausgewertet.

2.3 Extraktion und Fraktionierung von Abwasserproben (AP 1)

Die Extraktion der Abwässer zur Anreicherung organischer Stoffe wird benötigt, 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. Innerhalb dieses Projektes wurden zur Extraktion der Proben sogenannte Solid-Phase-Extraction-Disks (SPE-Disks) verwendet. Mit diesen kann die Probenvorbereitung für das gesamte Stoffspektrum von polaren bis unpolaren Substanzen sehr gut abgedeckt werden. Außerdem lassen sich Spurenstoffe, die an Partikeln anhaften, während der Anreicherung mit erfassen und dank des großen Disk-Durchmessers von 47 mm wird eine Verstopfung während der Probenanreicherung vermieden. Dies führt zu einer repräsentativen Anreicherung der Abwasserproben.

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 [1].

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 werden dann einzeln erneut toxikologisch untersucht. Bei weiterhin positiven toxikologischen Befunden werden die entsprechenden Fraktionen noch einmal in 10 Sub-Fraktionen getrennt. Die finalen Sub-Fraktionen werden, wie die vorgeschalteten toxikologisch positiv getesteten Fraktionen, der massenspektrometrischen Charakterisierung mittels GC-MS und LC-MSⁿ (AP 4) sowie der LC mit hochauflösender Massenspektrometrie zugeführt (AP 5).

2.4 Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2)

Bromat ist ein potenzielles Kanzerogen und wird bei der Ozonung bromidhaltiger Wässer gebildet [2]. HOBr (pK_s -Wert 8,8 - 9) dissoziiert bei abwasserüblichen pH-Werten nur in geringem Maße zum Hypobromit-Anion, dass anschließend unter Beteiligung von Ozon und OH-Radikalen über Bromit zu Bromat oxidiert werden kann [3]. Der Trinkwassergrenzwert für Bromat beträgt 10 µg/L [4]. 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 [6]. 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 [7-8]. Die häufigsten in der aquatischen Umwelt gefundenen Vertreter sind N-Nitrosodimethylamin (NDMA) und N-Nitrosomorpholin (NMOR) [7]. 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 [7-9]. Im Ablauf einer großtechnischen Ozonungsstufe zur weitergehenden Abwasserbehandlung in Regensdorf (Schweiz) wurden Nitrosamine und Bromat gefunden [5]. Vor diesem Hintergrund sind Bromat und die Nitrosamine besonders wichtige Stoffgruppen, die innerhalb dieses Projektes untersucht werden.

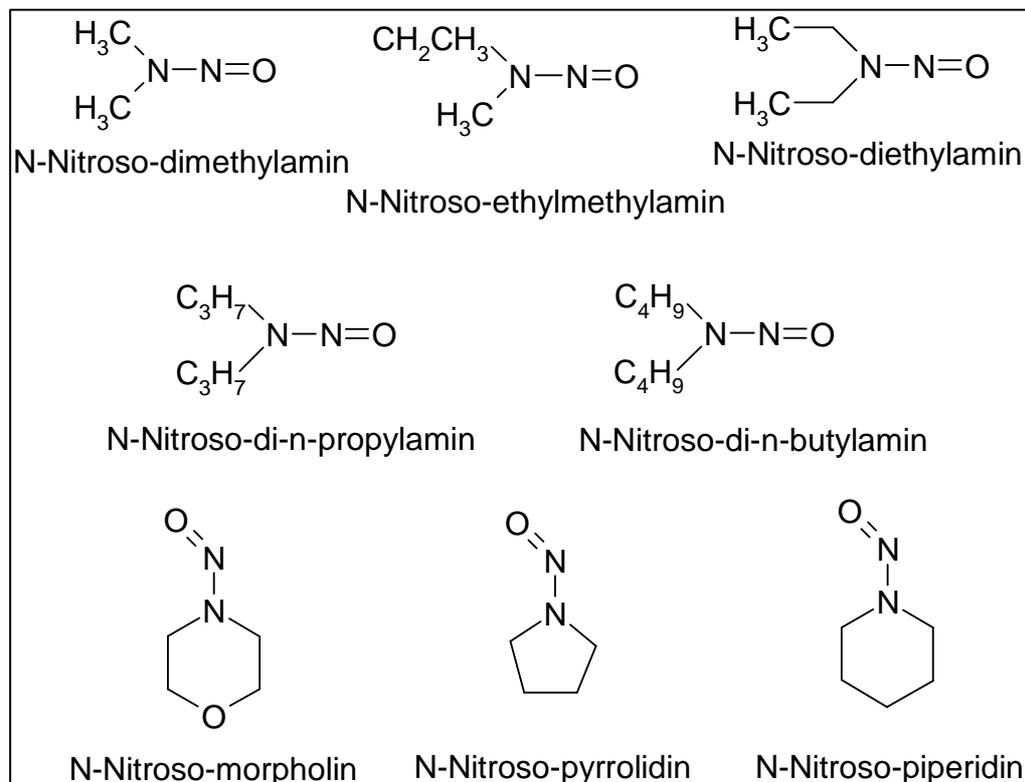


Abbildung 2-1 : Strukturformeln von relevanten Nitrosaminen

2.5 Ozonzehrung und Hydroxylradikalexposition (AP 3)

Beim Abbau des Ozons kann es zur Bildung von Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) kommen [17-20]. Die Hydroxylradikale reagieren unselektiv und sehr schnell mit einer Vielzahl von Verbindungen, über diesen Weg werden viele ozonrefraktäre Stoffe, wie bestimmte Röntgenkontrastmittel oder Pestizide abgebaut [18-21]. Prozesse, die auf Hydroxylradikalreaktionen beruhen, werden Advanced Oxidation Processes (AOP) genannt [18]. 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 [18, 19]. Beispielsweise wird die östrogene Wirkung eines Stoffes durch Ozon effektiv verringert [22]. Vor allem die Rolle des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) hinsichtlich Zehrung des Ozons, Bildung und Abfang von Hydroxylradikalen ist kaum vorhersehbar. Daher sind einfache Laborversuche nützliche Instrumente zur schnellen Charakterisierung der Abwasser ozonung 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. Die Daten wurden innerhalb des parallel verlaufenden Einzelprojektes MKULNV-EA6 „Elimination von Arzneimittelrückständen in kommunalen Kläranlagen“ weitergehend für die Modellierung des Abbaus von Spurenstoffen in Bad Sassendorf herangezogen.

2.6 Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening, Strukturaufklärung und semiquantitative Bestimmung (AP 4-6)

In diesem Arbeitspaket werden in einem ersten massenspektrometrischen Screening die Abwasserextrakte 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 Elektronenstoßionisation (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 und massenspektrometrisch mit einem Hybridmassenspektrometer (Q-TRAP) detektiert und charakterisiert. Hierbei wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) des Vorläufer-Ions der durch 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)MSⁿ-Analysen ($n \geq 2$)) in einem LTQ-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer des ISA analog der bei [10-16] 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 MSⁿ ($n \geq 2$) erzeugten Fragment-Ionen (MS², MS³....) liegen mit exakter Masse vor. Aus dem aufgenommenen Molekülion der Ausgangsverbindung und den ebenso mit exakter Masse registrierten MSⁿ-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 dann 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 die 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.

2.7 *In-vitro*-Untersuchungen (AP 7 und 8)

Im Rahmen dieses Projekts sollen toxikologisch relevante Endpunkte im Hinblick auf eine mögliche akute Exposition durch während der Ozonung entstandene Transformationsprodukte auf den Menschen untersucht, zusammengestellt und toxikologisch bewertet werden. Hierbei werden *In-vitro*-Methoden für die akut toxische Wirkung verwendet, die Auskunft über die allgemeine Toxizität (Zytotoxizität) sowie die Östrogenität (ER Calux) der getesteten Abwasserproben geben (AP 7). Genotoxische Wirkungen werden auf der prokaryotischen (bakterieller Mutagenitätstest) und eukaryotischen Ebene (Comet-Assay in Zellkultur mit humanen Hepatozyten) in AP 8 untersucht.

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 östrogenener 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 (AP 8). Der Ames-Test ist ein standardisiertes Versuchsverfahren zur genotoxikologischen Bewertung von Abwasserproben nach DIN 38415-4 [27]. Aktuelle Studien belegen sowohl seine Eignung zur Untersuchung ozonbehandelter Abwasserproben [28] als auch zur Bestimmung des genotoxischen Potenzials von Desinfektionsnebenprodukten wie NDMA [29]. Der Comet-Assay ist ein empfindliches Verfahren zum Nachweis von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA sowie alkali-labiler Stellen [33]. In einer aktuellen Studie wurde die Induktion von DNA-Schäden im Comet-Assay durch Abwasserproben eines Krankenhauses bei verschiedenen Abwasserbehandlungsmaßnahmen gezeigt [30].

2.8 *In-vivo*-Untersuchungen (AP 9)

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 [42, 44]. Auch konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch bestimmte nicht genotoxische Substanzen (Perfluorooktansulfonsäure), die Membraneigenschaften von Zellen so verändert werden können, dass genotoxische und Dioxin-ähnliche Stoffe besser in die Zellen eindringen können und eine verstärkte Wirkung zeigen konnten [45]. 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. Mit den eindeutig interpretierbaren Standardverfahren erhält man die Information einer Momentanaufnahme der jeweiligen Abwassersituation. Durch Kombination mit der integrativen Erfassung der Wirkung aller potenziell toxischen Inhaltsstoffe auf die Organismen in den Durchflusssystemen kann eine umfassende Bewertung des ökotoxikologischen Potenzials von Transformationsprodukten vorgenommen werden. Dazu ist es sinnvoll, wie in der ökotoxikologischen Risikobewertung üblich, Vertreter aller trophischer Ebenen zu untersuchen. Diese werden in Standardtestverfahren eingesetzt, die bereits in der Untersuchung von Abwässern und/oder von Chemikalien etabliert sind und für die internationale Testvorschriften vorliegen.

3 Experimentelles

Im Folgenden werden die Kläranlagen und die errichteten Ozonanlagen in Duisburg-Vierlinden, Bad Sassendorf und Schwerte genauer beschrieben.

3.1 Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Duisburg-Vierlinden

Die mechanisch-biologische Kläranlage Duisburg-Vierlinden ist für die Behandlung des Abwassers von ca. 30.000 E ausgelegt.

Ein Einlaufhebewerk fördert das ankommende Abwasser aus dem Kanalnetz in die mechanische Behandlungsstufe der Kläranlage. Die mechanische Behandlung beinhaltet zunächst eine Rechenanlage, wo grobe Stoffe aus dem Abwasserstrom herausgesiebt werden. Hiernach folgen ein belüfteter Fett- und Sandfang sowie die Vorklärung. Nach der mechanischen Behandlung des Abwassers wird es in die biologische Stufe geführt.

Die biologische Stufe besteht aus den Becken zur biologischen Reinigung, in Duisburg-Vierlinden ausgeführt als zweistraßige Denitrifikation und vierstraßige Nitrifikation sowie zwei Nachklärbecken zur Feststoffseparation. Der in der Vorklärung anfallende Primärschlamm und der aus der biologischen Reinigung anfallende Überschussschlamm, werden in den Zulauf zur Vorklärung gefördert, in zwei Voreindickern zur Sedimentation gepumpt und anschließend im Faulbehälter (Volumen 1.500 m³) anaerob stabilisiert. Danach wird der Faulschlamm in zwei Nacheindickern (Volumen je 110 m³) zwischengespeichert und mit Hilfe einer Zentrifuge maschinell entwässert. Das durch die Entwässerung erheblich verringerte Schlammvolumen wird anschließend entsorgt. Das bei der Schlammbehandlung anfallende Trübwasser wird kontrolliert in den Abwasserbehandlungsprozess zurückgeführt. Das anfallende Faulgas wird energetisch verwertet.

Die Ozonanlage wurde im Ablauf der Nachklärung errichtet (siehe Abbildung 3-1). Sie besteht aus zwei parallelen Straßen, einer Injektorstraße, und einer Diffusorstraße. In der Diffusorstraße wird das Ozon mittels Keramikdiffusoren in das zu behandelnde Wasser eingetragen, in der Injektorstraße wird das Ozon in den Zulauf zum Reaktorbecken mittels Pumpe und Injektor eingemischt. In der Injektorstraße wurde eine zusätzliche biologische Nachbehandlung (Wirbelbettreaktor) des ozonierten Abwassers errichtet. Es besteht die Möglichkeit, die Ozonanlage über eine Bypass-Steuerung dem bestehenden Abwasserreinigungsprozess hinzu- bzw. aus diesem herauszuschalten.

Auslegung und Beschreibung der Komponenten der Ozonanlage

Die Ozonanlage wurde wie folgt ausgelegt:

- Der maximale Zufluss zur Ozonanlage wurde auf den maximalen Trockenwetterabfluss (400 m³/h) begrenzt. Darüber hinaus gehende Wassermengen (die Kläranlage Duisburg Vierlinden ist auf maximal 800 m³/h ausgelegt) werden in der Ozonanlage vorgeschalteten Trennschacht direkt zur Einleitungsstelle abgeführt.
- Die Volumina der Ozonreaktorbecken (Nettovolumen von 100 m³ je Straße) gewährleisten eine Aufenthaltszeit von 30 Minuten. Die Maße der Ozonreaktorbecken betragen 6,67 m x 3,00 m x 5,00 m (Länge x Breite x Tiefe).
- Der Auslegung der Ozonanlage sind DOC-Werte von 4 - 8 mg DOC/L zu Grunde gelegt. Das spezifische Verhältnis z (g Ozon / g DOC) ist variierbar zwischen 0,4 und 1,2.
- Jede der beiden Straßen verfügt über eine Ozonerzeugungsanlage. Die Erzeugung des Ozons erfolgt aus Reinsauerstoff, der über einen Reinsauerstofftank mit nachgeschaltetem Verdampfer zur Verfügung gestellt wird.
- Jede der zwei Straßen ist unabhängig regelbar und kann daher gleichzeitig mit unterschiedlichen Einstellungen gefahren werden.

In der Abbildung 3-1 ist das Verfahrenschema der KA Duisburg-Vierlinden und der Ablaufozonung dargestellt.

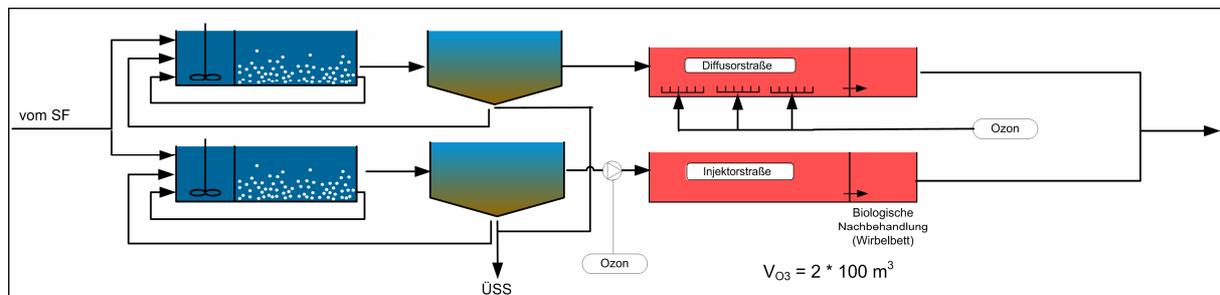


Abbildung 3-1: Fließschema der KA Duisburg-Vierlinden. ÜSS: Überschussschlamm, SF: Sandfang

Die Regelung der Ozonzugabemengen erfolgt über die Zuflusswassermenge in die jeweilige Straße. Alternativ besteht die Möglichkeit eine frachtgesteuerte Regelung über die DOC-Konzentration des Abwassers im Zulauf einzusetzen. Hierfür steht ein DOC-Online-Messgerät zur Verfügung. Weitere Regelungsmöglichkeiten bestehen über das Restozon im Offgas und im Ablauf der Ozonanlage.

3.2 Ozonanlage und Anlage zur Pulveraktivkohledosierung auf der kommunalen Kläranlage Schwerte

Die Kläranlage Schwerte des Ruhrverbandes besitzt eine Ausbaugröße von 50.000 E. Der maximale an der Kläranlage aufnehmbare Mischwasserzufluss beträgt 640 L/s, dies entspricht dem zweifachen des Trockenwetterzuflusses. Bei Einmündung in die Kläranlage passiert das Wasser zunächst die mechanische Reinigungsstufe bestehend aus einem Filterstufenrechen (Spaltweite 6 mm), einem zweistraßigen Langsandfang und einer einstraßigen Vorklärung mit einem Volumen von 450 m³. Die biologische Abwasserreinigung erfolgt nach dem Prinzip der vorgeschalteten Denitrifikation in zwei verfahrenstechnisch völlig trennbaren Belebungsbeckenstraßen mit einem Beckenvolumen von jeweils rund 7.800 m³. Die Phosphorelimination ist als chemische Simultanfällung mit Fe(III)Cl₃ ausgeführt. Um das Aufkommen von Fadenbildnern zu begrenzen, wird bedarfsweise temporär Pulveraluminiumchlorid (PAC) dosiert. Die Belebungsbeckenstraßen bestehen aus kaskadierten Denitrifikations- und Nitrifikationsbecken sowie einem runden, horizontal durchströmten Nachklärbecken. Das biologisch gereinigte Abwasser wird in die Ruhr eingeleitet. Die Errichtung der großtechnischen Versuchsanlage zur oxidativen und/oder adsorptiven Behandlung des biologisch gereinigten Abwassers auf der KA Schwerte ermöglicht mehrere Versuchseinstellungen im Rezirkulationsbetrieb (s. Abbildung 3-2):

- Pulveraktivkohleadsorption im Ablauf der Nachklärung und Rückführung in den Zulauf der Nachklärung bzw. in den Zulauf der Belebungsstufe
- Ozonung und Pulveraktivkohleadsorption im Ablauf der Nachklärung und Rückführung in den Zulauf der Nachklärung bzw. in den Zulauf der Belebungsstufe
- Ozonung im Ablauf der Nachklärung und Rückführung in den Zulauf der Nachklärung bzw. in den Zulauf der Belebungsstufe
- Ozonung im Ablauf der Nachklärung als nachgeschaltetes Verfahren

Im Rezirkulationsbetrieb wird der behandelte Teilstrom in die biologische Reinigungsstufe zurückgeführt und somit der Zulaufvolumenstrom der Versuchsanlage durch die hydraulische Kapazität der Nachklärung limitiert. In Abhängigkeit des Kläranlagenzulaufs gilt: $Q_{\text{zuPAK,max.}}(t) = 320 \text{ L/s} - 0,5 \cdot Q_{\text{zuKA}}(t)$. Dies bedeutet, dass die Nachklärung auf der Straße 2 infolge des Rezirkulationsbetriebs auch bei Trockenwetter nahezu konstant mit der dem Mischwasserzufluss entsprechenden Wassermenge beschickt wird. Für die adsorptive Behandlung stehen drei Reaktionsbehälter mit einem Volumen von jeweils 150 m³ zur Verfügung. Die Pulveraktivkohledosierung in den Abwasserstrom erfolgt im Zulauf der Adsorptionsstufe. Bei einer Bemessungsleistung im Rezirkulationsstrom von 250 L/s beträgt

die Aufenthaltszeit in den drei Reaktionsbehältern 30 Minuten. In der Adsorptionsstufe besteht im Rahmen der Untersuchungen die Möglichkeit, Aufenthaltszeit und Aktivkohledosierung in einem weiten Bereich zu variieren.

Als nachgeschaltete Betriebsvariante kann eine Ozonierung des Ablaufs der Nachklärung durchgeführt werden.

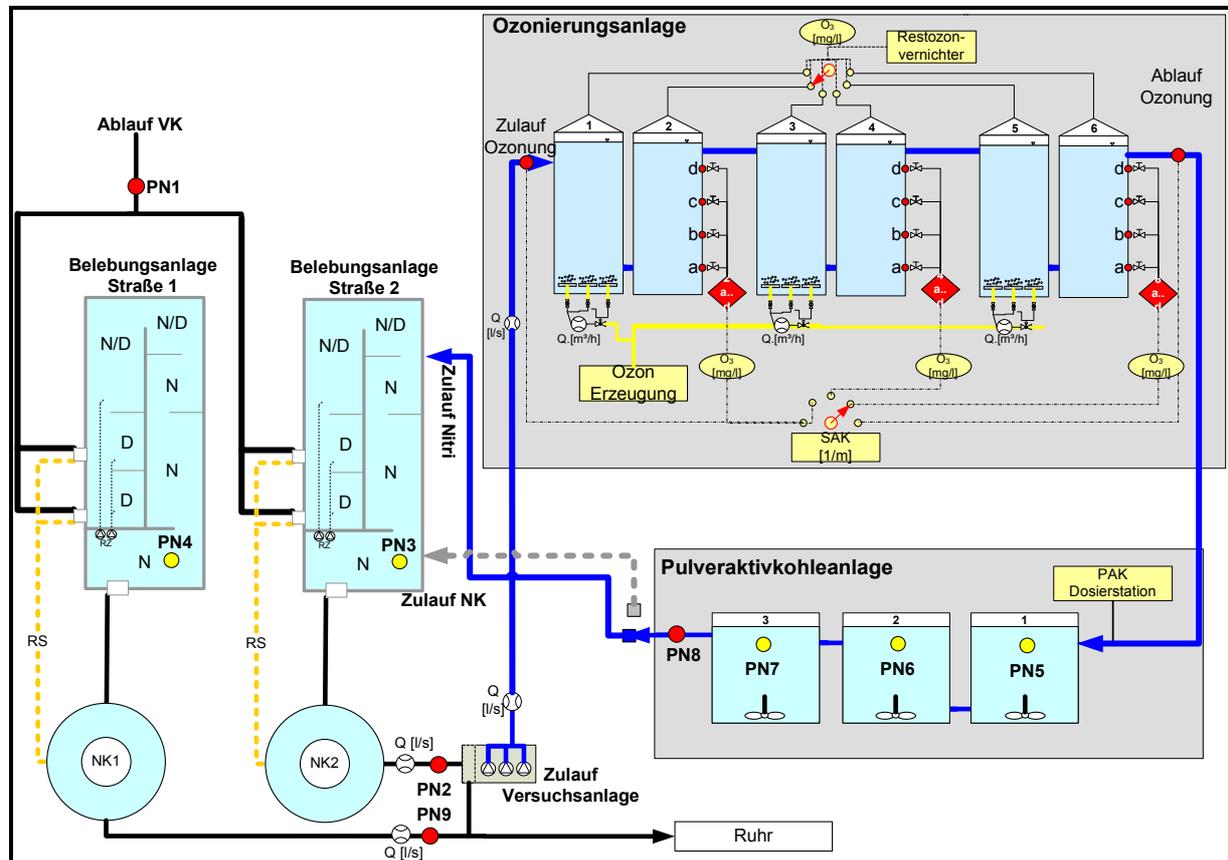


Abbildung 3-2: Fließschema der großtechnischen Versuchsanlage der KA Schwerte. PN: Probenahmestellen, VK: Vorklärung, NK: Nachklärung, N: Nitrifikation, D: Denitrifikation, PAK: Pulveraktivkohle

Hierfür stehen sechs Reaktoren mit einem Reaktorvolumen von jeweils 32 m^3 , von denen drei Reaktoren mit Keramikbelüftern für den Ozoneintrag ausgestattet sind, zur Verfügung. Eine Ozonkonzentration von 10 mg/L ist bei Trockenwetterzufluss möglich. Aufenthaltszeit und der Ozoneintrag im Versuchsbetrieb können über einen weiten Bereich variiert werden.

3.3 Ozonanlage auf der kommunalen Kläranlage Bad Sassendorf:

Die KA Bad Sassendorf ist eine mechanisch-biologische Kläranlage, die für die Behandlung des Abwassers von ca. 13.000 E ausgelegt ist. Das Einzugsgebiet der Kläranlage (die Gemeinde Bad Sassendorf) hat bei ca. 12.000 Einwohnern und 1.200 Betten in 6 Klinken einen sehr hohen Anteil an Klinikabwasser. Das Durchschnittsalter liegt signifikant über dem Landesdurchschnitt, aufgrund des demografischen Wandels wird eine ähnliche Altersstruktur im übrigen NRW erst in 30 bis 40 Jahren erwartet. Das Abwasser im Zulauf der KA Bad Sassendorf ist kommunal geprägt und weitgehend frei von industriellen Einflüssen.

Die Ozonanlage in Bad Sassendorf wurde im Ablauf der Kläranlage nach der Nachklärung errichtet und ist für eine Aufenthaltszeit von 13 min im Ozonreaktorbecken auf eine Wassermenge von 300 m³/h (entspricht dem Trockenwetterzufluss) ausgelegt. Auf eine Auslegung auf den Spitzenzufluss der Kläranlage wurde im Hinblick auf den Pilotstatus der Anlage verzichtet, zumal von einer Verdünnung des Abwassers bei hoher hydraulischer Belastung auszugehen ist. Die Wassermenge wird durch eine magnetisch-induktive Durchflussmessung erfasst und durch einen Schieber automatisch geregelt. Die überschüssige Wassermenge wird über eine Wehrschwelle direkt zum Kläranlagenablauf geleitet. Die hydraulische Kapazität der Rohrleitungen erlaubt es, auch den Spitzenzufluss der Kläranlage (650 m³) durch die Ozonanlage laufen zu lassen, aufgrund der begrenzten Kapazität des Ozonreaktorbeckens führt dies jedoch zu einer verkürzten Aufenthaltszeit.

In Abbildung 3-3 ist das Verfahrenschema der KA Bad Sassendorf und der Ablaufozonung dargestellt.

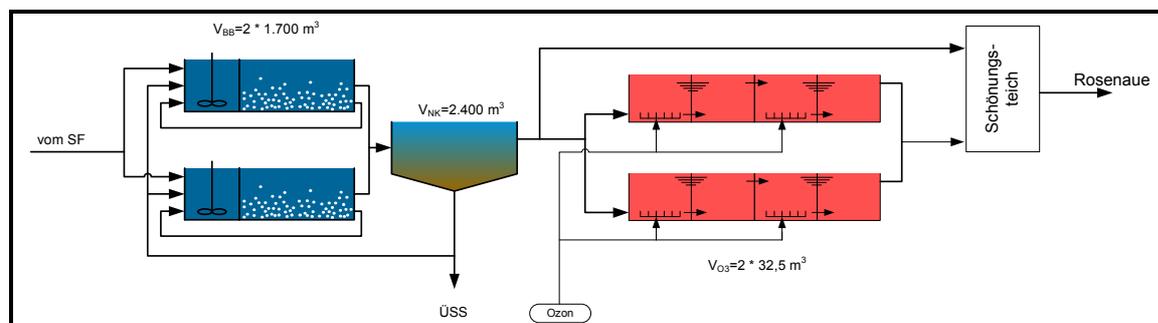


Abbildung 3-3: Verfahrensschema der KA Bad Sassendorf. ÜSS: Überschussschlamm, SF: Sandfang

Das aus der Nachklärung ankommende behandelte Abwasser wird zunächst in einen abgedeckten Mischbehälter geleitet, in dem sich durch entsprechende Gestaltung des Reaktors eine Pfropfenströmung ausbildet. Das Becken ist zweistraßig konstruiert und besitzt ein Gesamtvolumen von 65 m³. Die Aufenthaltszeit des Abwassers im Mischbecken beträgt etwa 13 min bei der Auslegungswassermenge von 300 m³/h. Durch Sollwertvorgabe für die Wassermenge sowie durch Umfahren einer der beiden Straßen kann die Reaktionszeit im Becken in weiten Grenzen variiert werden. Eine hydraulische

Beaufschlagung des Beckens mit bis zu 650 m³/h (Regenwetterabfluss) ist wie bereits weiter oben beschrieben möglich, und wurde bei entsprechenden Wetterlagen auch erprobt. Aufgrund der hydraulisch günstigen Verhältnisse vor Ort muss das Wasser nicht gepumpt werden, die gesamte Anlage wird im freien Gefälle durchflossen. Der Eintrag des Ozons erfolgt durch Keramik-Diffusoren an der Beckensohle. Der Ozongenerator ist für Dosierungen zwischen 5 und 20 mg O₃/L ausgelegt. Nach der Ozonbehandlung wird das Abwasser dem vorhandenen Schönungsteich zugeführt, hier können ggf. die im Ablauf der Ozonung enthaltenen Restprodukte weiter biologisch abgebaut werden.

In Bad Sassendorf besteht sowohl die Möglichkeit einer mengenproportionalen Ozondosierung als auch einer Dosierung nach dem SAK-Wert, der im Zu- und Ablauf der Anlage mittels einer SAK-Sonde bei einer Messwellenlänge von 254 nm gemessen wird. Diese beiden Ozoneintragstrategien wurden in Bad Sassendorf miteinander hinsichtlich ihrer Effektivität beim Spurenstoffabbau verglichen. Nachfolgend werden die auf der Anlage in Bad Sassendorf durchgeführten Versuche näher beschrieben.

Die verwendeten Betriebszustände der Ozonanlage in Bad Sassendorf wurden im Rahmen des Teilprojekts MKULNV-EA6 definiert und eingestellt. Nach Erreichen der stationären Betriebsbedingungen der Ozonanlage wurde mit der Probenahme gewartet, bis Trockenwetter über die jeweiligen zwei Probenahmetage herrschte. Die Betriebsparameter der Ozonung können der Tabelle 3-1 entnommen werden. 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.. Beprobt wurde der Zu- und Ablauf der Ozonanlage. Tabelle 3-1 enthält das jeweilige Probeentnahmedatum. Die entnommenen 60 L Zulauf und Ablauf wurden nacheinander in einem 100-L-Edelstahlbehälter homogenisiert und in 2-L-Steilbrustflaschen abgefüllt. Die Flaschen wurden etikettiert, zentral beim Ruhrverband gesammelt und auf die jeweiligen Projektpartner innerhalb von 2 Tagen anhand des aufgestellten Probenlogistikplans (Abbildung 1-2) aufgeteilt. Die Proben wurden bei der Lagerung im Ruhrverband und während des gesamten Transports zu dem jeweiligen Projektpartner gekühlt. Parallel dazu wurden ab der Dosierung von 5 mg/L Ozon die Untersuchungen in Durchflusssaquarien über einen Zeitraum von vier Wochen direkt auf der Anlage durchgeführt.

Tabelle 3-1: Betriebszustände der Ozonanlage in Bad Sassendorf

Probeentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Abwasser-zulauf	Applizierte Ozon-Dosis [mg/L O ₃]	Z _{Spezifisch} [mgO ₃ /mg DOC]	Temperatur [°C]
19. - 20. 10. 2010	2 mg O ₃ /L Q-Regelung	> 400 m ³ /h	1,89	0,34	15,8
02. - 03. 11. 2010	2 mg O ₃ /L, SAK-Regelung	≤ 400 m ³ /h	2,42	0,38	15
17. - 18. 11. 2010	5 mg O ₃ /L, Q-Regelung	≤ 400 m ³ /h	4,01	0,91	13,5
22. – 23. 11. 2010	5 mg O ₃ /L, SAK-Regelung	≤ 400 m ³ /h	4,89	1,02	13,25
07. – 08. 02. 2011	2 mg O ₃ /L, Q-Regelung	≤ 400 m ³ /h	1,78	0,35	10,75

3.4 Fraktionierung und Anreicherung der Abwässer (AP 1)

3.4.1 Anreicherung

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte

Material/Gerät	Firma
Wasser HPLC grade	J.T. Baker
Methanol HPLC grade	Merck
Ethylacetat	Merck
DVB-SPE-Disk	J.T. Baker
Remote-Sample-Adapters	ICT
Büchi-Syncore-Einheit	Büchi Switzerland

Die Festphasenextraktion wurde mittels DVB-Polymer-Extraktionsscheiben durchgeführt. Die Extraktionsscheiben wurden mit jeweils 20 mL Methanol konditioniert und mit 20 mL Wasser nachgespült. Im nächsten Schritt wurden die Extraktionsscheiben mit Wasser konditioniert, die 1-L-Proben mittels des Remote-Sample-Adapters mit einem Fluss von max. 200 mL/min über das Festphasenmaterial gesaugt und anschließend mit 20 mL Wasser gewaschen. Das Volumen der Wasserproben wurde gravimetrisch überprüft. Die Elution erfolgte zunächst mit 15 mL Ethylacetat, dann mit 15 mL Methanol. Beide Lösungsmittel wurden über die Festphase geleitet und in einer 30-mL-Braunglasflasche aufgefangen.

Aufarbeitung der Extrakte

Das vereinigte Extrakt wurde in einem Büchi-Glas mit Hilfe der Büchi-Syncore Einheit (80 °C, 70 mbar, 200 rpm) auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt. Anschließend erfolgte ein Lösungsmittelwechsel auf Methanol. Hierzu wurde das eingeeengte Extrakt zweimal mit 20 mL Methanol versetzt, auf 1 mL eingeeengt und in ein HPLC-Vial überführt.

3.4.2 Fraktionierung

Die Fraktionierung erfolgte mittels eines Fraktionssammlers unter den folgenden

Gerätebedingungen:

Säule : Phenomenex Synergi 4µm Polar-RP 80A
75 x 4,6 mm
Fluss : 1 mL/min
Laufmittel : Wasser, Methanol

Tabelle 3-3: Verwendete Einstellungen

Zeit	% A (Wasser)	% B (Methanol)
0-2 min	100 %	0 %
2-15 min	Linear von 100 % auf 0 %	Linear von 0 % auf 100 %
15-22 min	0 %	100 %
22-25 min	Linear von 0 % auf 100 %	Linear von 10 0% auf 0 %
25-30 min	100 %	0 %

HPLC Läufe je Fraktionszyklus : 10
Injektionsvolumen je Lauf : 100 µL
Fraktionierungsdauer : 0 min bis 30 min
Fraktionen : 10
Fraktionsdauer je Fraktion : 3 min
Volumen je Fraktion pro Injektion : 3 mL
Endvolumen je Fraktion : 30 mL

Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und getrennt eingeeengt. Der vereinigte Extrakt wurde mit Hilfe der Büchi-Syncore-Einheit mittels eindampfen auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt. Anschließend erfolgte ein Lösungsmittelwechsel auf Methanol.

3.5 Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2)

3.5.1 Bestimmung von Bromat

Die Bestimmung von Bromat aus den originalen Abwasserproben wurde durch eine Filtration mit anschließender Ionenchromatographie realisiert. Die Filtration ist mittels Ba/Ag/H-Kartuschen der Firma Dionex GmbH (Idstein, Germany) durchgeführt worden. Zur Konditionierung der Kartuschen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Das Filtrat wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt injiziert. Die Bedingungen der Ionenchromatographie waren wie folgt:

Tabelle 3-4: Systemparameter der Ionenchromatographie

Gerätebezeichnung:	Metrohm Compact IC 761
Säule:	6.1006.530 Metrosep A SUPP 5 – 250
Vorsäule:	6.1006.500 Metrosep A SUPP 4/5 Guard (on-column)
Eluent:	1,0 mmol/L Natriumhydrogencarbonat 3,2 mmol/L Natriumcarbonat
Suppressor:	Metrohm Suppressor Module (MSM, 50 mmol/L H ₂ SO ₄)
Fluss des Eluenten:	0,8 mL/min
Fluss der Regenerationslösung des Suppressors:	0,8 mL/min
Injektionsvolumen	1000 µL
Automatisches Injektionssystem:	Metrohm 813 Compact Autosampler mit einer Kapazität von 36 Probengefäßen jeweils 15 mL Nutzvolumen
Injektionsprogramm:	1) 3 Minuten zur Einstellung der Grundleitfähigkeit 2) Injektionsnadel herunterfahren 3) Spülen der Probenschleife für 5,5 Minuten 4) Starten der Messung durch Injektion der Probe
Laufzeit der Detektion:	40 min.
Messbereich des Detektors:	0-50 µS/cm
Arbeitsdruck:	12-13 MPa

3.5.2 Bestimmung von Nitrosaminen

Tabelle 3-5: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte / Materialien	Firma
Festphasenextraktionskartuschen, Bakerbond Carbon (1 g Aktivkohle)	Baker
Absaugstation	Baker
Gaschromatograph mit automatischem Probengeber, MSD, temperaturgesteuerter Injektor, Kapillarsäule (J&W DB1701 I.D. 0.250 mm x 30 m; Filmdicke 0,250 µm)	Agilent 6890, 5973 Gerstel, Agilent
Turbo Vap	Zymark
Mikroliterspritzen	Hamilton
Vollpipetten	Brand
Messkolben	Brand
Rollrandgläschen und Mikroeinsätze, Bördelkappen (PTFE-beschichteten Septen)	Verschiedene Hersteller
Stickstoff (5.0)	Air Liquide

Tabelle 3-6: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
Dichlormethan (zur Rückstandsanalyse)	LGC Promochem
Aceton (zur Rückstandsanalyse)	LGC Promochem
Methanol (zur Rückstandsanalyse)	LGC Promochem
Natriumsulfat zur Analyse (98 %)	Merck
Reinstwasser (durch Aktivkohle vorgereinigtes Trinkwasser)	
Referenzsubstanzen (> 98 %)	Verschiedene Hersteller

Die Abwasserproben wurden stets kühl und lichtgeschützt bei einer Temperatur von 4 bis 8 °C gelagert, innerhalb von vier Tagen aufgearbeitet und gemessen. In jeder Messequenz wurde ein Blindwert sowie der Zulauf und Ablauf der Ozonungsanlage analysiert. Die zu untersuchenden Substanzen wurden aus einem Liter Abwasser mittels Festphasenextraktion

(SPE) unter Verwendung von 1 g Aktivkohle angereichert, mit Dichlormethan eluiert und unter Stickstoffstrom bei 30 °C auf exakt 1 mL aufkonzentriert. Die folgende Prozedur wurde bei der Anreicherung ausgeführt:

- Konditionierung der Festphasenextraktionskartuschen:
Die Aktivkohle in den Kartuschen wurde jeweils mit 4 x 2 mL Dichlormethan und anschließend mit 4 x 2 mL Methanol gewaschen. Im Anschluss wurde 8 x 2 mL Reinstwasser aufgegeben.
- Probenaufgabe:
Die Abwasserproben (1000 mL) wurden mittels Unterdruck in etwa 60 Minuten durch die konditionierten Kartuschen gesaugt. Anschließend wurde das Sorbens 10 Minuten im Luftstrom getrocknet.
- Elution:
Das Phasenmaterial wurde mit 6 x 2 mL Dichlormethan eluiert. Das Eluat wurde über 7 g Natriumsulfat filtriert, auf ca. 0,8 mL eingeeengt und quantitativ in einen 1-mL-Messkolben überführt. Der Messkolben wurde mit Dichlormethan bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach Durchmischung wurde das Eluat in ein Rollrandgläschen überführt, mit einer Bördelkappe verschlossen und bis zu der gaschromatographischen Messung im Kühlschrank (bei ca. 4 bis 8 °C) lichtgeschützt aufbewahrt.

Die analytische Messung erfolgte an einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem Quadrupol-Massenspektrometer. Zur Messung wurde ein temperaturprogrammierter Injektor (Kaltaufgabesystem) verwendet. Die Kapillarsäule (J&W DB1701) besaß eine Filmdicke von 0,250 µm. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL und wurde bei einer Anfangstemperatur des Kaltaufgabesystems von 50 °C aufgegeben. Die Aufheizrate war 12 °C/s und wurde bei einer Temperatur von 280 °C für 4 min gehalten. Die Injektion erfolgte splitlos in den Gaschromatographen, das Temperaturprogramm war wie folgt ausgewählt: 50 °C wurden für 2 min gehalten und anschließend mit 10 °C/min auf 280 °C aufgeheizt. Die Detektion der Substanzen erfolgte im selektiven und sensitiven Selected-Ion-Mode (SIM). Die ausgewählten Masse-zu-Ladungsverhältnisse für die Quantifizierung und Identifizierung sind in der Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-7: Ausgewählte Molekül- und Fragment-Ionen die für die Identifizierung und Quantifizierung (fett gedruckte Massenzahlen) der Nitrosamine verwendet wurden.

Bezeichnung	Quantifizierungs- und Identifizierungsmassen m/z			
N-Nitroso-dimethylamin	74	43	42	
N-Nitroso-ethylmethylamin	88	43	42	
N-Nitroso-diethylamin	102	44	42	
N-Nitroso-di-n-propylamin	70	130	43	
N-Nitroso-morpholin	116	86	56	
N-Nitroso-pyrrolidin	100	42	41	
N-Nitroso-piperidin	114	55	42	
N-Nitroso-di-n-butylamin	84	158	116	41

3.6 Ozonzerung und Hydroxylradikalexposition (AP 3)

Der Ozonabbau wurde mit der Indigomethode [23] gemessen, bei der die Ozonkonzentration photometrisch anhand des Ausbleichens von Indigotrisulfonat ermittelt wird. Das OH-Radikalbildungspotential wurde durch den Abbau von 4-Chlorbenzoesäure (pCBA) bestimmt und mittels Flüssigchromatographie und UV-Detektion (HPLC-UV) analysiert. 4-Chlorbenzoesäure reagiert kaum mit Ozon, jedoch rasch mit OH-Radikalen (k_{O_3} : $0,15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, k_{OH} : $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und ist damit ein gängiger OH-Radikalindikator [24].

Anhand des Abbaus von pCBA kann die Hydroxylradikalexposition ($\int [OH] dt$ [Mxs]) berechnet werden, was die Prognose des Abbaus anderer Spurenstoffe erlaubt, sofern die entsprechenden kinetischen Konstanten (k [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]) bekannt sind (siehe Gleichung 1).

$$\ln\left(\frac{c}{c_0}\right) = -k_{OH} \int [OH] dt \quad \text{Gleichung 1}$$

c : Konzentration eines Spurenstoffes zu einem bestimmten Zeitpunkt

c_0 : Startkonzentration eines Spurenstoffes

k_{OH} : Kinetische Konstante für die Reaktion eines Spurenstoffes mit OH-Radikalen [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]

Die OH-Radikalexposition wird anhand des Abbaus von pCBA bestimmt. Dazu wird die Gleichung 1 umgestellt zu:

$$\int [OH] dt : \text{Hydroxylradikalexposition [Mxs]} \quad \text{Gleichung 2}$$

Eine Übersicht der verwendeten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 3-8, Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10 aufgeführt.

Tabelle 3-8: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
UV/VIS-Photometer	UV-1650PC	Shimadzu
Ozongenerator	Philaqua	BMT Messtechnik GmbH
pH-Meter	827 pH lab	Metrohm

Tabelle 3-9: Übersicht der HPLC-UV-Komponenten

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Druckpumpe	LC-20 AT	Shimadzu
UV-Detektor	SPD-20A	Shimadzu
Säulenofen	CTO-10AS VP	Shimadzu
Autosampler	SIL-20 A	Shimadzu
Trennsäule	Nucleosil 100; C18; 5 μm 250x5mm	Macherey-Nagel

Tabelle 3-10: Übersicht verwendeter Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit
4-Chlorbenzoesäure	Aldrich	99 %
Tri-Kalium-Indigotrisulfonat	Riedel-de Haën	85 %
Natriumhydroxid	VWR	min. 99 %
Salzsäure 37 %	Merck	p.a.
Methanol	Sigma Aldrich	min. 99,9 %

Ozonstammlösung

Das für den Versuch benötigte Ozon wurde mittels eines Ozongenerators aus reinem Sauerstoff hergestellt. Das ozonhaltige Gas wurde in einer Waschflasche durch eisgekühltes Reinstwasser geleitet. Dabei kam es nach ca. 30-45 min zu einer Sättigung der Lösung mit Ozon. Bei einer kontinuierlichen Gasversorgung bleibt die Ozonkonzentration in der wässrigen Phase konstant und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1-cm-Quarzküvette bestimmt (Dreifachbestimmung; Extinktionskoeffizient von Ozon: $3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Indigomethode

Um die Kinetik des Ozonabbaus zu charakterisieren, wurde die Indigomethode verwendet. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das Indigo-Derivat bei einer Wellenlänge von 600 nm stark absorbiert (Extinktionskoeffizient: $20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und somit kaum Interferenzen durch die Abwassermatrix zu erwarten sind. Die Reaktion des Indigoderivats mit Ozon ist sehr schnell ($k > 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), und führt zu einem Ausbleichen des Indigotrisulfonats. Die Differenz der Absorption bei 600 nm bezogen auf eine Referenzprobe ist proportional zur Ozonkonzentration.

Zu Beginn der Experimente wurde die Wasserprobe in ein 250-mL-Schottglas überführt und auf Raumtemperatur (T: 21-22°C) temperiert. Zudem erfolgte eine Zugabe von pCBA als Hydroxylradikalindikator. Zur Vorbereitung der Indigomessung wurde in mehreren Reagenzgläsern 0,5 mL einer 1,25 mmol Indigotrisulfonat-Lösung vorgelegt. Der Aufbau des Batchreaktors ist in Abbildung 3-4 gezeigt.

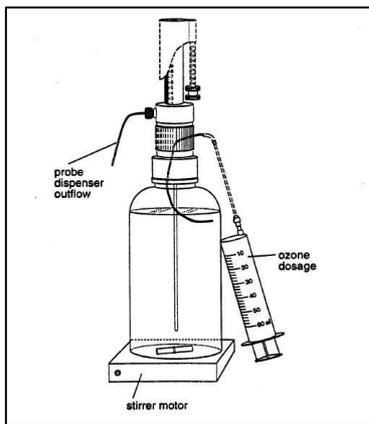


Abbildung 3-4: Aufbau eines Reaktionsgefäßes für die Indigomethode [23]

Zur schnellen Probenahme wurde das Schottglas mit einem Dispenser (Probenvolumen: 10 mL) verschraubt und Referenzproben entnommen. Dann wurde ein definiertes Volumen der Ozon-Stammlösung mittels einer Glasspritze unter Rühren dosiert. Nach etwa 10 Sekunden wurde der Magnetrührer ausgeschaltet und die Proben nach einem bestimmten Zeitplan in die vorbereiteten Reagenzgläser überführt. Anschließend wurde die Absorption der Indigoproben bei 600 nm in einer 1-cm-Küvette photometrisch bestimmt. Die 4-Chlorbenzoesäure wurde mittels HPLC-UV gemessen. Die zugehörigen Parameter sind in der Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tabelle 3-11: Parameter der HPLC-UV-Messung

Parameter	Einstellung
HPLC/UV	
Eluenten	60 % Methanol und 40 % Wasser (pH-Wert 2)
Gemessene Wellenlänge	234 nm
Fluss	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	100 µL
Retentionszeit pCBA	ca. 15,8 min

Batch-Experimente

Um die maximale OH-Radikal-Exposition für verschiedene Ozonkonzentrationen zu ermitteln, wurden Versuche ohne eine zeitliche Auflösung durchgeführt. Dabei wurden dem mit pCBA versetztem Abwasser verschiedene Ozonmengen zudosiert und nach vollständiger Erschöpfung des Oxidationssystems (Reaktionszeit mind. 24 h) Proben zur Bestimmung des pCBA Abbaus entnommen.

3.7 Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening sowie anschließende Strukturaufklärung (AP 4 und 5)

3.7.1 GC-MS-Screening

Das GC-MS-Screening wurde an einem Trace-GC-Ultra-System (Thermo, Dreieich, Deutschland) gekoppelt an einen massenspektrometrischen Quadrupol-Detektor (DSQ, Thermo) durchgeführt. Der verwendete PTV Injektor (Programmable Temperature Vaporizer) wurde im PTV splitlos Modus betrieben. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL und als Trägergas wurde Helium (5.0) mit einem Fluss von 1,3 mL/min genutzt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels einer DB-5MS Säule (J&W Scientific, Folsom, USA, 15 m, i.D: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25 μm) bei einer linear ansteigenden Temperatur von 70 $^{\circ}\text{C}$ bis 280 $^{\circ}\text{C}$ über eine Laufzeit von 30 Minuten. Elektronenstoß-Ionisierung (EI+) wurde in der Ionenquelle bei 230 $^{\circ}\text{C}$ und 70 eV durchgeführt. Das Quadrupol-Massenspektrometer detektierte im Full-Scan-Modus Fragmente im Massenbereich von m/z 50 bis 650.

3.7.2 LC-MS-Screening

Die Trennung der Analyten wurde mit einer Shimadzu Prominence HPLC durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Geräte und die Trennsäule sind in Tabelle 3-12 angegeben.

Tabelle 3-12: HPLC-Messparameter der Q-Trap-Messung

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Controller	CBM-20 A	Shimadzu
Entgaser	DGU-20 A3	Shimadzu
2 x Pumpe	LC-20 AD	Shimadzu
Säulenofen	CTO-20 AC	Shimadzu
Autosampler	SIL-20 AC	Shimadzu
UV-Detektor	SPD-20 AV	Shimadzu
Trennsäule	Phenomenex Synergi 4 μm Polar RP-80Å (150 x 2 mm)	Phenomenex

Als mobile Phasen wurden Wasser (A) – Methanol (B) mit jeweils 0.1 % Ameisensäure, für die chromatographische Trennung ein Lösungsmittelgradient von 5-100 % (B) in 15 Minuten verwendet. Die Ofentemperatur wurde auf 30 $^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Der Fluss der mobilen Phasen betrug 0,3 mL/min und das Injektionsvolumen 40 μL . Die Detektion der Transformationsprodukte wurde durch die Kopplung des HPLC-Systems mit einem Hybrid-Massenspektrometer (3200 Q-Trap, AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland) realisiert. Die Ionisierung der flüssigchromatographisch getrennten Analyten erfolgte bei

Atmosphärendruck im negativen und positiven Ionisierungsmodus. Die Ionenquellentemperatur betrug dabei 450 °C, die Ionisierungsspannung im negativen Modus -4200 V und im positiven Modus 5000 V. Stickstoff wurde als Curtain- (20 psi), Nebulizer- (40 psi) und Kollisionsgas verwendet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur Gewinnung von Strukturinformationen wurden informationsabhängige Experimente (IDA) durchgeführt. Für diese Experimente wurde ein Übersichts-Scan (EMS-Scan) im positiven und negativen Ionisierungsmodus im Massenbereich von $m/z = 50-1000$ aufgezeichnet. Für weitere Strukturinformationen wurde zu jedem Datenpunkt des Übersichts-Scans ein informationsabhängiges Produkt-Ionenspektrum der zwei intensivsten Massen aufgezeichnet. Die Peakerkennung in komplexen Proben erfolgte mittels MarkerView™ (AB SCIEX, Darmstadt). Die ermittelten Peaks wurden mit Microsoft Excel™ als Punktwolken dargestellt. Darüber hinaus erfolgte ein Abgleich mit der im IGF-Forschungsvorhaben „Oxidationsnebenprodukte“ entwickelten Datenbank von Massenspektren zu Transformationsprodukten von ausgewählten Pharmazeutika und Personal-Care-Produkten.

3.7.3 Strukturaufklärung ausgewählter Stoffe mittels hochauflösender multipler Tandemmassenspektrometrie (AP 5)

Zur weitergehenden Strukturaufklärung mittels hochauflösender Massen- und multipler Tandemmassenspektrometrie (LC-(HR)MS- und -(HR)MSⁿ; $n \geq 2$) wurde wie folgt vorgegangen: Die flüssigkeitschromatographischen Trennungen mit nachfolgender massenspektrometrischer Detektion (LC-MS) wurden auf einer Hypersil/Gold aQ Säule (RP-C₁₈, 5 µm, sphärisch; 125 x 2,1 mm i.D.; Thermo Fisher Scientific (Deutschland), der eine entsprechende Hypersil/Gold aQ C18-Vorsäule (10 x 2,1 mm i.D., gefüllt mit 5 µm, sphärischem Material) vorgeschaltet war, durchgeführt. Eine Surveyor MS Plus Pumpe (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) generierte den Gradienten, mittels eines HTC-PAL LC Autosampler System (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) wurden die Proben der analytischen Säule zugeführt. Es wurde eine Gradientenelution mit Eluent (A) (Methanol) und Eluent (B) (Milli-Q-Wasser) durchgeführt. Beide Laufmittel enthielten 2 mM Ammoniumacetat. Der Gradientenverlauf war wie folgt: Die Trennung begann mit 20 % A/80 % B, wobei die Konzentration von Eluent A innerhalb von 12 min linear auf 90 % A/10 % B gesteigert wurde. Sodann wurde die Eluentenzusammensetzung 20 min lang konstant gehalten. Der Gesamtfluss betrug 0,2 mL/min. Für die Detektion sowohl im positiven wie im negativen ESI-MS und -MSⁿ-Ionisierungsmodus wurde ein LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Electron) eingesetzt und die bei Gebhardt et al. [14] für die Aufnahme der MS- und MSⁿ-Daten beschriebenen Einstellungen der Orbitrap gewählt.

3.7.4 Semiquantitative Bestimmung von Transformationsprodukten (AP 6)

Die semiquantitative Bestimmung wurde mittels der Flüssigchromatographie in Kopplung mit dem Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer (LC-MS/MS) der Firma Waters Acquity UPLC-MS/MS durchgeführt. Die Extrakte wurden stets gefroren bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Für das Einstellen der massenspektrometrischen Geräteparameter wurden die Extrakte 1:10 verdünnt und in die Mobilphase mittels eines T-Stücks infundiert. Benötigte Kenndaten wie beispielsweise die spezifischen Massenfragmente wurden im AP 5 ermittelt und übernommen. Die eingestellten Tuning-Parameter und chromatographischen Bedingungen können der Tabelle 3-13 entnommen werden. Die Messung ist in der sensitiven und selektiven Multiple-Reaction-Monitoring-Einstellung (MRM) durchgeführt worden, die für die Quantifizierung am geeignetsten ist. Für das zu untersuchende Transformationsprodukt wurden stets zwei Massenspuren für die Quantifizierung (Quantifier) und Bestätigung (Qualifier) detektiert. Die Messung der Transformationsprodukte erfolgte mittels der Direktinjektion eines mit Reinstwasser verdünnten (1:1000) Extrakts.

Tabelle 3-13: Geräteparameter und verwendete Chemikalien

Gerätebezeichnung:	Waters Acquity UPLC-TQS
Säule:	Acquity C₁₈ 100 x 2.1 mm (Partikel:1,7 µm)
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemperatur:	40 °C
Fluss:	400 µL/min
Injektionsvolumen	1000 µL
Verwendete Lösungsmittel	A: Reinstwasser + 0,01 % Ameisensäure (Biosolve ULC-MS-Qualität) B: Acetonitril (Biosolve ULC-MS-Qualität)
Gradientenprogramm:	Injektion: % A: 99,90; % B: 0,01 0,1 min : % A: 95,00; % B: 5,00 8,0 min : % A: 95,00; % B: 0,01 8,2 min : % A: 1,00; % B: 99,0 9,0 min : % A: 1,00; % B: 99,0 9,2 min : % A: 99,90; % B: 0,01
Laufzeit der Messung:	10 min.
Detektionsart:	ESI +/-

3.8 *In-vitro*-Untersuchungen auf Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7 und 8)

3.8.1 Material Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7)

Tabelle 3-14: Verwendete Geräte

Zellart	Medienbestandteile für die Zellkultur	Assay Medium
CHO-9 Zellen (Zytotoxizität)	HAM's F12 Zellkulturmedium (Nutrient Mixture F-12) + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) + 0,5 % Gentamycin + 0,5 % L-Glutamin	
T47D-Zellen (Östrogenität)	DMEM F12-Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + Phenolrot + 7,5 % Fetales Kälberserum (FCS) + 3 mL Gentamycin + 5 mL Non-essential amino acids	Assay Medium: - DMEM ohne Phenolrot - 25 mL stripped FCS - 5 mL non-essential amino acids I: Assay Medium und steriles Wasser im Verhältnis 1:10 mischen II: Assay Medium und DMSO im Verhältnis 1:100 mischen MTT: 5 mg MTT in 1 mL PBS Lyselösung: 99,4 mL DMSO, 0,6 mL Essigsäure (100 %) und 10 g SDS

Chemikalien

PBS: Phosphate buffered saline

Trypsin + EDTA (0,05 %)

DMSO: Dimethylsulfoxid

Triton X

Material

- Minisart Filter (0,2 µm)

Tests

Zytotoxizität:

PAN I: LDHe-XTT-NR-SRB Kit (Xenometrix, Ch)

96-Well-Platten, transparent

Östrogenität:

ER Calux Kit (BioDetection Systems, NL)

96-Well-Platten, transparent (Nur Nalge Nunc international, 167008)

96-Well-Platten, weiß (Greiner Bio One; Art.-Nr.: 655075)

96-Well-Platten, transparent

Geräte

Tecan GENios Microplate Reader

Inkubator 37 °C und 5 % CO₂

3.8.2 Durchführung der Versuche Zytotoxizität und Östrogenität (AP 7)

Die Abwasserproben sowie die Extrakte wurden vor Versuchsbeginn gefiltert (0,45 µm Zellulosenitratfilter, Sartorius), um mögliche bakterielle Kontaminationen auszuschließen.

(1) MultiTox-Test (LDHe/XTT/NR/SRB)

Der Test wird von der Firma Xenometrix (CH) bezogen und entsprechend der Vorschriften durchgeführt.

Der MultiTox-Test muss an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden.

Tag 1: Aussäen der Zellen in 96-Well-Platten mit jeweils 20.000 CHO-9 Zellen/200 µL Medium je Well.

Tag 2: Exposition der CHO-9 Zellen gegen Abwasserproben für 24 h im Verhältnis 1:10 mit Medium

Tag 3: Absorptionsmessungen

LDHe (extrazelluläre Lactatdehydrogenase): 50 µL Überstand abnehmen, in eine neue 96-Well-Platte überführen und LDHe Lösungen zugeben, Absorptionsmessung bei 340 nm, kinetisch alle 5 min über einen Zeitraum von 25 min

XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid - Natriumsalz): Zugabe der XTT-Lösungen zur Originalplatte, Absorptionsmessung bei 480 nm

NR (Neutral Rot): Zugabe der NR Lösungen zur Originalplatte, Absorptionsmessung bei 540 nm

SRB (Sulforhodamin B): Zugabe der SRB Lösungen, Absorptionsmessung bei 540 nm

(2) MTT-Test

Auch der MTT-Test muss an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden.

Tag 1: Aussäen der Zellen mit je 10.000 T47D-Zellen/200 μ L Medium je Well einer 96-Well Platte

Tag 2: Exposition der Zellen gegenüber den Proben im Verhältnis 1:10 mit Medium für 24 h

Tag 3: Zugabe des Farbstoffes und Messung der Absorption bei 340 nm

(3) ER Calux-Test

Für die Durchführung des ER Calux-Test müssen vier aufeinander folgende Tage veranschlagt werden:

Tag 1: Aussäen der Zellen in eine 96-Well-Platte mit jeweils 10.000 T47D-Zellen/100 μ L Assay Medium je Well

Tag 2: Mediumwechsel

Tag 3: Exposition der Zellen gegen eine Standardreihe 17 β -Ethinylestradiol und die Wasserproben für 24 h. Dazu werden je Standard 1 μ L der entsprechenden 17 β -Ethinylestradiol Konzentration (0,3 bis 30 pM/well) mit 1 mL Assay-Medium-I gemischt. Das gleiche wird mit DMSO und dem Referenzwasser durchgeführt. Danach wird das alte Medium abgenommen. In die Wells für die Standardreihe, das DMSO und die Referenzprobe werden je 100 μ L der zuvor mit Assay-Medium-I angesetzten Lösungen gegeben. Die Wells für die Proben werden mit 90 μ L Assay-Medium-II und 10 μ L Probe befüllt.

Tag 4: Lumineszenzmessung. Dazu wird das Expositionsmedium entfernt und 100 μ L frisches Medium sowie 10 μ L Lyselösung zugegeben und die Platte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt nach dieser Inkubationszeit werden 30 μ L des Überstandes in eine weiße 96-Well-Platte überführt und 30 μ L Glowmix zugegeben. Sofort danach wird die Lumineszenz mit Hilfe des Microplate Readers gemessen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgt dann mittels einer von BioDetection-Systems bereitgestellten Microsoft ExcelTM Datei.

Die Versuche wurden jeweils im dreifach Ansatz getestet wobei die Proben bei jeder Durchführung in drei Wells getestet wurden aus denen dann der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet wurden.

3.8.3 Material Ames-Test und Comet-Assay-Test (AP 8)

Probenlagerung und Transport

Die originalen Abwasserproben und die Extrakte wurden gekühlt (auf Eis) transportiert und die Abwässer nach Ankunft steril filtriert (0,45 µm Zellulosenitratfilter, Sartorius). Die filtrierten Proben wurden bis zur Verwendung in den Testsystemen bei 4 °C gelagert. Die gewonnenen Extrakte wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Extrakte um den Faktor 20 mit Aqua bidest. (doppelt destilliertes Wasser) verdünnt.

Material und Chemikalien

In Tabelle 3-15 sind die verwendeten Geräte, in Tabelle 3-16 die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3-15: Verwendete Geräte

Material/Gerät	Firma
<i>Salmonella typhimurium</i> , TA98 und TA100, S9-Mix	Trinova
Humane Hepatozyten HepG2	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
RPMI 1640, Kälberserum, Trypsin-EDTA	PAA
Auswertesoftware, Comet-Assay IV	Perceptive Instruments
Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus BZ 51
Scan [®] 500 colony-counter & Software	Interscience
2-Nitrofluoren, 2-Aminoanthracen, Natriumazid, Phosphat Buffer Saline, Ampicillin, Biotin-Histidin	Sigma
Normal Melting Agarose Sea Kern LE, Low Melting Agarose Sea Plaque	BMA
Nährbouillon	Merck
Nähragar-Platten	Applichem

Tabelle 3-16: Verwendete Chemikalien

Lösungen und Zubereitungen	
VBE- Minimal Agar Platten	Agar 1,5 %, 50x VBE 2 %, 40 % Glucose-Lösung: 5 % in Aqua bidest.
Vogel-Bonner Medium E, (50X VBE)	MgSO ₄ (7 H ₂ O) 1 %, Zitronensäure (1 H ₂ O) 10 %, K ₂ HPO ₄ 50 %, NaNH ₄ PO ₄ 17,5 % in Aqua bidest.
Biotin/HistidinTop-Agar	Agar 0,5 %, NaCl 0,5 %, Biotin-Histidin 0,5 mM 10 %, PBS 25 % in Aqua bidest.
Nährbouillon	Nährbouillon, 13 % in Aqua bidest.
Nähragar	Nähragar, 2 % in Aqua bidest.
S9-Mix	Reagent "B" in 45 mL Reagent "A" komplett lösen + S9 Aroclor 1245 KCl 5 mL
2-Nitrofluoren Stammlösung	20 µg/mL in DMSO, Sigma
Natriumazid Stammlösung	50 µg/mL in Aqua bidest.
2-Aminoanthracen Stammlösung	30 µg/mL in Aqua bidest.
Ampicillin	50 mg/mL in Aqua bidest.
Biotin-Histidin	0,5 mM in Aqua bidest.
Trypsin-EDTA	Trypsin 0,05 %-EDTA 0,02 % in Aqua bidest.
Lyselösung	NaCl 146,4 g, Na ₂ EDTA 37,2 g, Trizma Base 1,2 g, N-Laurylsarcosin 10,0 g, NaOH 10mol 40 mL, Aqua bidest., pH 10
Lysepuffer	Triton X 1 %, DMSO 10 %, Lyselösung 89 %, pH 10
Elektrophoresepuffer	NaOH 10mol 60 mL, Na ₂ EDTA 200mmol 10 mL, Aqua bidest. 1930 mL, pH 14
Neutralisationspuffer	Trizma Base 48,5 g, Salzsäure konz. 20 mL, Aqua bidest. 980 mL, pH 7,5
Normal Melting Agarose	0,5 % in Aqua bidest.
Low Melting Agarose	0,7 % in Aqua bidest.
Ethidiumbromid	7,142 µg/mL in Aqua bidest.

Alle weiteren hier nicht aufgeführten bzw. nicht näher bezeichneten Chemikalien und Geräte entsprechen dem üblichen Laborstandard.

3.8.4 Durchführung der Versuche Ames- und Comet-Assay-Test (AP 8)

Salmonellen-Mutagenitätstest nach Ames (Ames-Test)

Der Ames-Test wird mit zwei Salmonellen-Stämmen, *Salmonella typhimurium* TA98 und TA100, durchgeführt. Beide Teststämme besitzen eine Mutation im Gen für die Aminosäure Histidin und können daher selbst kein Histidin synthetisieren (man spricht von Histidin-sensitiven Stämmen). Werden durch mutagene Testsubstanzen Rückmutationen in den Stämmen herbeigeführt, die den Zellen die Fähigkeit verleiht, Histidin zu synthetisieren, können diese auf Histidin-freiem Nährmedium selektioniert werden. Die Anzahl der Rückmutationen relativ zu den Spontanmutationen lässt Rückschlüsse auf das mutagene Potenzial der Testsubstanzen (Abwasserproben) zu. Aufgrund der unterschiedlichen Punktmutationen in den Stämmen (TA100: Frameshift-Mutation und TA98: Basenpaar-substitution) sind Rückschlüsse auf die Art der mutagenen Wirkung der zu untersuchenden Probe möglich. Es ist möglich, dass Chemikalien ein Toxizitätspotenzial erst zeigen, wenn sie durch Leberenzyme metabolisiert wurden. Aus diesem Grund werden die Experimente jeweils mit und ohne Zugabe von Rattenleberenzymen durchgeführt (S9-Mix).

Zur Bestimmung des genotoxischen Potenzials wird die sogenannte Induktionsdifferenz herangezogen. Diese ist die Differenz zwischen der Anzahl der Revertanten in der Negativ-Probe (Spontanmutationen) und den Testansätzen (Spontan- und Rückmutationen). Ist die Differenz beim Teststamm TA98 größer als 20, bzw. beim Teststamm TA100 grösser als 80 wird der Testansatz als potenziell genotoxisch eingestuft. Alle Testansätze werden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Bakterien wurden auf Selektionsagar (+Ampicillin, +Histidin) für 12 Stunden bei 37 °C vorinkubiert. Von den Agarplatten wurde eine Einzelkolonie gepickt, in einen Erlenmeyerkolben mit 60 mL Nährbouillon (+50 µg/mL Ampicillin) übergeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rounds per minute (rpm) im Schüttelwasserbad kultiviert. Die Extinktion der Übernachtskultur wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=660$ nm im Photometer (Perkin Elmer Lambda 35) gemessen. Um sicherzustellen, dass für die Durchführung des Tests ausreichend Zellen zur Verfügung standen, sollte die gemessene Extinktion der Übernachtskultur zwischen 1-1,4 liegen ($\sim 1-2 \times 10^9$ Zellen/mL). Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Konzentrationsreihe wurden je 2 mL Biotin/Histidin-Top-Agar mit 100 µL Salmonellen und 500 µL S9-Mix (Leberenzym-Mix aus der Rattenleber) und je 25/50/100/200 oder 500 µL der Probe zusammen pipettiert [Verdünnungsfaktoren Abwasser: 0,17; 0,07; 0,04; 0,02; 0,01; Extrakte (in 50-facher Anreicherung gegenüber dem Abwasser): 8,5; 3,5; 2; 1; 0,5]. Für jeden Stamm wurde eine Negativkontrolle (100 µL aqua bidest.) und eine Positivkontrolle [100 µL 30 µg/mL 2-Aminoanthracenlösung (mit S9-Mix)] mitgeführt. Ein zweiter Durchlauf erfolgte wie oben

beschrieben aber ohne S9-Mix. Für die Positivkontrollen wurden im zweiten Durchlauf 100 µL 20 µg/mL Natriumazid (*S. typhimurium* TA100) bzw. 100 µL 50 µg/mL 2-Nitrofluoren (*S. typhimurium* TA98) verwendet.

Die Platten wurden bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der Bakterienkolonien mittels Scan[®]500 colony-counter und Scansoftware bestimmt.

Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)

Die bei diesem Testverfahren verwendeten Zellen sind humane Hepatozyten (Krebszelllinie - HepG2). Die Zellen werden nach der Behandlung mit den Proben auf Objektträgern immobilisiert (in Agarose eingebettet) und unter alkalischen Bedingungen lysiert. Die so behandelten Zellen werden einer Elektrophorese unterzogen. Die DNA der Zellkerne wandert im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung, je nach Länge der DNA-Fragmente, unterschiedlich weit zur Kathode in der Elektrophoresekammer. Die DNA wird anschließend mittels Ethidiumbromid gefärbt, welches bei Anregung durch Licht im UV-Bereich die DNA sichtbar macht. Anhand der Streckung der DNA im elektrischen Feld sind Rückschlüsse auf die Schädigung der DNA möglich.

Zur Bestimmung des Grades der DNA-Schädigung wird das Olive Tail Moment (OTM) verwendet. Dieser berechnet sich aus der gemessenen Länge des Kometenschweifs und dem Abstand der Intensitätsmittelpunkte von Kopf und Schweif $[(\text{Median Schweif} - \text{Median Kopf}) \times \text{Schweif-DNA \%} / 100]$, siehe Abbildung 3-5. Somit fließen in den OTM sowohl die Migrationslänge der DNA als auch die Häufigkeit der Schädigungen (Anzahl der Brüche) mit ein [32].

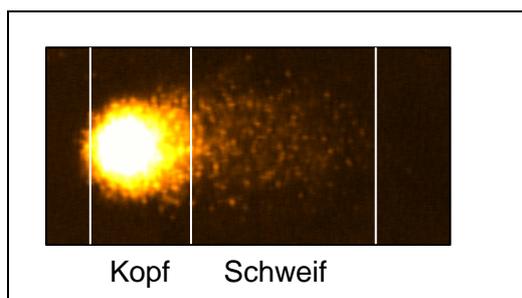


Abbildung 3-5: Comet-Assay: Beispielhaftes Olive Tail Moment zur Auswertung

HepG2-Zellen wurden in Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator (Binder) entsprechend der allgemeinen Vorschriften kultiviert. Für die Untersuchungen wurden nur Zellen verwendet, die sich noch in der Wachstumsphase befanden (Konfluenz 80-90 %), frei von Mykoplasmen und nicht älter als 20 Passagen waren. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 10 % Probe jeweils für 1 Stunde und 24 Stunden inkubiert (Verdünnungsstufe Abwasser: 0,1; Extrakt: 5). Anschließend wurden die

Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschalen gelöst, mit Kulturmedium gespült und mittels Zentrifugation sedimentiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 5 min mit 30 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ inkubiert und für die Negativkontrolle Aqua bidest. anstelle der Probe eingesetzt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf Objektträgern (OT) in Agarose und über Nacht die Lyse in Lysepuffer. Die behandelten Zellen wurden 40 min in Elektrophoresepuffer äquilibriert und dann für 45 min bei 4 °C, 300 mA und 25 V einer Elektrophorese unterzogen. Nach der Trocknung der OT in 100 % Methanol wurde die DNA mit 50 μL Ethidiumbromidlösung angefärbt und die Migration der DNA unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BZ 51) mittels Auswertungssoftware bei 100x Vergrößerung ausgewertet.

Statistische Analysen

Die Lage- und Streuungsmaße des Olive Tail Moments (OTM) als Maß für eine DNA-Schädigung im Comet-Assay werden tabellarisch gezeigt (Anzahl Messwerte, Mittelwert und Standardabweichung) und graphisch dargestellt (Box-Plots: Median, 25. Perzentil, 75. Perzentil und Extremwerte ohne Ausreißer). Unterschiede von Mittelwerten des OTM (Zulauf vs. Ablauf und Zulauf/Ablauf vs. Negativkontrolle) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests analysiert. In den Tabellen werden die Mittelwerte, die sich signifikant von den Negativkontrollen bzw. zwischen Zu- und Ablauf unterscheiden (p -Wert < 0,05) fett dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit dem Softwareprogramm „Statistica 10.0“ (StatSoft Inc.) erstellt.

3.9 *In-vivo*-Untersuchungen (AP 9)

3.9.1 Material und Methoden ökotoxikologische *In-vivo*-Tests (AP 9.1)

In den im Folgenden vorgestellten *In-vivo*-Testverfahren wurden Abwässer direkt untersucht. Darüber hinaus wurden im Algenhemmtest, der dafür zuvor miniaturisiert und optimiert werden musste, auch Extrakte untersucht mit dem Ziel, Fraktionen von Proben mit positiven Befunden im Algentest untersuchen zu können.

Die Abwasserproben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Lagerzeit betrug in der Regel nicht mehr als 4 Tage. Wenn eine längere Lagerung nötig war, wurden die Proben direkt nach Erhalt bei -18 °C eingefroren.

Die Abwasserproben wurden vor dem Einsatz in den ökotoxikologischen Tests durch Schütteln homogenisiert. Beim Algenhemmtest wurde der Überstand nach Sedimentation der Schwebstoffe dekantiert und dieser dann in den Test eingesetzt. Eine Einstellung des

pH-Wertes wurde nur bei dem Algenhemmtest mit modifiziertem Medium nach [35] vorgenommen.

Der Einfluss des Abwassers auf die verschiedenen Testorganismen wurde in jeweils vier Verdünnungsstufen (G1, G2, G4, G8) untersucht. Hierbei wurde ein dem Test entsprechendes Medium mit unterschiedlichen Anteilen des Abwassers verdünnt (siehe Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17: Verdünnungsstufen (G) und Anteile von Abwasser [%] in den Biotests.

Verdünnungs- stufe G	Anteil Abwasser [%]				
	Algentest	Lemnatest	Akuter Test Daphnia	Reproduktionstest Daphnia	Fischartest
1	80	90	100	100	100
2	50	50	50	-	50
4	25	25	25	-	25
8	12,5	12,5	12,5	-	12,5

3.9.2 Durchführung der Versuche ökotoxikologische *In-vivo*-Tests (AP 9.1)

Alle Versuche wurden nach entsprechenden standardisierten Testvorschriften [36, 41] mit den Abwasserproben vor und nach der Ozonung durchgeführt.

a. Algenhemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* nach DIN EN ISO 8692 (2005) [36]

Die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* stammt aus der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen.

Die Algenhemmtests wurden mit zwei verschiedenen Medien durchgeführt. Zum einem wurde das Wachstumsmedium entsprechend der ISO-Norm verwendet, zum anderen wurde ein modifiziertes Medium nach [35] in den Test eingesetzt. Dieses Medium enthält deutlich mehr Phosphat als das ISO-Medium. Dies ist notwendig, da nährstoffreichere Abwasserproben ansonsten zu einer Förderung des Algenwachstums im Vergleich zum nährstoffärmeren ISO-Medium führen können. Diese nährstoffbedingte Wachstumsförderung kann mögliche Wachstumshemmungen der Algen durch Chemikalien überlagern.

Es wurden 4 Verdünnungsstufen mit jeweils 3 Replikaten (Tabelle 3-17) und einem Volumen von 100 mL in 250-mL-Erlenmeyerkolben getestet. Als Kontrolle wurden 6 Mediumkontrollen

ohne Abwasser angesetzt. Als Inokulum wurden 10^4 Zellen/mL aus einer Vorkultur angeimpft.

Die Messung der Algendichte erfolgte über Fluoreszenzmessung in einem Multi-funktionsreader (Tecan, infinite M200) für Multiwellplatten mit der Software Tecan-i-Control. Dazu wurden aus jedem Ansatz jeweils 250 μ L pro Kavität in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner bio-one) pipettiert. Die Messung wurde mit einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 685 nm durchgeführt.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem temperierbaren Lichtschrank (B. Braun, BS3) bei 23 ± 2 °C mit kontinuierlicher Beleuchtung (SIL VANIA Standard FW/125 universal white 100 ± 10 μ Em⁻²s⁻¹). Die Ansätze wurden durch kontinuierliches Schütteln in Bewegung gehalten. Die Fluoreszenz wurde alle 24 Stunden gemessen (0 h - 72 h).

Als Endpunkt wurde die Wachstumsrate bestimmt und die prozentuale Hemmung im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Die niedrigste Verdünnungsstufe, in der eine 5%-ige Hemmung der Wachstumsrate nicht überschritten wird, wird als G_A Wert angegeben.

a.1. Miniaturisierter Algenhemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* in Mikrotiterplatten

Aufgrund der Positivbefunde bei der Testung von Rohabwasserproben im herkömmlichen Wachstumshemmtest mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus*, sollten im nächsten Schritt die Extrakte und weitergehend die Fraktionen dieser Extrakte untersucht werden, um die für die erhöhte Algentoxizität verantwortlichen Substanzen einzugrenzen und wenn möglich zu identifizieren.

Da der Algenwachstumshemmtest allerdings nach Standardvorschrift mit jeweils 100 mL Probe durchgeführt wird, reichte das Extraktvolumen nicht aus, um diese im herkömmlichen Testdesign zu untersuchen. Daher wurde zunächst die Methode auf einen miniaturisierten Algentest in Mikrotiterplatten mit einem Testvolumen von 2 mL pro Probe umgestellt, wie sie bereits von anderen Arbeitsgruppen entwickelt wurden [37]. Die Methodik zum miniaturisierten Algentest im Labor des Forschungsinstituts Gaiac wurde auf Basis einer vorläufigen ISO-Vorschrift erarbeitet, die zurzeit im DIN AK 5.1 „Bioteste“ als ISO-Norm für die Testung von Umweltproben, insbesondere Abwässer, entwickelt wird (ISO/WD Algal test - Microplate).

Die Versuchsdurchführung des miniaturisierten Algentests erfolgte in 24-Well-Mikrotiterplatten (TPP, Schweiz) mit einem Volumen von insgesamt 2 mL pro Well. Die Algendichte wurde über die Fluoreszenzmessung in einem Multifunktionsreader (Tecan, infinite M200) für Multiwellplatten mit der Software Tecan-i-Control gemessen. Die Messung wurde mit einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 685 nm

durchgeführt. Es wurden verschiedene Geräteeinstellungen untersucht, um optimale Einstellungen mit geringen Messunsicherheiten zu selektieren. Als optimale Einstellungen erwiesen sich die in der Tabelle 3-18 aufgeführten Werte.

Tabelle 3-18: Einstellungen des Multifunktionsreaders (Tecan, infinite M200) zur Messung der Fluoreszenz der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* im miniaturisierten Algentest

Parameter	Einstellung
Schütteln (Orbital) Dauer	30 s
Schütteln (Orbital) Amplitude	3 mm
Modus	Fluoreszenz Messung von oben
Anregungswellenlänge	440 nm
Emissionswellnlänge	685 nm
Anregungsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	135
Anzahl der Blitze	50
Integrationszeit	40 μ s

Eine weitere Randbedingung, die bei diesem Test im Vorfeld untersucht wurde, war die Inokulumdichte. Als Inokulum wurden zwei unterschiedliche Zelldichten von $5 \cdot 10^3$ und 10^4 Zellen/mL aus einer Vorkultur eingesetzt. Die höhere Inokulumdichte von 10^4 Zellen/mL zeigte eine geringere Variabilität zwischen den Testansätzen und eine vergleichbare Wachstumsrate, daher wurde für die Untersuchungen der Extrakte eine Inokulumdichte von 10^4 Zellen/mL gewählt.

Die Mikrotiterplatten wurden in einem Inkubations-Schüttelschrank (B.Braun, BS3) für 72 h inkubiert und kontinuierlich bei 450 rpm geschüttelt (Heidolph Titrimax 1000). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte zu Testbeginn (0h) sowie nach 24, 48 und 72 h. Die Mikrotiterplatten wurden während der Inkubationszeit mit einem Deckel abgedeckt sowie mit Parafilm umschlossen, um Verdunstungseffekte zu minimieren, gleichzeitig aber einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten. Aus den Fluoreszenzeinheiten wurde die Wachstumsrate über 72 h berechnet. Im miniaturisierten Algentest wurden als Kontrollen eine Mediumkontrolle (6 Replikate pro Platte), eine Positivkontrolle (Kaliumdichromat 1,5 mg/L; 3 Replikate auf einer Platte), eine Blindprobe als Prozesskontrolle (extrahierte, unkontaminierte Wasserprobe, die genauso behandelt wurde wie die Rohwasserproben; 3 Replikate auf einer Platte) sowie eine Lösungsmittelkontrolle (0,2 % Methanol, 3 Replikate auf einer Platte) mitgeführt.

b. Wachstumshemmtest mit *Lemna minor* nach DIN EN ISO 20079 (2006) [38]

Der verwendete Stamm der Wasserlinse *Lemna minor* St stammt aus dem Botanischen Institut der Universität Jena. Als Nährmedium wurde das modifizierte Steinberg-Medium verwendet. Es wurden 4 Verdünnungsstufen des Abwassers mit jeweils 3 Replikaten und einem Volumen von 150 mL in 400-mL-Bechergläsern getestet. Als Kontrolle wurden 6 Mediumkontrollen ohne Abwasser angesetzt. Als Inokulum wurden zu Testbeginn jeweils vier Pflanzen mit 3 Fronds eingesetzt. Als Frond bezeichnet man die individuelle blattanaloge Struktur einer Wasserlinsenkolonie. Als Endpunkte im Wasserlinsentest werden die Anzahl der Fronds (Gesamtanzahl aller Fronds, einschließlich derer, die von oben sichtbar unter einem Mutterfrond hervorgeschoben ohne Vergrößerungshilfe sichtbar sind) und die Fläche aller Fronds ermittelt.

Die Beobachtungsparameter Frondzahl und Frondfläche wurden mittels Bildverarbeitungsprogramm der Firma LemnaTec automatisch quantifiziert. Die Messungen erfolgten an Tag 0, Tag 3, Tag 5 und Tag 7. Als weiterer Beobachtungsparameter zur Bestimmung der Biomasse wurde das Trockengewicht (24 Stunden bei 60 °C) aller Ansätze nach 7 Tagen bestimmt.

Die Inkubation erfolgte in einer temperierbaren Lichttruhe (24 ± 2 °C) mit kontinuierlicher Beleuchtung (SILVANIA Standard FW/125 universal white: $90-95 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Als Endpunkt wurde die Wachstumsrate der Beobachtungsparameter bestimmt und die prozentuale Hemmung im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Die niedrigste Verdünnungsstufe, in der eine 10%-ige Hemmung der Wachstumsrate nicht überschritten wird, wird als D_L Wert angegeben.

c. Akuter Test mit *Daphnia magna* nach DIN EN ISO 6341 (1996) [39]

Als Testorganismus wurde *Daphnia magna* Straus Klon 5 verwendet. Es wurden 4 Verdünnungsstufen des Abwassers mit jeweils 4 Replikaten und 4 Mediumkontrollen ohne Abwasser angesetzt. Pro Ansatz wurden 20 mL in 50-mL-Bechergläser gefüllt. Der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt wurden in jedem Ansatz zu Testbeginn und am Ende gemessen. In jedem Ansatz wurden 5 Testorganismen eingesetzt, die jünger als 24 Stunden waren. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Schwimmfähigkeit der Daphnien überprüft. Der Test wurde bei 20 ± 2 °C im Dunkeln durchgeführt.

Als Ergebnis wird die niedrigste Verdünnungsstufe (G_D -Wert) angegeben, in der mindestens 90 % der Daphnien schwimmfähig sind.

d. Reproduktionstest *Daphnia magna* ISO 10706 (2000) [40]

Als Testorganismus wird ebenfalls *Daphnia magna* Straus Klon 5 verwendet. Es wurden keine Verdünnungsstufen angesetzt. Neben 10 Mediumkontrollen (M4-Medium) wurde das Abwasser in 10 Replikaten unverdünnt getestet. Als Versuchsgefäße dienten 100-mL-Bechergläser mit 50 mL Abwasser bzw. Medium. In jedes Becherglas wurde eine weibliche, neonate Daphnie (< 24 Stunden) eingesetzt, die bei Testbeginn unter dem Binokular (Zeiss, Stemi SV11) vermessen wurde. Der Test wurde bei $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer 16:8 Hell/Dunkelperiode durchgeführt. Alle 2 - 3 Tage wurde der Test kontrolliert. Dabei wurden die Testorganismen in neues Medium bzw. Abwasser überführt. Hierbei wurden die Größe des Muttertiers sowie die Anzahl der lebenden und toten Nachkommen und Aborte dokumentiert. Außerdem wurden alle Nachkommen auf ihr Geschlecht hin untersucht.

Als Futteralge wurde *Desmodesmus subspicatus* verwendet. Die Futtermenge betrug 0,2 mg Kohlenstoff pro Daphnie und Tag. Nach 21 Tagen wurde der Test beendet.

Als Ergebnis wurden die Mortalität der Muttertiere und der Nachkommen sowie die kumulative Anzahl der Nachkommen pro lebendes Muttertier angegeben. Zusätzlich wurde der Anteil der Männchen unter den Nachkommen als möglicher endokriner Effekt bestimmt. Ein G-Wert wurde in diesem Testverfahren nicht ermittelt, da nur die unverdünnte Abwasserprobe untersucht wurde.

e. Fischeitest mit *Danio rerio* nach DIN EN ISO 15088 (2009) [41]

In diesem Test wurde die Embryonalentwicklung befruchteter Eier des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) untersucht. In zwei unabhängigen Tests wurden jeweils 10 Eier in vier Verdünnungsstufen des Abwassers getestet. Zusätzlich zu einer Negativkontrolle mit Verdünnungswasser wurde eine Positivkontrolle mit 3,4-Dichloranilin mitgeführt. Hierbei wurden pro Test 40 Eier bzw. 20 Eier eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden mit einem Testvolumen von 2 mL in 24-Well-Mikrotiterplatten (TPP). Die Exposition der Eier wurde in einem Inkubationsschrank bei $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Hell/Dunkel Periode von 16:8 Stunden durchgeführt. Nach 48 h wurden verschiedene Endpunkte (Koagulation, Herzschlag, Ablösung des Schwanzes) unter dem Mikroskop untersucht. Ein Embryo gilt als nicht überlebensfähig, wenn er nach 48 h koaguliert ist oder der Schwanz nicht abgelöst ist oder der Herzschlag nicht feststellbar ist.

Als Testergebnis wird die niedrigste Verdünnungsstufe (G_{Ei}) angegeben, bei der mindestens 90 % der Eier überlebt haben.

3.9.3 Material, Methoden und Durchführung: *In-vivo*-Tests im Durchfluss (AP 9.2)

Zur Beurteilung der Abwassertoxizität wurden drei verschiedene *In-vivo*-Tests vor Ort an der Kläranlage Bad Sassendorf direkt mit dem Abwasser vor und nach Ozon im Durchflusssystem durchgeführt. Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Vergleich der Toxizität zwischen Abwasser aus der konventionellen Reinigung nach dem Belebtschlammverfahren und Abwasser nach der zusätzlichen Ozonungsstufe im Anschluss an das Nachklärbecken (O₃-Konzentration: 5 mg/L, DOC-Konzentration: ca. 10 mg/L). Zur Validitätskontrolle der Expositionsbedingungen jedes Testsystems wurde außerdem eine Kontrollgruppe auf gleiche Weise einem Standardkontrollwasser exponiert, das 3x wöchentlich neu angesetzt wurde [mittels Ionenaustauscherkartusche entionisiertes Wasser wurde mit artifiziellem Meersalz (TropicMarin®) und Na₂CO₃ (Verhältnis 10:3) auf eine Leitfähigkeit von 770 - 800 µS/cm aufgesalzen und der pH-Wert mittels NaOH/HCl auf 7,5 eingestellt]. Für den Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke wurde außerdem ein Positivkontrollwasser eingesetzt, um die Validität des Testsystems anhand steigender Embryonenzahlen nach Ethinylestradiol-Exposition (25 ng/L im Kontrollwasser) zu überprüfen. Aufgrund der unterschiedlichen Wasserparameter zwischen Kontrollen und Abwasser wird im Wesentlichen der Vergleich zwischen ozoniertem und nicht-ozoniertem Abwasser für die toxikologische Bewertung herangezogen. Die Versuchorganismen wurden mit den Abwässern in einem kontinuierlichen Durchfluss exponiert, um auch schnell abbaubare Oxidationsprodukte infolge der Ozonung in die Beurteilung mit einzubeziehen. Die Expositionsgefäße wurden in einer mit Wasser gefüllten Temperierwanne konstant auf die erforderlichen Temperaturen (siehe unten) temperiert [mittels Durchlaufkühlern von Julabo (Seelbach, Deutschland) und Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)]. Der Durchfluss durch die Expositionsgefäße wurde mit 24-Kanal bzw. 40-Kanal-Pumpen von Ismatec (Wertheim-Mondfeld, Deutschland; Modelle ICP bzw. MCP) gewährleistet. Hierbei wurde die Pumpgeschwindigkeit so eingestellt, dass das Abwasser in den Expositionsgefäßen 4 x pro Tag ausgetauscht wurde. Jedes Testgefäß wurde außerdem separat belüftet, wodurch gleichzeitig eine kontinuierliche Durchmischung des Testwassers in den Testgefäßen erreicht wurde. Die Testwässer wurden über Teflonschläuche in die Expositionsgefäße geleitet und gelangten über einen passiven Auslauf in die Temperierwanne und von dort in den Abfluss. Der Abwassertransport bis zu den Testgefäßen dauerte > 40 min, was einen vollständigen Abbau eventuell vorliegenden Restozons gewährleistete. Expositionsbedingungen, Fütterung und Auswertung der einzelnen Tests werden im Folgenden erläutert.

Abwasserparameter wie pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt und Ammoniumkonzentration wurden regelmäßig aufgenommen, um einen möglichen Einfluss auf die Testergebnisse zu überprüfen. Der Sauerstoffgehalt lag in allen Testgefäßen bei >90 %. Leitfähigkeit und pH-Wert waren in beiden getesteten Abwässern nahezu konstant (pH: 6,4 - 7,3; 1080 – 1900 µS/cm) und die Ammoniumkonzentration lag bei < 1 mg/L. Die Wasserhärte lag zwischen 8 – 12°dH (Carbonathärte).

a. Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*

Der Toxizitätstest mit dem Glanzwurm *Lumbriculus variegatus* wurde gemäß der OECD-Richtlinie 225 [46] durchgeführt. Jeweils 10 Tiere wurden in die Testgefäße (Wasservolumen 350 mL, ca. 2 cm dicke Sandschicht als Sediment) eingesetzt, 28 Tage gegenüber den Abwässern vor und nach Ozonung exponiert (20 °C, Tag / Nacht: 16h / 8h) und dabei alle 2 Tage gefüttert (Fütterung mit Tetra-Min® ad libitum). Hierbei wurden 5 Replikate pro Abwasser eingesetzt. Nach Versuchsende wurden die beiden Endpunkte Anzahl der Würmer und Biomasse bestimmt. Eine verringerte Reproduktionsrate und Biomasse geben hierbei Hinweise auf eine gesteigerte Toxizität der Testwässer.

b. Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Der Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* ist ein sensitives Testsystem zur Bestimmung östrogenen Aktivität und kann damit als *In-vivo*-Erfolgskontrolle der Ozonung von Abwasser dienen, da hierbei eine starke Reduktion der Östrogenität zu erwarten ist. Des Weiteren werden eventuell auftretende reproduktionstoxische Wirkungen erfasst. Der Test mit der Zwergdeckelschnecke wurde in Anlehnung an den Richtlinienvorschlag von [47] durchgeführt. Jeweils 40 Tiere pro Replikat (2 Replikate pro Abwasser bzw. Kontrollwasser) wurden 28 Tage gegenüber den Testwässern exponiert (16 °C, Tag / Nacht: 16h / 8h) und alle 2 Tage gefüttert (TetraPhyll®, ad libitum). Als Endpunkt wurde nach Versuchsende die Anzahl der Embryonen in der Bruttasche bestimmt sowie die Mortalität und Schalenhöhe der Schnecken aufgenommen. Die Embryonenzahl wurde hierbei getrennt nach beschalten und unbeschalten Embryonen aufgenommen, da die Anzahl unbeschalteter Embryonen, aufgrund des jüngeren Entwicklungsstadiums, als sensitiverer Endpunkt gilt. Eine gesteigerte Embryonenzahl im Vergleich zu einem Referenzwasser ist hierbei Marker für eine erhöhte östrogene Aktivität im Wasser. Sind die Embryonenzahlen der abwasserexponierten Schnecken signifikant verringert im Vergleich zur Negativkontrolle, so kann dies ein Hinweis auf reproduktionstoxische Wirkungen sein.

c. Toxizitätstest mit *Dreissena polymorpha*

Die Zebrauschel *Dreissena polymorpha* hat sich in vergangenen Experimenten als sensitiver Testorganismus zur Detektion erhöhter Toxizität infolge der Ozonung erwiesen [48]. Jeweils 5 Muscheln wurden pro Replikat eingesetzt (Größe der Muscheln zwischen 2,2 - 2,8 cm; 4 Replikate pro Abwasser). Außerdem wurde bei diesem Test eine Verdünnungsstufe von 1:2 für die beiden Abwässer untersucht. Die Muscheln wurden 28 Tage den Testwässern exponiert (16 °C, Tag / Nacht: 16h / 8h) und mittels Schlauchpumpen (IPC24) kontinuierlich gefüttert [mit Phytoplanktonlösung PhytoPlex® von Kent (Franklin, Wisconsin, USA); 1:30-fach verdünnt, Pumpgeschwindigkeit: 0,05 mL/min]. Endpunkte waren in diesem Test die Mortalität und Biomasse (ohne Schale).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Fraktionierung und Anreicherung (AP 1)

Alle Abwasserproben wurden ohne Schwierigkeiten extrahiert und gemäß Probenlogistikplan (Abb. 2-1) an die Projektpartner verteilt, um die geplanten effekt-dirigierten Untersuchungen durchzuführen. Eine Blindprobe wurde aus Reinstwasser extrahiert und an alle Projektpartner verteilt, um mögliche Störungen zu untersuchen, die durch die Extraktion selbst verursacht werden könnten.

Die Extrakte des Abwassers wiesen eine deutliche gelbliche Verfärbung auf, die bei den 5 mg/L Ozon Einstellungen deutlicher abnahm als bei 2 mg/L.

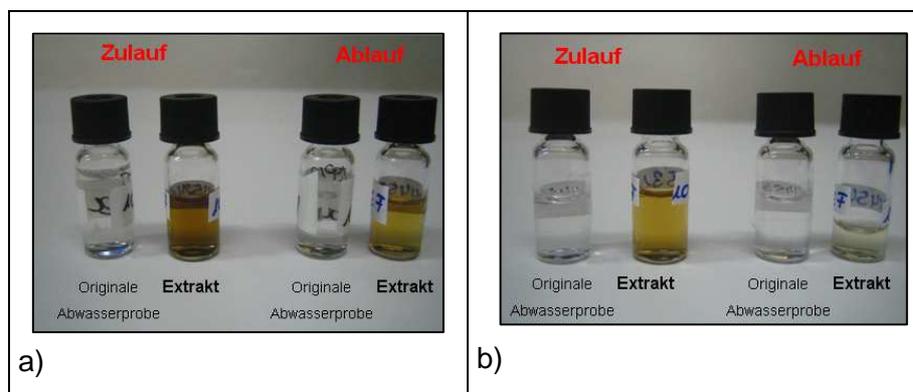


Abbildung 4-1: Extrakte vor und nach der Ozonung, a) 2mg/L Ozon (Volumensteuerung), b) 5mg/L Ozon (Volumensteuerung)

Die weitergehende Fraktionierung der Extrakte nach einem positiven toxikologischen Befund wurde mit den beteiligten Projektpartnern während der Projekttreffen intensiv besprochen und auf die jeweiligen Anforderungen angepasst. Die Ergebnisse der *In-vivo*-Untersuchungen zeigen positive Befunde in der Algentoxizität mit den direkten Abwässern nach der Ozonung auf (siehe 3.6.1). Um die geplante Fraktionierung dieser Abwässer vorzunehmen, wurden die Algentoxizitätsmethode miniaturisiert und die Extrakte daraufhin überprüft und angepasst, um die Algentoxizitätsexperimente durchführen zu können. Danach werden die Extrakte toxikologisch untersucht, um bei positiven Befunden die Fraktionierung vorzunehmen.

4.2 Bestimmung von Bromat und Nitrosaminen (AP 2)

4.2.1 Bromatbildung (2.1)

Die im Rahmen der Teilprojekte 6 und 10 durchgeführten Versuche zur Ozonung des Kläranlagenablaufs sind mit unterschiedlichen Sollkonzentrationen an Ozon durchgeführt worden. Die Sollkonzentrationen sagen jedoch nichts über die tatsächlich applizierte Ozondosis aus, da die einzelnen Ozonanlagen über unterschiedliche Regelungsstrategien verfügen. Ein anlagenübergreifend vergleichbarer Wert stellt das Z_{spez} dar. Z_{spez} gibt mg Ozon pro mg DOC (gelöster organischer Kohlenstoff) an. Anhand dieser Werte lassen sich für die durchgeführten Versuche folgende Zusammenhänge aufzeigen:

Prinzipiell führen höhere Ozondosen zu einer höheren Bromatbildung. Doch je höher der DOC, desto schneller wird das Ozon gezehrt und die Bromatbildung nimmt ab. Bei hohen DOC-Werten werden somit zuerst die leicht oxidierbaren Substanzen aufgebraucht. Auch die Temperatur spielt eine große Rolle bei der Bromatbildung. Eine Temperaturerhöhung korreliert immer mit einer erhöhten Bromatproduktion [52].

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_{spez} zwischen 0,3 und 0,5 mg O_3 /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 O_3 /L überschritten, was mit üblicherweise im Mai erhöhten Außentemperaturen, oder einem deutlich höheren Z_{spez} erklärt werden kann. Eine Erhöhung der Ozonkonzentration auf einen Sollwert von 7 mg O_3 /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 4-2 zu finden.

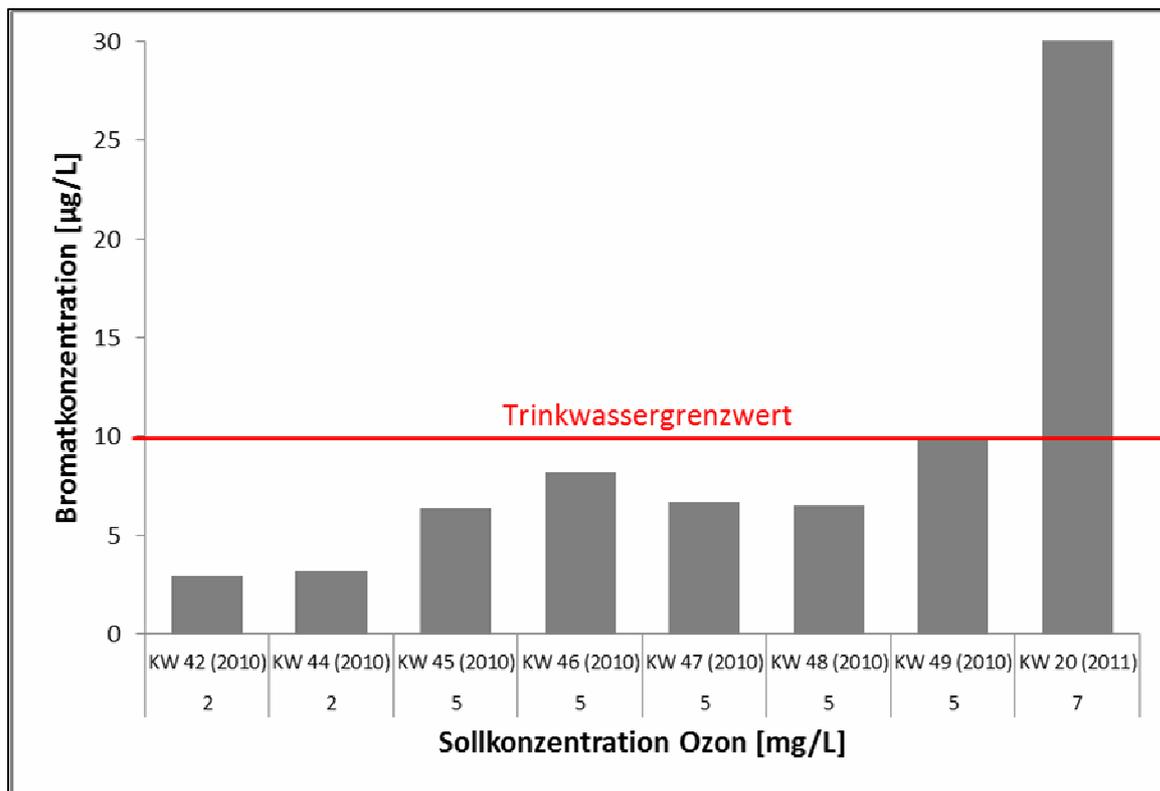


Abbildung 4-2: Zusammenfassende Darstellung der Bromat-Konzentrationen in Abhängigkeit der Sollkonzentration von Ozondosis in Bad Sassendorf.

Auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden wurden während der Projektlaufzeit bisher lediglich Versuche zur Prozessoptimierung durchgeführt. Dort sind die Einstellungen von 7 und 14 mg O₃/L untersucht worden. Eine relevante Bromatbildung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Das niedrige Bromatbildungspotential liegt wahrscheinlich an den niedrigen Bromidwerten des Ablaufes der Kläranlage Duisburg-Vierlinden.

Da gereinigtes Abwasser nicht direkt dem Verbraucher zugänglich gemacht wird, muss es auch nicht den Anforderungen der Trinkwasserverordnung entsprechen. Als selbst starkes Oxidationsmittel wird Bromat in den Oberflächengewässern mit großer Wahrscheinlichkeit wieder in Bromid umgewandelt [53]. Diese Annahme könnte durch die Untersuchung der biologischen Nachbehandlung (z. B: Untersuchung des Ablaufs des Schönungsteichs in Bad Sassendorf) weiter untersucht werden.

4.2.2 Bildung von Nitrosaminen (2.2)

Die Quantifizierung der Nitrosamine erfolgte im Zu- und Ablauf der Ozonungsanlage. Dabei diente die Zulaufprobe als Blindwert, um ggf. bereits vor der Ozonung in der Probe vorhandene Nitrosamine zu erkennen. In allen untersuchten Abwässern (auch der in Kapitel 4.2.1 aufgeführten 7 mg/L Ozon Einstellung) auf der Kläranlage Bad Sassendorf wurden weder im Zulauf noch im Ablauf der Ozonungsanlage Nitrosamine oberhalb der analytischen Bestimmungsgrenze von 5 ng/L festgestellt. Die Bestimmungsgrenze von 5 ng/L entspricht der Hälfte des vom Umweltbundesamt festgesetzten duldbaren gesundheitlichen Orientierungswertes (GOW) von 10 ng/L für eine lebenslange orale NDMA- und NMOR-Exposition über das Trinkwasser. Die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchung auf Nitrosamine könnten mit der Zusammensetzung des Abwassers in Bad Sassendorf zusammenhängen, das ausschließlich aus kommunalem Abwasser besteht und keinen industriellen Einfluss aufweist. Deshalb waren möglicherweise keine Vorläufersubstanzen vorhanden bzw. deren Konzentration zu niedrig, um während der Ozonung messbare Konzentrationen an Nitrosaminen bilden zu können.

4.3 Ozonzehrung und Hydroxylradikalexposition (AP 3)

Ozonzehrung

Die Ozonabbaukinetik und die Bildung von OH-Radikalen wurden im Rahmen von Laborversuchen bestimmt. Deshalb wurde hierzu das Abwasser direkt vor der Ozonung ohne weitergehende Aufbereitungsmaßnahmen untersucht. Abbildung 4-3 zeigt den Ozonabbau in den entnommenen Abwasserproben. Hierbei kommt es zu einer raschen „Initialzehrung“ des Ozons durch Reaktionen mit funktionellen Gruppen des DOC, die eine gute Reaktivität gegenüber Ozon aufweisen (z. B. aktivierte aromatische Systeme, Doppelbindungen oder deprotonierte Amine [18]). Dabei werden etwa 3-4 mg/L Ozon sehr schnell gezehrt. Da die Initialzehrung zu einem Verbrauch dieser funktionellen Gruppen führt, folgt nach der fast spontanen Initialzehrung eine stabile Phase des langsameren Ozonabbaus.

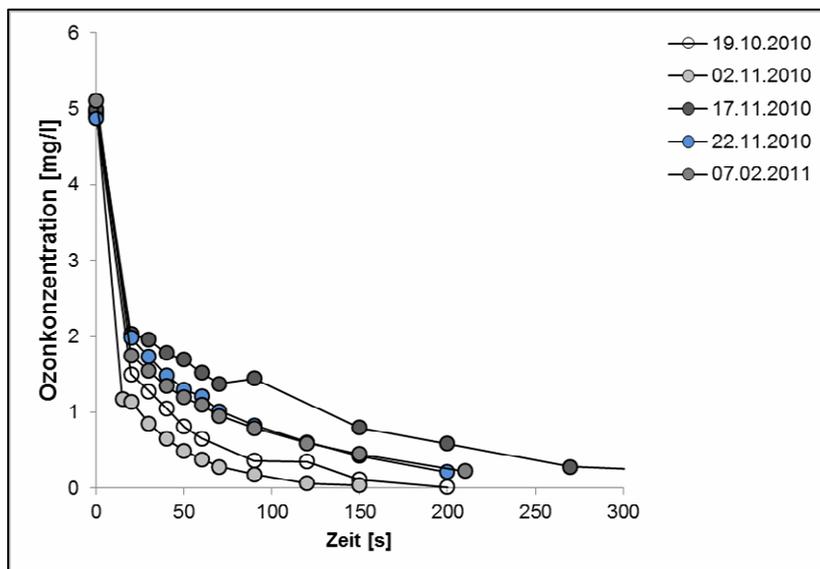


Abbildung 4-3: Ozonzehrung für 5 mg/L Ozondosierung

Dieses Verhalten wird auch durch das Ozonprofil bei einer Dosierung von 2 mg/L Ozon widerspiegelt, da innerhalb von etwa 20 Sekunden bereits kein Restozon mehr messbar war (Abbildung 4-4).

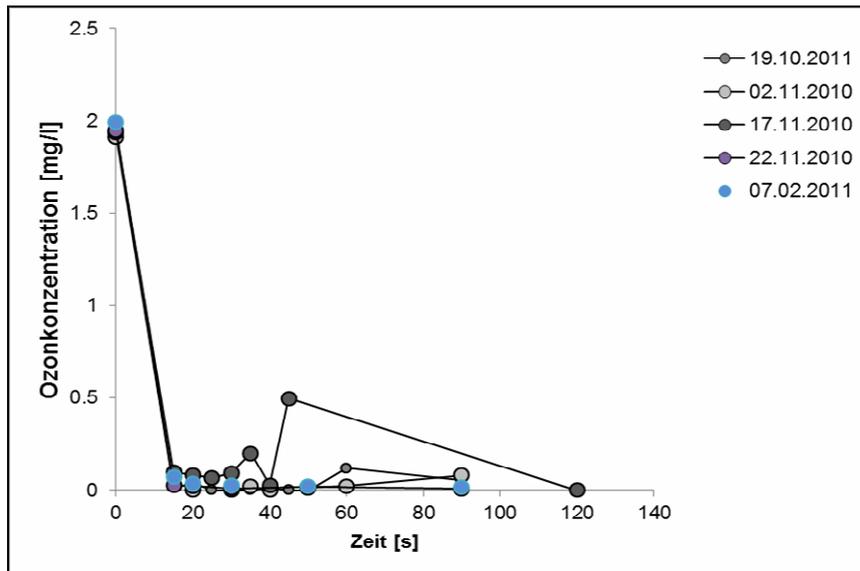


Abbildung 4-4: Ozonzehrung für 2 mg/L Ozondosierung

In Abbildung 4-5 sind die aus den Ozonabbaukurven ermittelten Ozonhalbwertszeiten gegen den DOC der jeweiligen Proben aufgetragen. Die Ozonstabilität zeigt gewisse Schwankungen, die vermutlich mit wechselnden Abwasserzusammensetzungen zusammenhängen.

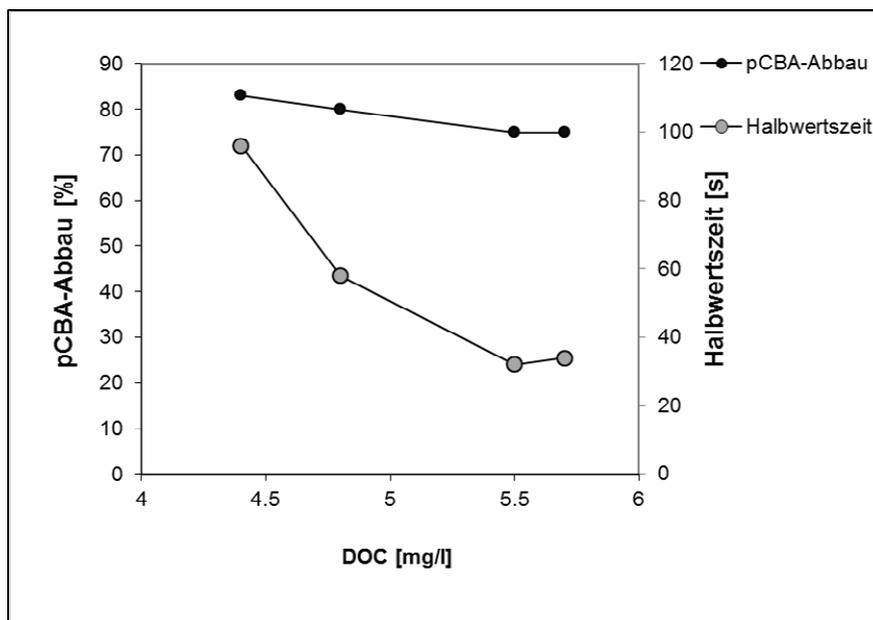


Abbildung 4-5: Ozonhalbwertszeit und Abbau von 4-Chlorbenzoesäure (pCBA) vs. DOC-Konzentration

Obwohl die Ozonhalbwertszeit eine relativ starke Abhängigkeit von der DOC-Konzentration aufweist, deuten die Ergebnisse an, dass die Abbauleistung für ozonrefraktäre Stoffe sich kaum verändert (nahezu konstanter Abbau von 4-Chlorbenzoesäure in Abhängigkeit des DOC-Gehaltes in Abbildung 4-5). Da jedoch eine Vielzahl an Verbindungen schnell mit Ozon

reagiert, führt ein erhöhter DOC möglicherweise zu einer Verschlechterung der absoluten Oxidationsleistung des Verfahrens.

Abbildung 4-6 zeigt eine Abbaukinetik von 4-Chlorbenzoesäure während der Abwasser ozonung als Beispielsubstanz für ozonrefraktäre organische Spurenstoffe. Die Charakteristik des Spurenstoffabbaus ist dabei sehr ähnlich dem Ozonabbau. Die Dosierung von 5 mg/L Ozon führt nach vollständigem Ozonumsatz zu einem Abbau von etwa 80 % pCBA. Das entspricht einem Abbau von etwa 16 % pCBA je mg/L verbrauchtem Ozon. Dies ermöglicht eine Abschätzung des pCBA-Abbaus anhand des Ozonumsatzes. Für die rasche Zehrung des Ozons von 3,5 mg/L während 20 Sekunden Reaktionszeit (Probe vom 19.10.2010, s. Abbildung 4-3) wird damit ein pCBA-Abbau von 56 % berechnet, was mit dem Messergebnis gut übereinstimmt (60%-pCBA Abbau bei 20 Sekunden, s. Abbildung 4-6)). Analoges kann bei einer Dosierung von 2 mg/L berechnet werden (berechneter Abbau 32 %, gemessener Abbau 30 %). Aus dem pCBA-Abbau kann die Transformation anderer Spurenstoffe berechnet werden, sofern deren kinetische Konstanten k_{OH} bekannt sind. Damit kann anhand des Ozonprofils auch der OH-radikalbasierte Spurenstoffabbau näherungsweise beschrieben werden. Ein analoges Konzept wurde für ozonbasierte Verfahren im Trinkwasseraufbereitungsbereich entwickelt [25, 26].

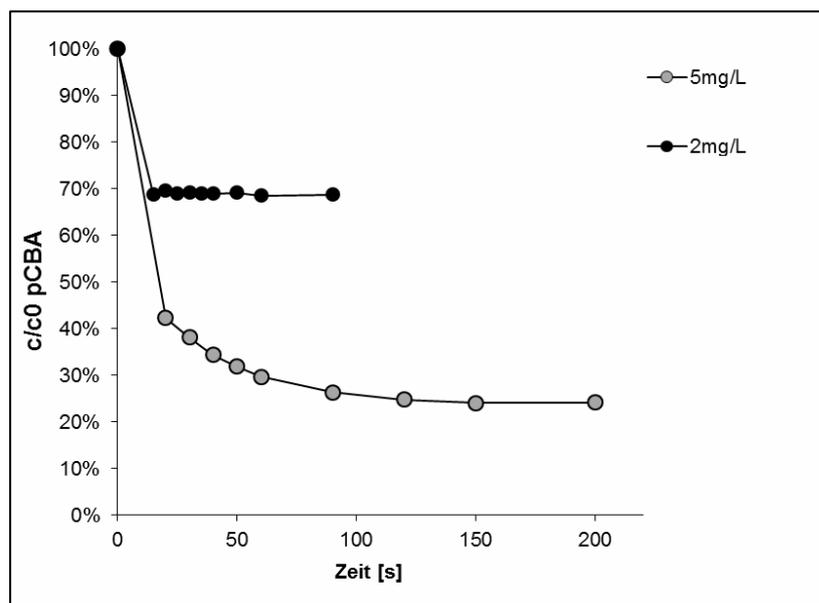


Abbildung 4-6: Abbaukinetik von 4-Chlorbenzoesäure bei Dosierung von 2 und 5 mg/L Ozon

Es ist dabei zu erwähnen, dass diese Korrelation nur bestimmte „Ozoneintragsmengen“ abdeckt, da sich der Umsatz des Ozons mit zunehmender Ozonzehrung verringert. Dies liegt an dem zunehmenden Verbrauch an funktionellen Gruppen des DOC, die den Ozonabbau unter Bildung von OH-Radikalen einleiten. Daher ist es sinnvoll, den Abbau ozonrefraktärer Stoffe für größere Ozonumsätze in Form von Laborversuchen abzuschätzen.

Hydroxylradikalexposition

Der Abbau eines ozonrefraktären Spurenstoffes in der Ozonung kann mit der kinetischen Konstante für OH-Radikalreaktionen (k_{OH} [$M^{-1}s^{-1}$]) mit Gleichung 1 (s.h. 3.6) beschrieben werden. Die OH-Radikalexposition kann dabei aus dem Abbau eines ozonrefraktären Stoffes (z.B. pCBA) mittels Gleichung 2 berechnet werden. Für OH-Radikalreaktionen sind bereits sehr viele kinetische Konstanten für organischen und anorganischen Verbindung verfügbar, was eine umfassende Einschätzung der Oxidationsleistung via OH-Radikale ermöglicht. Die Übertragung der Daten für den pCBA-Abbau auf Schadstoffe mit einer geringeren Reaktivität gegenüber OH-Radikalen ist beispielhaft in Abbildung 4-7 gezeigt. Die Stoffauswahl ist so gewählt, dass ein weites Spektrum an kinetischen Konstanten abgedeckt ist. Die entsprechenden kinetischen Konstanten dieser Stoffe sind in der Tabelle 4-1 dargestellt (entnommen aus [18]).

Tabelle 4-1: Kinetische Konstanten für ozonrefraktärere Stoffe

Stoffname	Geschwindigkeitskonstanten [$M^{-1}s^{-1}$]
$k_{(OH + Atrazin)}$	$3,0 \times 10^9$
$k_{(OH + MTBE)}$	$1,9 \times 10^9$
$k_{(OH + Bromoform)}$	$1,3 \times 10^8$
$k_{(OH + Trichloracetat)}$	$6,0 \times 10^7$

Die Ergebnisse deuten an, dass eine Ozondosierung von 2 mg/L zu einem unvollständigen Abbau ozonrefraktärer Stoffen über den OH-Radikalweg führt. Dabei wurde pCBA ($k_{OH}: 5 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) zu ca. 30 % transformiert, während Verbindungen mit einer geringeren Reaktivität (z. B. MTBE) zu < 20 % transformiert werden. Die starke Zehrung durch die Matrix (Abbildung 4-4) deutet dabei an, dass auch der direkte Abbau via Ozon unzureichend sein könnte. Die geringe Ozonstabilität lässt zudem eine schwache Desinfektionsleistung erwarten. Daher scheint eine Ozondosierung von 2 mg/L nur bedingt für die Ozonung des untersuchten Abwassers geeignet zu sein. Mit 5 mg/L Ozon wird pCBA wirksam eliminiert (ca. 80 % Transformation). Zudem weist das Ozon mit dieser Dosierung eine deutlich höhere Stabilität auf, wodurch zusätzliche „Oxidationskraft“ via Direktreaktionen mit Ozon auf Spurenstoffe wirken kann. Für den weitgehenden Abbau von Atrazin oder MTBE von \geq ca. 80 % wären deutlich höhere Ozondosierungen von etwa 7,5-10 mg/L notwendig (siehe Abbildung 4-7). Verbindungen mit einer geringen Reaktivität gegenüber OH-Radikalen (z. B. Bromoform) werden in der Abwasserozonung kaum abgebaut, oder es sind extrem hohe Ozondosierungen erforderlich, die in der kommunalen Abwasseraufbereitung nicht realisierbar sind.

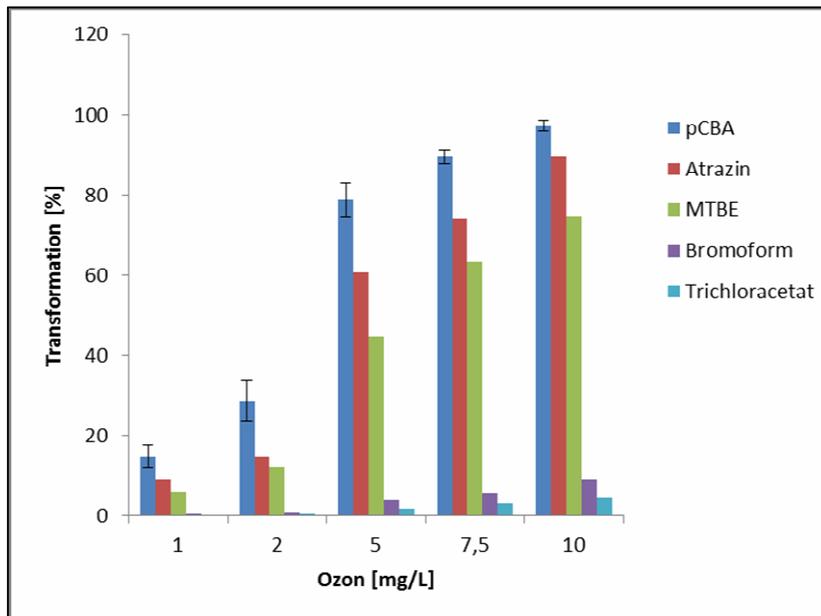


Abbildung 4-7: Transformation von 4-Chlorbenzoesäure bei verschiedenen Ozondosierungen und daraus abgeleiteter Abbau anderer Schadstoffe

Bei diesen Aussagen ist allerdings darauf hinzuweisen, dass es bei hohen pCBA-Umsätzen von $\geq 90\%$ zu Fehleinschätzungen kommen kann. Manche der stabileren Verbindungen wie Atrazin weisen zudem eine merkliche Reaktivität gegenüber Ozon auf, was zu einer Unterschätzung der Abbaueffizienz führen kann, wenn diese ausschließlich auf dem OH-Radikalabbauweg basiert.

4.4 Massenspektrometrisches GC- und LC-MS-Screening sowie anschließende Strukturaufklärung (AP 4 und 5)

4.4.1 Massenspektrometrisches GC-MS-Screening (4.1, 4.2)

Beim GC-MS-Screening wurden die aufbereiteten Abwasserproben im Full-Scan-Modus gemessen, um einen Überblick über alle detektierbaren Substanzen im angereicherten Extrakt zu erhalten. Alle zusammengehörigen Zulauf- und Ablaufproben wurden miteinander verglichen, um mögliche Transformationsprodukte im Ablauf zu identifizieren bzw. um Substanzen als Transformationsprodukte auszuschließen, welche bereits in der Zulaufprobe vorhanden waren. Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9 zeigen beispielhaft die Gegenüberstellung der Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) einer Zulauf- und Ablaufprobe (Probenahme Nr. 3 vom 18.11.2010) mit einer Gesamtlaufzeit von 30 Minuten aufgeteilt auf die beiden Abbildungen. In dieser Ablaufprobe nach Ozonung konnten insgesamt acht Transformationsprodukte detektiert werden, die mit Zahlen unter der Basislinie der Chromatogramme markiert sind. Somit konnte durch das GC-MS-Screening nachgewiesen werden, dass bei der Ozonung von Abwasser flüchtige Transformationsprodukte entstehen. In Tabelle 4-2 sind die gefundenen Transformationsprodukte mit ihrer Retentionszeit und ihren massenspektrometrischen Daten aufgelistet.

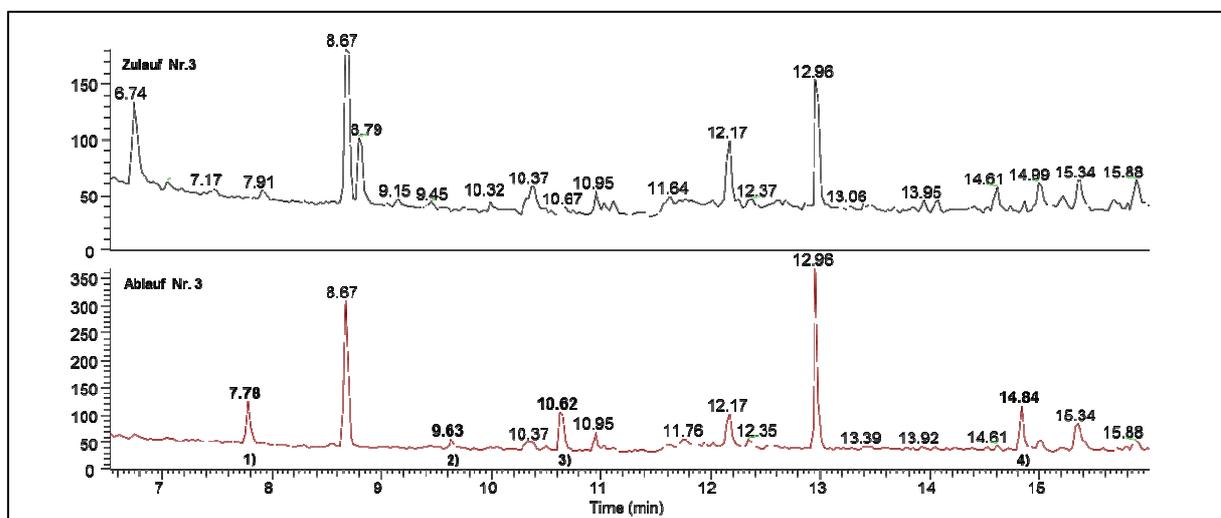


Abbildung 4-8: Ozonung in Bad Sassendorf (Probenahme Nr. 3 vom 18.11.2010) mit ca. 5 mg/L Ozon. Vergleich der Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) von Zulauf und Ablauf (t_R -Bereich 6 – 16 min). Mögliche Transformationsprodukte im Ablauf wurden nummeriert (1 – 4).

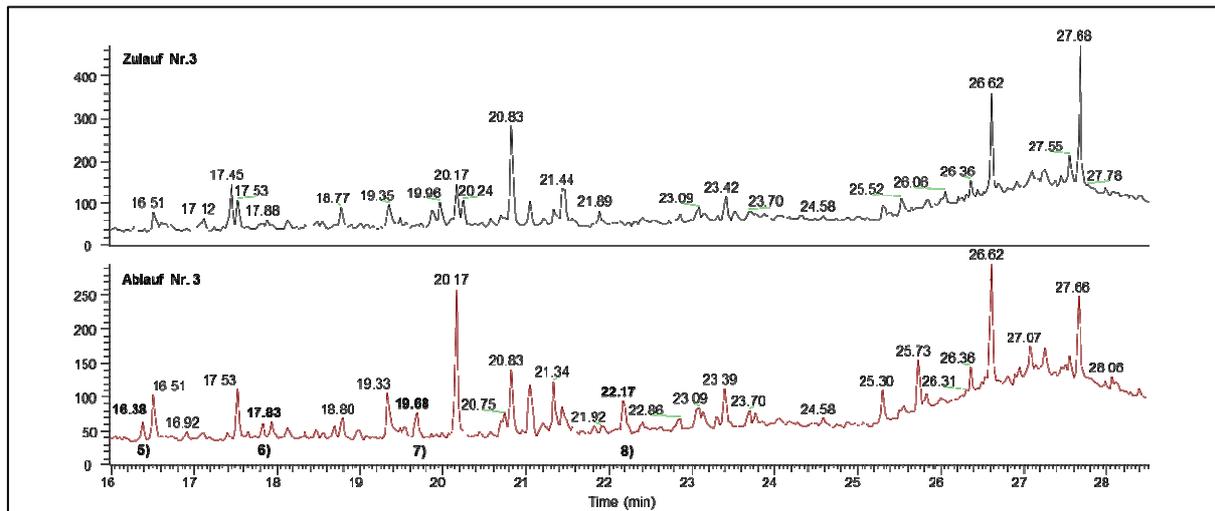


Abbildung 4-9: Ozonung in Bad Sassendorf (Probenahme Nr. 3 vom 18.11.2010) mit ca. 5 mg/L Ozon. Vergleich der Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) von Zulauf und Ablauf (t_R -Bereich 16 – 29 min). Mögliche Transformationsprodukte im Ablauf wurden nummeriert (5 – 8).

Tabelle 4-2: Liste vermuteter Transformationsprodukte (siehe Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Die Retentionszeit (t_R) und die fünf häufigsten Massenfragmente sind angegeben.

Peak Nr.	t_R [min]	Massenspektrometrische Daten [m/z] (Rel. Abundanz [%])
1	7,78	57 (100), 56 (67), 55 (55), 70 (43), 98 (40)
2	9,63	108 (100), 77 (94), 51 (61), 78 (59), 92 (51)
3	10,62	65 (100), 136 (42), 77 (36), 64 (36), 121 (31)
4	14,84	57 (100), 82 (78), 56 (65), 69 (64), 96 (59)
5	16,38	57 (100), 82 (93), 55 (70), 56 (69), 81 (65)
6	17,83	82 (100), 57 (99), 55 (77), 69 (71), 56 (71)
7	19,68	57 (100), 82 (98), 55 (72), 96 (66), 68 (64)
8	22,17	82 (100), 57 (81), 55 (66), 96 (63), 81 (57)

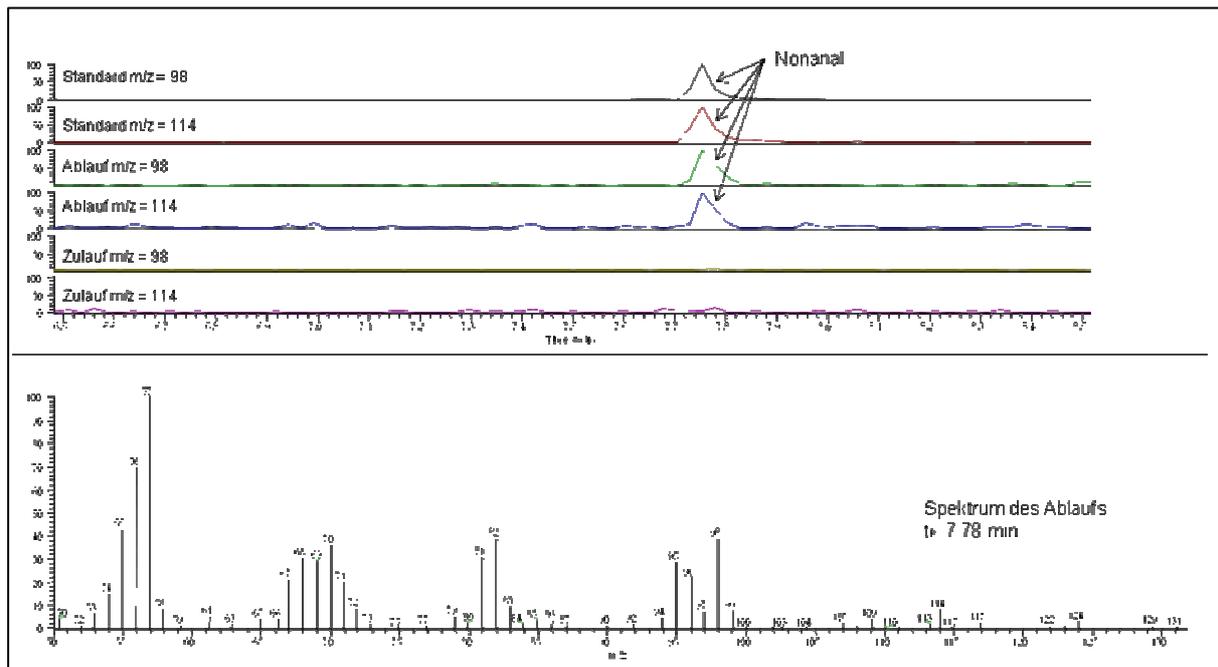
Zur Verifizierung der Substanzen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe einer Spektren-Bibliothek konnten Substanzvermutungen für bestimmte Transformationsprodukte konkretisiert werden. Schließlich folgte der direkte Vergleich mit einem Standard, um durch Übereinstimmung von Retentionszeit und Massenspektrum ein Transformationsprodukt eindeutig identifizieren zu können. Ein Transformationsprodukt aus Vorgängerprojekten wurde ebenfalls bestätigt und im Folgenden gezeigt.

Im Vergleich der vermuteten Transformationsprodukte aus Tabelle 4-2 mit käuflich erworbenen Referenzsubstanzen (Standards) konnte lediglich das Transformationsprodukt Nonanal an Hand der Retentionszeit und der spezifischen Massenfragmente verifiziert werden. Die anderen vermuteten Transformationsprodukte konnten entweder nicht als Standards bestellt werden oder die Retentionszeiten der Standards erwiesen sich im Vergleich zum untersuchten Ablaufextrakt als nicht identisch.

Tabelle 4-3: Liste der vermuteten Transformationsprodukte aus Tabelle 4-2 und deren Verifizierung mittels Spektrendatenbank.

Peak Nr.	t _R [min]	Substanzvermutung	Verifizierung möglich
1	7,78	Nonanal	verifiziert
2	9,63	Benzene, 1-ethoxy-4-methyl	nicht lieferbar
3	10,62	Diazene, methylphenyl-, 2-oxide	nicht lieferbar
4	14,84	Undecanal	falsifiziert durch Retentionszeit
5	16,38	Tetradecanal	nicht lieferbar
6	17,83	Pentadecanal	nicht lieferbar
7	19,68	Hexadecanal	nicht lieferbar
8	22,17	Octodecanal	nicht lieferbar

In Abbildung 4-10 werden die Chromatogramme des gemessenen Nonanal-Standards mit dem Ablauf- und Zulaufextrakt von Probenahme Nr. 3 (Ozonung mit 5 mg/L) bei m/z = 98 und 114 verglichen. Es ist ersichtlich, dass Nonanal erst im Ablauf (vergleiche Abbildung 4-8 Peak 1) detektiert worden ist und dass die Retentionszeit mit der des Standards übereinstimmt. Das Massenspektrum zeigt die Ablaufprobe bei einer Retentionszeit von 7.78 min.



4.4.2 Massenspektrometrisches LC-MS-Screening (4.1; 4.2)

Die analytischen Messungen wurden mit den in AP 1 aufkonzentrierten Abwasserproben durchgeführt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Punktwolkendarstellungen möglicher Transformationsprodukte nach Ozonung bei unterschiedlichen Einstellungen der Ozondosierungen und Steuerung an der Kläranlage Bad Sassendorf. In dieser Darstellung wurden die gemessenen m/z -Werte der Proben vor Ozonung und die einer unbelasteten Probe (Blindprobe) bereits subtrahiert. Zur Auswertung der im Ozonbehandlungsprozess entstandenen Transformationsprodukte wurde das Verfahren der Mustererkennung (sog. pattern-recognition) angewendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-12 bis Abbildung 4-15 für die verschiedenen durchgeführten Ozoneinstellungen auf der Kläranlage dargestellt und zeigen bei möglichen Transformationsprodukten kleine Unterschiede im m/z -Verhältnis, der gemessenen Retentionszeit und in der Anzahl an. Eine Korrelation der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Anlagensteuerung konnte nicht festgestellt werden.

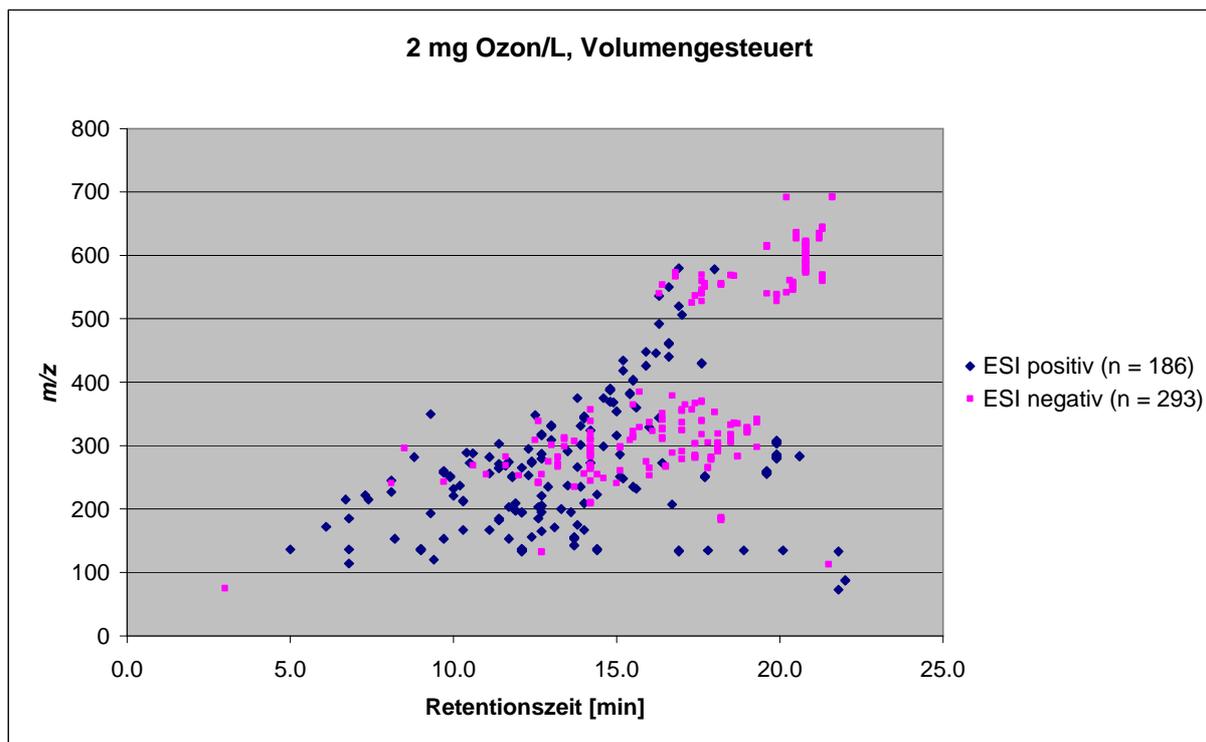


Abbildung 4-12: Darstellung der im positiven ($n = 186$) und negativen ($n = 293$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (erste Versuchseinstellung, 2 mg/L Ozon, volumengesteuert).

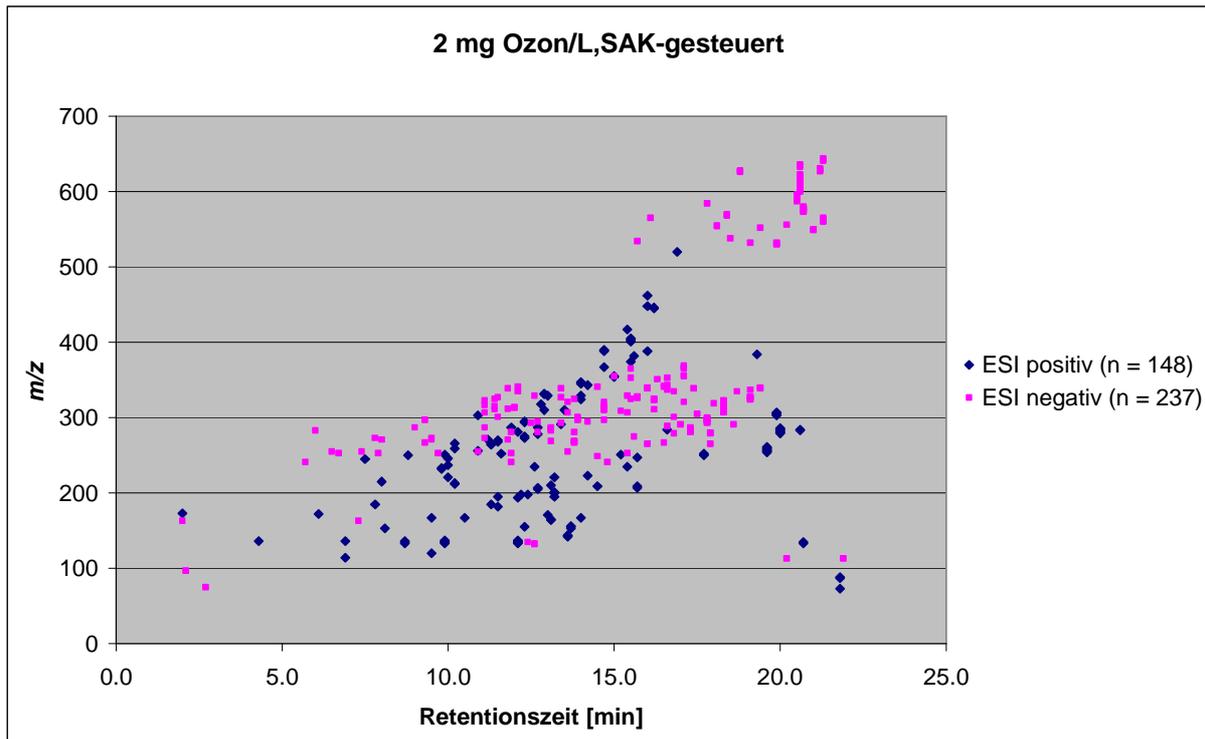


Abbildung 4-13: Darstellung der im positiven (n = 148) und negativen (n = 237) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (zweite Versuchseinstellung, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert).

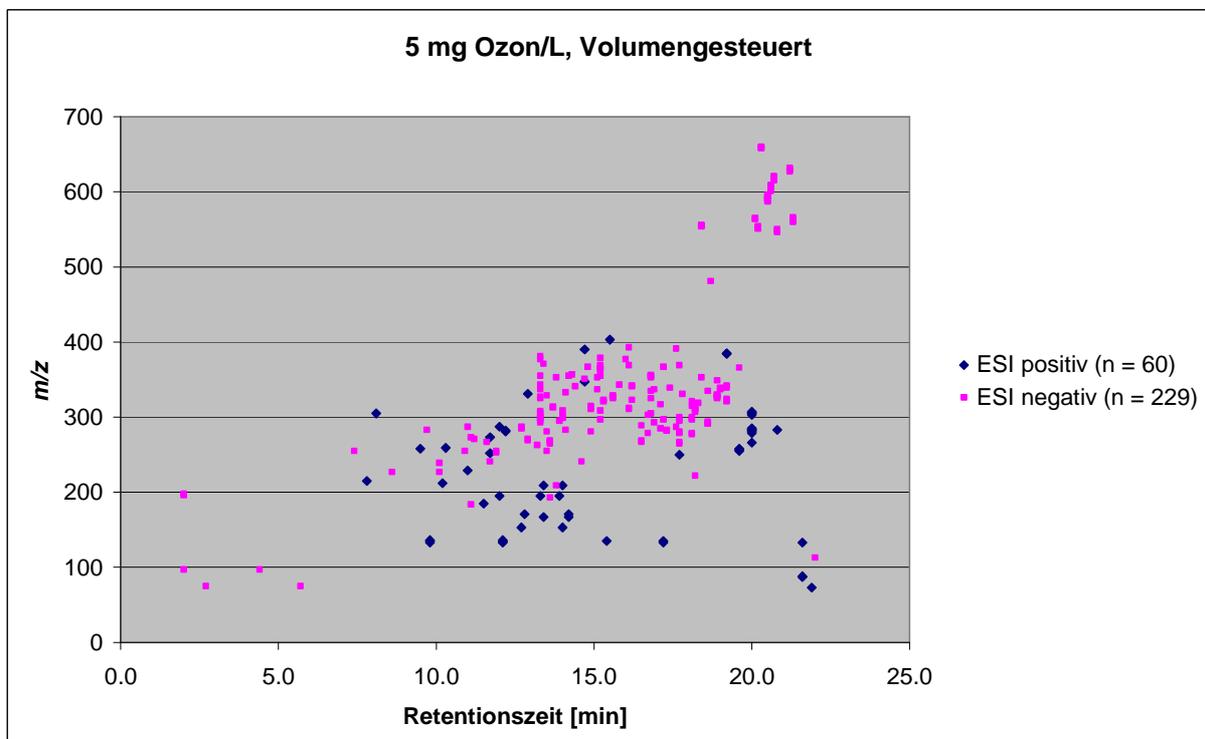


Abbildung 4-14: Darstellung der im positiven (n = 60) und negativen (n = 229) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (dritte Versuchseinstellung, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert).

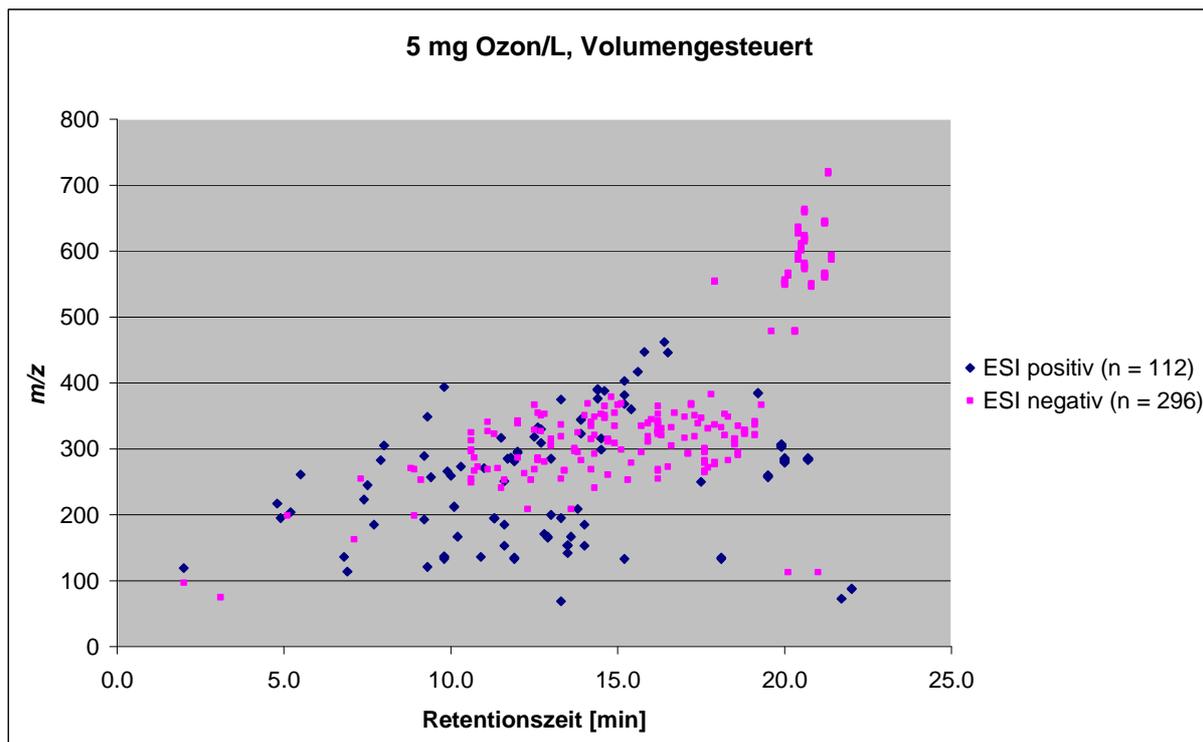


Abbildung 4-15: Darstellung der im positiven ($n = 112$) und negativen ($n = 296$) Ionisationsmodus ermittelten möglichen Transformationsprodukte der Ozonung des Ablaufs der Kläranlage Bad Sassendorf (vierte Versuchseinstellung, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert).

Alle dargestellten Punkte stellen Veränderungen und somit möglicherweise entstandene Transformationsprodukte zu den Proben vor der Ozonung dar. Ob es sich bei den einzelnen Punkten tatsächlich um relevante Transformationsprodukte handelt, kann anhand der bisher vorliegenden Auswertungen noch nicht bestätigt werden. Zur Verifizierung und Korrelation der Ergebnisse sind Wiederholungsuntersuchungen sowie die Prüfung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N) aller einzelnen Punkte (Peaks) und der erhaltenen Produktionenspektren notwendig. Der Abgleich mit der im IGF-Forschungsvorhaben „Oxidationsnebenprodukte“ entwickelten Datenbank zu Transformationsprodukten ergab zu dort enthaltenen Literaturangaben bei etwa 40-77 % der Verbindungen Übereinstimmungen des Masse-zu-Ladungsverhältnisses mit den Messwerten. Jedoch konnten alleine anhand von m/z und Retentionszeit keine Übereinstimmungen zu den im Rahmen des IGF-FV „Oxidationsnebenprodukte“ am IUTA identifizierten Transformationsprodukten gefunden werden. Da die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Messungen nur mit einer Einheitsmassenauflösung durchgeführt wurden, ist eine Verifizierung dieser Auswertungsergebnisse nur durch den Abgleich der Retentionszeit mit einem Referenzstandard oder weitergehender Analysen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (z. B. am ISA) möglich. Entsprechend dem Projektansatz war dies allerdings nicht für alle gefundenen Transformationsprodukte, sondern nur bei toxikologisch

auffälligen Proben der Fraktionierung geplant. Zur Veranschaulichung der Vorgehensweise zeigt Abbildung 4-16 a) beispielhaft die erfolgreiche Auswertung einer Komponente über das S/N-Verhältnis. Bei der Komponente mit m/z 200 handelt es sich wahrscheinlich um ein neues, im IGF-FV „Oxidationsnebenprodukte“ nicht betrachtetes, Transformationsprodukt. Diese Komponente konnte mit einem S/N-Verhältnis von 8,9 eindeutig in allen Extrakten detektiert werden. In Abbildung 4-16 b) ist das Massenspektrum zur Retentionszeit des Peaks mit m/z 200 abgebildet. Abbildung 4-16 c) zeigt das Fragmentierungsmuster des Vorläufer-Ions m/z 200. Für eine genauere Charakterisierung und Identifizierung dieser Komponente sind weiterführenden Untersuchungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie zur Ermittlung der Summenformel und Strukturaufklärung notwendig.

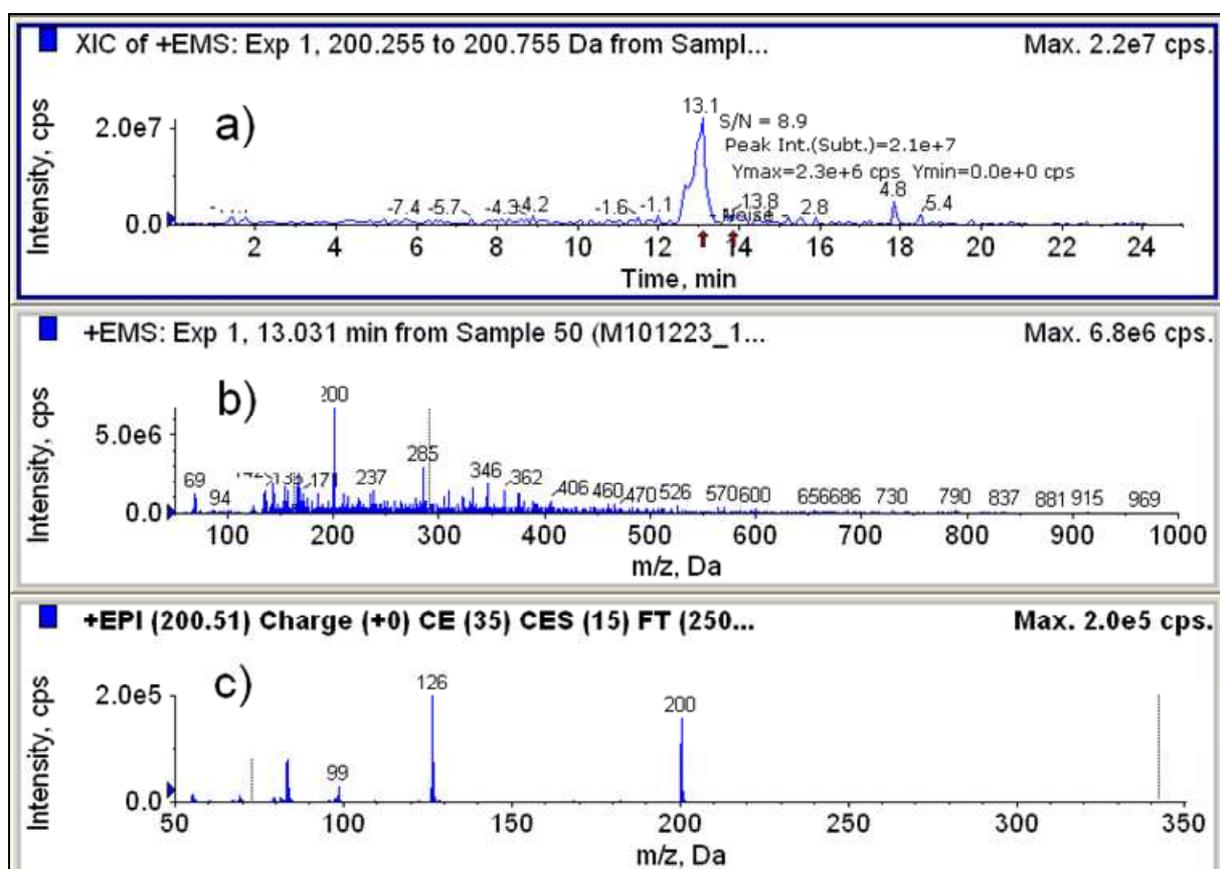


Abbildung 4-16: (a) Extrahiertes Chromatogramm für die Massenspur m/z 200 mit einem S/N-Verhältnisses von 8,9, b) Massenspektrum zur Retentionszeit des Peaks mit m/z 200 aus Abbildung 4-16 a), c) Fragmentierungsmuster des Peaks mit m/z von 200 aus der Abbildung 4-16 a)

Ob es sich bei dieser Komponente um ein relevantes Transformationsprodukt handelt, ist aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Untersuchung der fraktionierten Extrakte noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund positiver Ergebnisse bei den toxikologischen Untersuchungen der Abwasserproben wurde innerhalb der Projektgruppe abgestimmt, dass die Komponente mit m/z 200 entsprechend dem Projektansatz der toxizitätsorientierten

Identifizierung als potenziell relevantes Transformationsprodukt mittels hochauflösender Massenspektrometrie weiter aufgeklärt wird. Ebenfalls wurde für dieses Transformationsprodukt, durch Übertragung des spezifischen Fragmentierungsmuster eine sensitive und selektive Quantifizierungsmethode aufgebaut, um im Abwasser direkt die Bildung während der Ozonung und ggf. den Abbau beim Einsatz von weitergehenden Aufbereitungsmaßnahmen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln 4.4.3 und 4.4.4 dargestellt.

4.4.3 Strukturaufklärung (AP 5)

Die Strukturaufklärung der massenspektrometrisch ermittelten vermuteten Transformationsprodukte wurde am ISA durchgeführt. Hierzu wurden dem ISA seitens der UDE Konzentrate von Abwasserextrakten überlassen. Nach der Anpassung der chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen der Messmethode wurden die Extrakte einer chromatographischen Auftrennung unterworfen, um beispielhaft den weiter oben beschriebenen Stoff mit m/z -Verhältnis von 200 (positiv ionisiertes Molekülion) darzustellen. Dabei zeigte sich unter den Bedingungen der hochauflösenden Detektion, dass sich hinter dem Molekülion mit m/z 200 die Signale zweier, von der Masse her unterschiedlicher Stoffe (Monoisotope Massen: 200.07445 und 200.12877), verbargen, wie aus der erfolgreichen LC-Trennung in den XIC-Chromatogrammen in Abbildung 4-17 erkennbar ist.

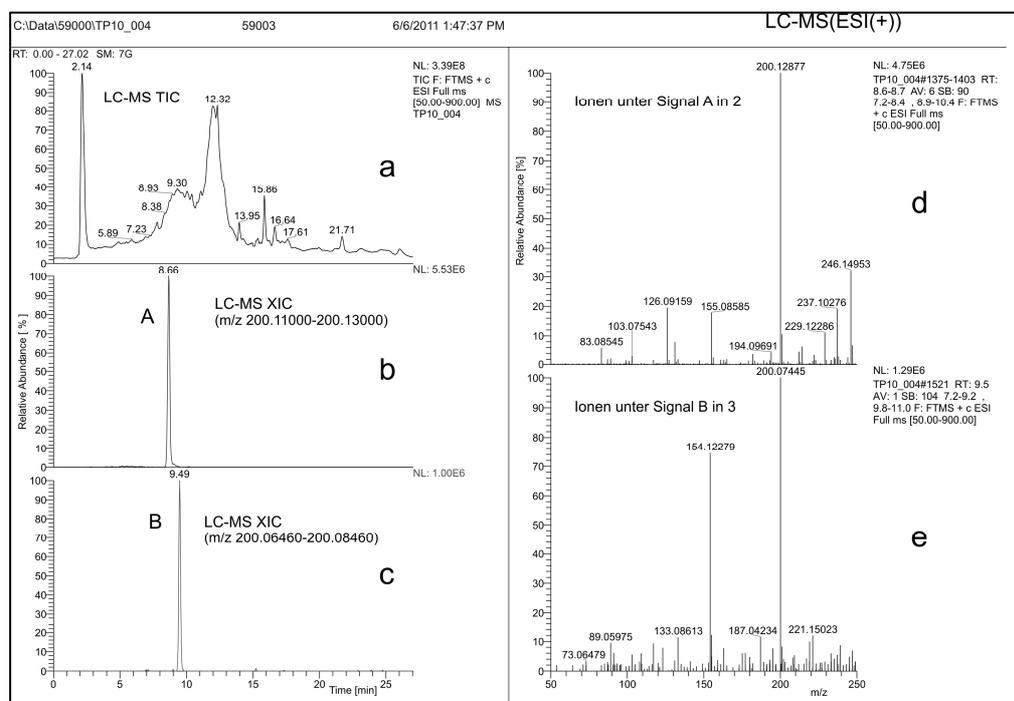


Abbildung 4-17: (a) ESI LC-MS TIC(+) des Extrakts mit toxikologisch positivem Respon, (b,c) XICs der relevanten Massenspuren, (d,e) Molekülionen mit m/z 200 (m/z 200,12877 bzw. 200, 07445) unter den Signalen A bzw. B der XICs in (b,c).

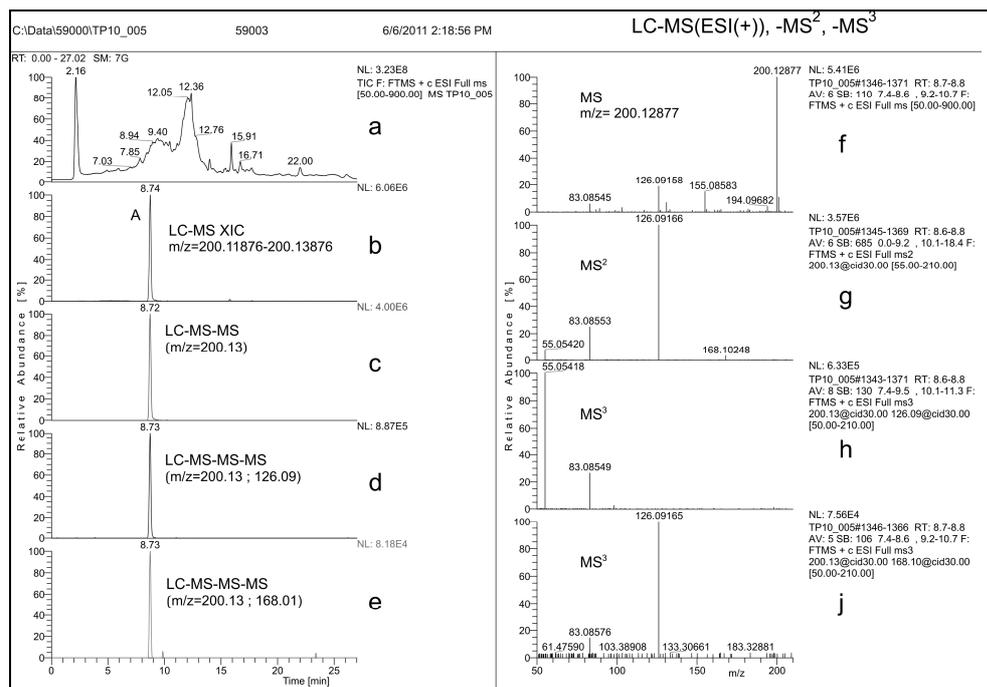


Abbildung 4-18: (a) LC-MS TIC(+) wie in Abb. 3-14 (a); (b) XIC der Massenspur m/z 200,12877 des Signals A und (f) des Massenspektrums wie in Abb. 3-14 (b bzw. d). (c) ESI LC-MS² Produkt-Ionenscan (CID) mit (g) zugehörigem MS²-Produkt-Ionenspektrum. (d,e) ESI LC-MS³ Produkt-Ionenscans (CID) der Fragmentionen m/z 126 aus (g) bzw. m/z 168 aus (g). (h,j) zugehörige MS³-Produkt-Ionenspektren.

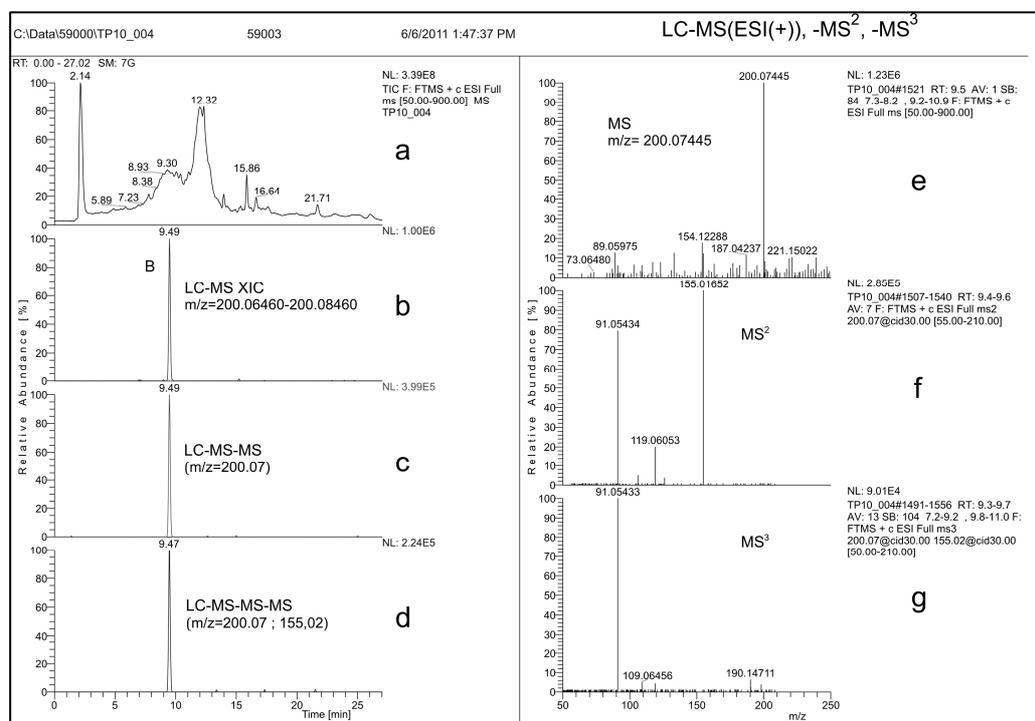
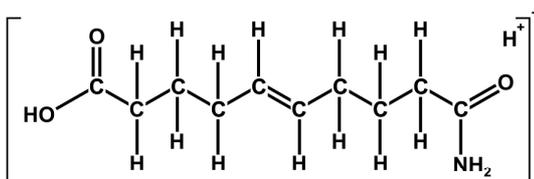
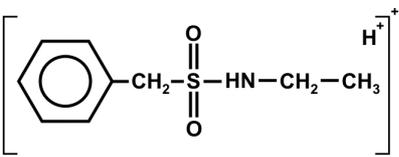
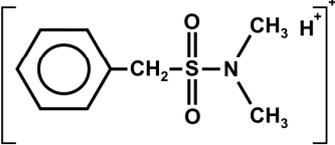
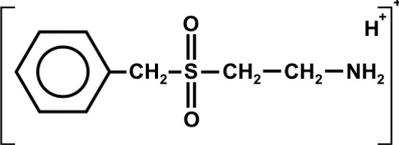
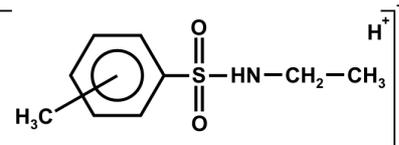
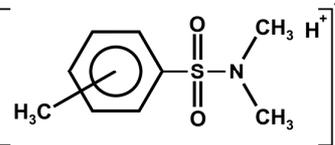
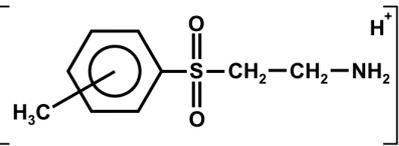


Abbildung 4-19: (a) LC-MS TIC, (b) XIC des Ions mit m/z 200, 07445, sowie (c) -MS² und (d) -MS³ Produkt-Ionenscans wie in Abb. 3-15 (a bzw. b bzw. c bzw. d) mit zugehörigen MS-Spektrum (e) sowie (f) MS²- und (g) MS³-Produkt-Ionenspektren des Molekülions mit m/z 200 bzw. Produkt-Ion m/z 155 wie in Abb. 3-15.

Tabelle 4-4: Strukturformel, Summenformel, IUPAC-Name und monoisotope Masse der mittels Daten aus LC-MSⁿ-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_{mono}
I A		$[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_3]^+$ (E)-10-amino-10-oxodec-5-enoic acid [200.12877] ⁺
I B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ N-ethyl-1-phenylmethanesulfonamide [200.07445] ⁺
II B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ N,N-dimethyl-1-phenylmethanesulfonamide [200.07445] ⁺
III B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ 2-(benzylsulfonyl)ethanamine [200.07445] ⁺
IV B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ N-ethyl-(X)-methylbenzenesulfonamide X = 1, 2 oder 3 [200.07445] ⁺
V B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ N,N,(X)-trimethylbenzenesulfonamide X = 1, 2 oder 3 [200.07445] ⁺
VI B		$[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{S}]^+$ 2-tosylethan-1-amine [200.07445] ⁺

Diese so aus dem Untergrund des TIC der Probe mit ihren extrahierten Ionenströmen herausgefilterten Molekülionen wurden im MSⁿ-Modus (n≥2-4) auf ihre Produkt-Ionen hin mittels exakter Masse analog [10-16] untersucht (siehe Abbildung 4-18 und Abbildung 4-19). Durch Kombination des Fragmentierungsverhaltens und der exakten Masseninformati on gelang sowohl die Ermittlung der Summenformeln und darüber hinaus auch der Strukturformeln beider Transformationsprodukte. Diese sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Die Strukturuntersuchungen mittels der "Exakten-Masse-Daten" und der CID-Untersuchungsergebnisse im MS-MS bzw. MS-MS-MS-Modus ergaben für das Ion mit m/z 200.12877 eine Summenformel von [C₁₀H₁₈NO₃]⁺, die daraus erstellte Struktur - ohne Verzweigungsmöglichkeiten in Betracht zu ziehen - wird in der Tabelle 4-4 unter der laufenden Nummer IA dargestellt.

Der Stoff mit der Ionenmasse m/z 200.07445 und der Summenformel [C₉H₁₄NO₂S]⁺ lässt aufgrund der Strukturvorschläge - Benzyl- bzw. Alkylaromaten-Struktur - und der Aminogruppe eine Reihe möglicher Strukturen zu, wie sie in Tabelle 4-4 unter IB-VIB gezeigt werden. Keine dieser Strukturen hat jedoch Ähnlichkeit mit den Ozonabbauprodukten des Sulfamethoxazols, wie sie von [10, 12] beschrieben wurden.

4.4.4 Semiquantitative Bestimmung (AP 6)

Die semiquantitative Bestimmung der im AP 5 charakterisierten Transformationsprodukte wurde entsprechend des Arbeitsplans erst im Anschluss an ihre strukturelle Aufklärung durchgeführt. Für diesen Zweck wurden mittels der angereicherten Extrakte des Abwassers eine sensitive und selektive analytische HPLC-MS/MS-Methode für die Detektion der beiden Transformationsprodukte mit der Einheits-Ionenmasse 200 m/z entwickelt. Die Geräteeinstellungen des Quadrupol-Massenspektrometers wurden anhand der im AP 5 ermittelten Massen und ihrer spezifischen MS/MS-Fragmente siehe Abbildung 4-17 vorgenommen. Dabei konnte die Substanz mit der Ionenmasse 200.12877 m/z und ihrer MS/MS-Fragmente 55,05418 m/z, 83,08549 m/z und 126,09166 m/z erfolgreich detektiert werden, während die weitere gefundene Ionenmasse 200.07445 m/z und ihre spezifischen Fragmente weder im positiven noch im negativen ESI-Modus detektiert werden konnte. Ebenfalls konnte bei der nachgebildeten chromatographischen Trennung der im AP 5 erarbeiteten chromatographischen Methode im Produktionsmodus keine weitere Substanz zu der in Abbildung 4-17 abgebildete Retentionszeit gefunden werden. Dieser Sachverhalt kann damit erklärt werden, dass das verwendete Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Waters, die Substanzen anders ionisiert als das im AP 5 verwendete Orbitrap-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific. Diese Diskrepanz ist durchaus bekannt und auf die unterschiedliche ESI-Quellengeometrie zurückzuführen. Deshalb wurde die analytische Methode nur für das Transformationsprodukt mit der Ionenmasse

200.12877 m/z etabliert. Die Messungen der Extrakte zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten bestätigen die Aussage aus AP 4, dass dieses spezifische Transformationsprodukt in allen Extrakten vorkommt.

Die Entwicklung einer semiquantitativen Methode benötigt eine Bezugssubstanz mit gleichen oder sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften. Jedoch weist die in AP 5 vorhergesagte Struktur noch mehrere mögliche Konstitutionsisomere auf, die durchaus sehr unterschiedliche chromatographische Eigenschaften vorweisen können und die Ionisation unterschiedlich beeinflussen, sodass eine Quantifizierung erschwert bzw. unmöglich wird. Deshalb wurde zum jetzigen Zeitpunkt davon Abstand genommen, die durch die Konstitutionsisomerie abgeleiteten Stoffe als Bezugssubstanzen zu erwerben bzw. aufwändig zu synthetisieren. Trotzdem kann mit der entwickelten sensitiven analytischen Methode die Bildung des Transformationsproduktes beim Einsatz von Ozon und ggf. während des Abbaus innerhalb der weitergehenden standortspezifischen Reinigungsstufe direkt im Abwasser im unteren Spurenbereich qualitativ verfolgt werden. Dieser Ansatz ist zu diesem Zeitpunkt des Projektes sicherlich ausreichend, um den Verbleib eines relevanten Transformationsproduktes zu untersuchen und kann mittels dieser etablierten analytischen Methode bei Bedarf sofort durchgeführt werden.

4.5 *In-vitro*-Untersuchungen (AP 7 und 8)

4.5.1 Östrogenität und Zytotoxizität (AP 7.1-7.2)

Zytotoxizität

Der Zytotoxizitätstest gibt Aufschluss darüber, ob eine Zellschädigung durch Wasserinhaltsstoffe ausgelöst wird. Durch den Einsatz des Multiparametertests sind Rückschlüsse auf die Art der Zellschädigung möglich. Die Kombination der hier verwendeten vier Testsysteme erlaubt es, sowohl die Vitalität der Zellen anhand der Membranpermeabilität (LDHe Test), der mitochondrialen Aktivität (XTT Test), der lysosomalen Aktivität (NR Test) als auch des Proteingehaltes (SRB Test) zu bestimmen.

Durch das Mitführen einer Matrixprobe (steriles Reinstwasser) bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei einer Verdünnung von 1:10 der Wasserprobe ins Medium keine Schädigung der Zellen durch den osmotischen Druck vorliegt, und somit Einflüsse der Matrix auf die Zellen ausgeschlossen werden können. Auch wurde ein Blindwert der Extraktion getestet, um hier mögliche Einflüsse auf die Methode auszuschließen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Kontrollen keine zytotoxischen Effekte aufweisen (Abbildung 4-20). Auch der hier nicht gezeigte LDHe Test ergab keinen Einfluss der Proben auf die Zellmembran.

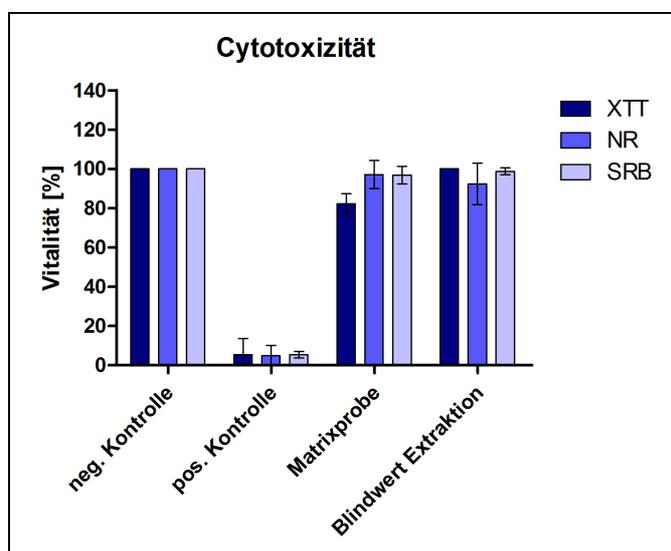


Abbildung 4-20: Zytotoxizität der Matrixprobe (Reinstwasser, Millipore) und der Blindwertprobe der Extraktion (n=3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass keine falsch positiven Werte durch Matrix- oder methodische Effekte zu beobachten waren.

Danach wurden die Zu- und Ablaufabwasserproben sowie die dazu entsprechenden Extrakte auf zellschädigende Effekte jeweils in dreifacher Ausführung untersucht. Die ersten Abwasserproben der Einstellung mit 2 mg/L Ozon und der Steuerung über den

Volumenstrom zeigen, dass bei den Extrakten sowohl im Zulauf als auch im Ablauf eine leichte Verringerung der Vitalität zu erkennen sind (Abbildung 4-21 a). Das gleiche Bild ergab sich bei der SAK-geregelten Ozon-Dosierung von 2 mg/L: beobachtet wurde eine leichte Abnahme der Anzahl vitaler Zellen in Extrakten von Zu- und Ablauf (Abbildung 4-21 b). Obwohl bei allen getesteten Einstellungen die XTT, NR und SRB Tests eine Verringerung der Vitalität ergaben, waren beim LDHe Test keine Einflüsse auf die Zellmembran nachzuweisen (Abbildung 4-21 b, Daten für LDHe nicht gezeigt). Abbildung 4-21 c zeigt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen der Proben (Abwasser und Extrakte) mit der Einstellung 5 mg/L Ozon volumengesteuert. Hier ist zu erkennen, dass eine Exposition sowohl gegen die direkten Abwasserproben, als auch gegen die Abwasserextrakte keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Die Einstellung mit 5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert zeigte, dass der Extrakt des Zulaufes im Vergleich zur direkten Abwasserprobe eine Verringerung der Vitalität zur Folge hat, was auf toxische Inhaltsstoffe schließen lässt. Bei beiden Abwasserproben des Ablaufes ist keine Reduzierung der Anzahl vitaler Zellen zu erkennen (Abbildung 4-21 d). Dies lässt vermuten, dass durch die eingesetzte Ozonung ein Abbau toxischer Inhaltsstoffe im Zulauf stattfand.

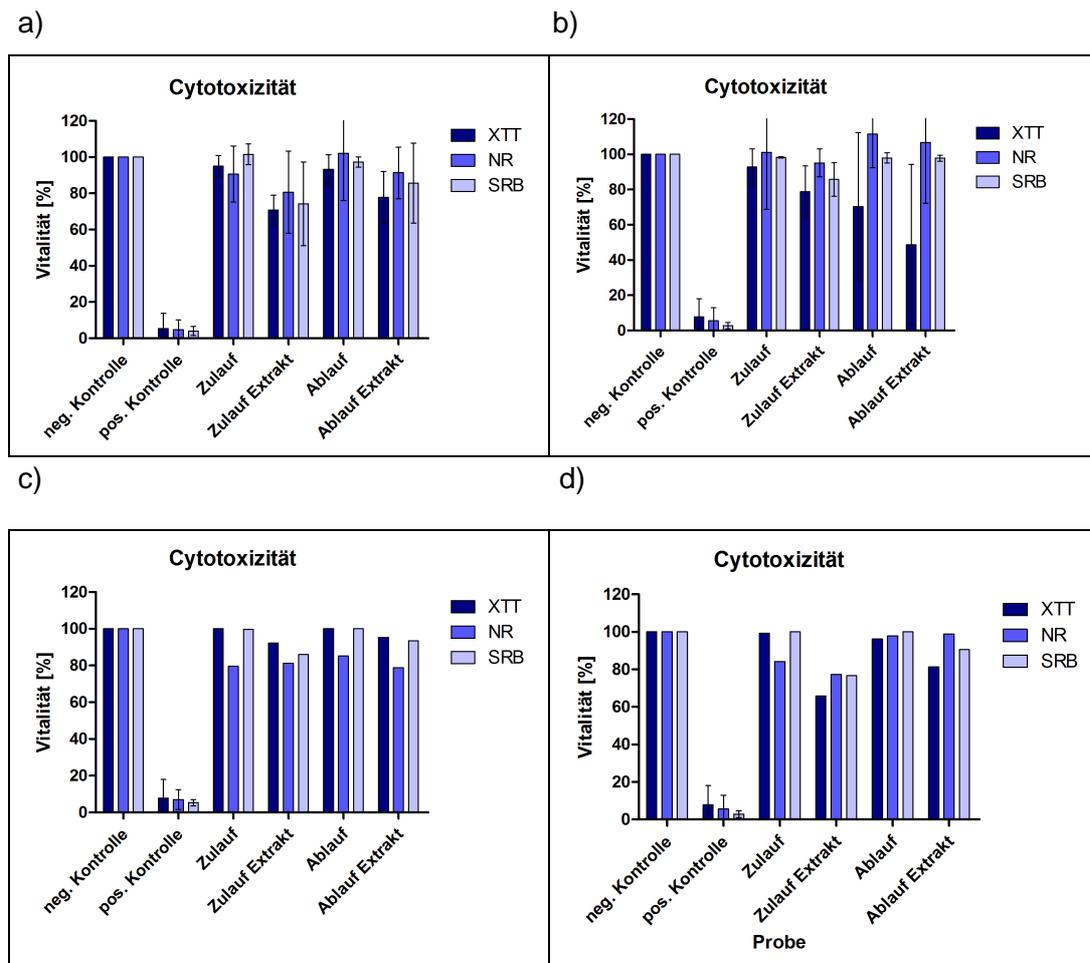


Abbildung 4-21: Untersuchung der Zytotoxizität: a) 2 mg/L Ozon volumengesteuert. b) 2 mg/L Ozon SAK-gesteuert. c) 5 mg/L Ozon volumengesteuert. d) 5 mg/L Ozon SAK-gesteuert.

Östrogenität

Die getesteten Abwasserproben sind weiterhin auf östrogene Wirksamkeit überprüft worden. Dazu werden T47D-Zellen eingesetzt, die zunächst auf eine allgemeine Zellschädigung durch Abwasserinhaltsstoffe untersucht werden müssen. Hierfür wurde der MTT-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass keine der getesteten Proben (Abwasser und Extrakte) zytotoxische Effekte an T47D-Zellen aufweist (Abbildung 4-22). Allerdings resultierte die Exposition gegenüber der mit 2 mg/L Ozon behandelten SAK-gesteuerten Probe in einer erhöhten Zellzahl, was darauf schließen lässt, dass Substanzen in der Probe enthalten sind, die proliferationsfördernd wirken. Die Ergebnisse der Östrogenitätsmessungen sind in Tabelle 4-5 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass bei allen vier Probenahmen die Werte der Östrogenität stark schwanken (0 – 11,3 pM ER Calux EEQ). Diese Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Zeitpunkte der Probenahme erklären. Auch zeigen die Ergebnisse, dass sowohl nach der volumengesteuerten Ozonung mit 2 mg/L Ozon als auch nach der SAK-gesteuerten Ozonung mit 5 mg/L Ozon, die östrogene Aktivität des Abwassers sowie der Extrakte zunimmt, was auf die Bildung

östrogen aktiver Transformationsprodukte schließen lässt. Im Gegensatz dazu nimmt die Östrogenität bei den beiden anderen Einstellungen ab, d. h. in diesem Falle konnten durch den Einsatz von Ozon im Zulauf vorhandene östrogen aktive Transformationsprodukte inaktiviert werden, wie es in den meisten in der Literatur erfassten Untersuchungen der Fall ist. Aber auch der in den erstgenannten Proben gefundene gegenläufige Trend der Bildung östrogen aktiver Substanzen durch den Einsatz von Ozon wurde bereits in der Literatur beschrieben [51].

Die Analyse einiger Extrakte ergab, dass im Vergleich zu den originalen Abwasserproben eine geringere Östrogenität vorliegt. Ein Grund dafür kann die Extraktionsmethode sein. Hierbei kann es dazu kommen, dass östrogen aktive Substanzen nicht angereichert werden können, und somit nicht in den Extrakten vorliegen.

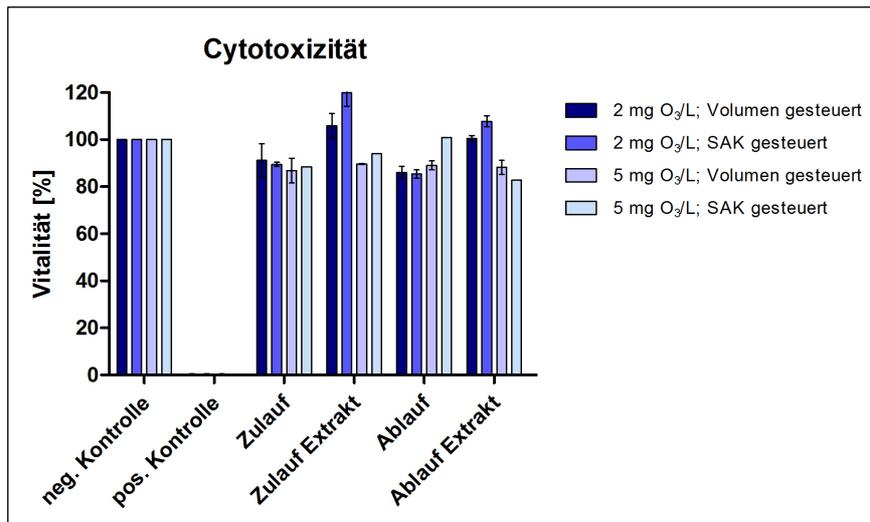


Abbildung 4-22: Zytotoxizität der verschiedenen Abwasserproben, getestet an T47D Zellen

Tabelle 4-5: Ergebnisse der Östrogenitätsmessung (pM ER Calux EEQ) mittels ER Calux. Die Zahlen in den Klammern stellen die Werte für den jeweiligen Extrakt dar.

2 mg/L Ozon		
Probe	Volumengesteuert	SAK-gesteuert
Zulauf	5,5 (1,9)	11,3 (1,8)
Ablauf	10,1 (2,5)	0 (0,5)
5 mg/L Ozon		
Probe	Volumengesteuert	SAK-gesteuert
Zulauf	0,5 (1,5)	0 (0,5)
Ablauf	0 (1,9)	0,7 (0,9)

4.5.2 Genotoxizität (AP 8)

Ames-Test

Der Ames-Test wurde mit den Salmonellen-Stämmen *Salmonella typhimurium* TA98 und TA100 durchgeführt. Zur Bestimmung des genotoxischen Potenzials wurde die sogenannte Induktionsdifferenz herangezogen. Die Induktionsdifferenzen der Testansätze, die beim Teststamm TA98 größer als 20, bzw. beim Teststamm TA100 größer als 80 waren, werden in Tabelle 4-6 bis Tabelle 4-18 mit „pos“ gekennzeichnet. Ein „neg“ bedeutet eine Induktionsdifferenz unterhalb der definierten Schwellenwerte. Wird bei einem Teststamm eine erhöhte Induktionsdifferenz (> Schwellenwert) und eine Wirkungs-Dosis-Abhängigkeit festgestellt, deutet dies auf eine mutagene Aktivität der untersuchten Probe hin.

Die Tabellen mit den vollständigen Messwerten sind im Anhang angefügt.

Alle Untersuchungen wurden mit den direkten Abwässern und deren Extrakten durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurde die Extraktion der Abwasserproben mittels einer Blindprobe (siehe Kapitel 4.1) getestet, um einen Einfluss der Aufkonzentrierungsmethode auf das Testsystem ausschließen zu können. Die Blindprobe der Extraktion lieferte in beiden Teststämmen keine Hinweise auf erhöhte Genotoxizität (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Blindprobe der Extraktion im Ames-Test.

	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Blank	0,5	neg	neg	neg	neg
Blank	1	neg	neg	neg	neg
Blank	2	neg	neg	neg	neg
Blank	4	neg	neg	neg	neg
Blank	8,5	neg	neg	neg	neg

Ergebnisse des Ames-Testes

Tabelle 4-7: Probenahme 1 vom 20.10.2010, 2 mg/L Ozon, volumengesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.

Zulauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044015	0,01	neg	neg	neg	neg	1044015E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044015	0,02	neg	neg	neg	neg	1044015E	1	neg	neg	neg	neg
1044015	0,04	neg	neg	neg	neg	1044015E	2	neg	neg	neg	neg
1044015	0,07	neg	neg	neg	neg	1044015E	4	neg	neg	neg	neg
1044015	0,17	neg	neg	neg	neg	1044015E	8,5	neg	neg	neg	neg
Ablauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044016	0,01	neg	neg	neg	neg	1044016E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044016	0,02	neg	neg	neg	neg	1044016E	1	neg	neg	neg	neg
1044016	0,04	neg	neg	neg	neg	1044016E	2	neg	neg	neg	neg
1044016	0,07	neg	neg	neg	neg	1044016E	4	neg	neg	neg	neg
1044016	0,17	neg	neg	neg	neg	1044016E	8,5	neg	neg	neg	neg

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, pos: positiver Befund, neg: unauffällig

Tabelle 4-8: Probenahme 2 vom 03.11.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.

Zulauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044524	0,01	neg	neg	neg	neg	1044524E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044524	0,02	neg	neg	neg	neg	1044524E	1	neg	neg	neg	neg
1044524	0,04	neg	neg	neg	neg	1044524E	2	neg	neg	neg	neg
1044524	0,07	neg	neg	neg	neg	1044524E	4	neg	neg	neg	neg
1044524	0,17	neg	neg	neg	neg	1044524E	8,5	neg	neg	neg	neg
Ablauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044537	0,01	neg	neg	neg	neg	1044537E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044537	0,02	neg	neg	neg	neg	1044537E	1	neg	neg	neg	neg
1044537	0,04	neg	neg	neg	neg	1044537E	2	neg	neg	neg	neg
1044537	0,07	neg	neg	neg	neg	1044537E	4	neg	neg	neg	neg
1044537	0,17	neg	neg	neg	neg	1044537E	8,5	neg	neg	neg	neg

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, pos: positiver Befund, neg: unauffällig

Tabelle 4-9: Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, volumengesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.

Zulauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044531	0,01	neg	neg	neg	neg	1044531E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044531	0,02	neg	neg	neg	neg	1044531E	1	neg	neg	neg	neg
1044531	0,04	neg	neg	neg	neg	1044531E	2	neg	neg	neg	neg
1044531	0,07	neg	neg	neg	neg	1044531E	4	neg	neg	neg	neg
1044531	0,17	neg	neg	neg	neg	1044531E	8,5	neg	neg	neg	neg
Ablauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044544	0,01	neg	neg	neg	neg	1044544E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044544	0,02	neg	neg	neg	neg	1044544E	1	neg	neg	neg	neg
1044544	0,04	neg	neg	neg	neg	1044544E	2	neg	neg	neg	neg
1044544	0,07	neg	pos	neg	neg	1044544E	4	neg	neg	neg	neg
1044544	0,17	neg	neg	neg	neg	1044544E	8,5	neg	neg	neg	neg

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, pos: positiver Befund, neg: unauffällig

Tabelle 4-10: Probenahme 4 vom 23.11.2010, 5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.

Zulauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044533	0,01	neg	neg	neg	neg	1044533E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044533	0,02	neg	neg	neg	neg	1044533E	1	neg	neg	neg	neg
1044533	0,04	neg	neg	neg	neg	1044533E	2	neg	neg	neg	neg
1044533	0,07	neg	neg	neg	neg	1044533E	4	neg	neg	neg	neg
1044533	0,17	neg	neg	neg	neg	1044533E	8,5	neg	neg	neg	neg
Ablauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1044546	0,01	neg	neg	neg	neg	1044546E	0,5	neg	neg	neg	neg
1044546	0,02	neg	neg	neg	neg	1044546E	1	neg	neg	neg	neg
1044546	0,04	neg	neg	neg	neg	1044546E	2	neg	neg	neg	neg
1044546	0,07	neg	neg	neg	neg	1044546E	4	neg	neg	neg	neg
1044546	0,17	neg	neg	neg	neg	1044546E	8,5	neg	neg	neg	neg

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, pos: positiver Befund, neg: unauffällig

Tabelle 4-11: Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach konzentrierte Extrakte.

Zulauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1048044	0,01	neg	pos	neg	neg	1048044E	0,5	neg	pos	neg	neg
1048044	0,02	neg	pos	neg	neg	1048044E	1	neg	pos	neg	neg
1048044	0,04	neg	pos	neg	neg	1048044E	2	neg	pos	neg	neg
1048044	0,07	neg	pos	neg	neg	1048044E	4	neg	pos	neg	neg
1048044	0,17	neg	pos	neg	neg	1048044E	8,5	neg	pos	neg	neg
Ablauf											
Abwasser		Teststamm				Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9	Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
1048045	0,01	neg	neg	neg	neg	1048045E	0,5	neg	neg	neg	neg
1048045	0,02	neg	neg	neg	neg	1048045E	1	neg	neg	neg	neg
1048045	0,04	neg	neg	neg	neg	1048045E	2	neg	neg	neg	neg
1048045	0,07	neg	neg	neg	neg	1048045E	4	neg	neg	neg	neg
1048045	0,17	neg	neg	neg	neg	1048045E	8,5	neg	neg	neg	neg

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, pos: positiver Befund, neg: unauffällig

Die Proben (Abwasser und Extrakte) der Probenahmen 1, 2, und 4 waren in allen untersuchten Teststämmen unauffällig.

Die Abwasserproben der Probenahme 3 waren unauffällig. Es ergab sich lediglich einmal eine erhöhte Induktionsdifferenz im Ablauf bei einem Verdünnungsfaktor von 0,7, jedoch bei keiner weiteren Verdünnung (Probe Nummer 1044544; Stamm TA100 ohne S9-Mix). Die fehlende Dosisabhängigkeit weist auf einen Zufallsbefund und nicht auf eine toxische Wirkung hin. Eine erneute Untersuchung der Probe am 04.01.2011 ergab erwartungsgemäß keine Bestätigung des Befundes.

Die Abwasserproben der Probenahme 5 (Zulauf) zeigte in allen Verdünnungsstufen (Abwasser und Extrakte) positive Befunde im Teststamm TA100 ohne S9-Mix, jedoch nicht bei Zugabe von S9-Mix oder im Teststamm TA98. Im Ablauf wurden keine positiven Befunde sichtbar. Da auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes fehlte, ist nicht von einer mutagenen Wirkung der Probe auszugehen. Diese Probe wurde am 05.04.2011 erneut untersucht. Auch in dieser Probe ergab sich keine Bestätigung der erhöhten Induktionsdifferenzen im Stamm TA100 ohne S9-Mix (Zulauf und Ablauf).

Comet-Assay

Zur Bestimmung des Grades der DNA-Schädigung wurde das Olive-Tail-Moment (OTM) verwendet. Gezeigt werden die statistischen Lage- und Streuungsmaße des Olive-Tail-Moments (OTM) von Proben des Zulaufs und Ablaufs der Ozonungsanlage mit Inkubationszeiten von 1 Stunde und 24 Stunden in der Zellkultur inkl. der Positiv- und Negativkontrollen. Abweichungen des OTM von der Negativkontrolle bzw. zwischen den Proben aus Zu- und Ablauf wurden statistisch analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind fett in den nachfolgenden Tabellen hervorgehoben.

Methanolkonzentrationen im Vorversuch

Um Auswirkungen des Methanols in den Extrakten auf das Testsystem auszuschließen, wurden die Kulturzellen mit verschiedenen Konzentrationen (5 % - 20 % v/v) Methanol für 24 Stunden inkubiert. Bei 20 % Methanol wurde ein zytotoxischer Effekt beobachtet. Bei Methanolkonzentrationen bis 15 % (v/v) gab es keine Hinweise auf erhöhte DNA-Strangbruchraten. Im Versuch betragen die Methanolendkonzentrationen aus den Extrakten ca. 0,05 % v/v, sodass kein Effekt durch das Methanol zu erwarten war.

Ergebnisse im Comet-Assay

In den folgenden Tabellen und Abbildungen werden die Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay dargestellt. Die Zulaufprobe ist mit „Z“, die Ablaufprobe mit „A“ und die Extrakte aus Zu- und Ablauf sind zusätzlich mit „E“ gekennzeichnet. Die Inkubationszeiten für Abwasser und Extrakte betragen jeweils 1 h und 24 h.

Probenahme 1 (2 mg/L Ozon, volumengesteuert)

Die Lage- und Streuungsmaße des OTM lagen in allen Ansätzen in etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle, unabhängig davon, ob Abwasser oder die Extrakte verwendet wurden. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte des OTM zwischen Zulauf und Ablauf oder zwischen Zulauf/Ablauf und der Negativkontrolle wurden nicht festgestellt.

Tabelle 4-12: Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 1 vom 20.10.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p-Wert (Probe vs. Negativkontrolle)	p-Wert (Zulauf vs. Ablauf)
Z 1044015 1	153	0,84 ± 1,29	0,73	0,66
A 1044016 1	153	0,83 ± 1,12	0,96	
Z 1044015 24	153	0,73 ± 1,01	0,79	0,16
A 1044016 24	153	0,92 ± 1,14	0,22	
Z 1044015E 1	153	0,70 ± 1,00	0,59	0,48
A 1044016E 1	153	0,79 ± 0,99	0,87	
Z 1044015E 24	153	0,81 ± 1,08	0,96	0,66
A 1044016E 24	153	0,68 ± 0,91	0,64	
Negativkontrolle	153	0,73 ± 0,94		
Positivkontrolle	153	24,10 ± 19,20		

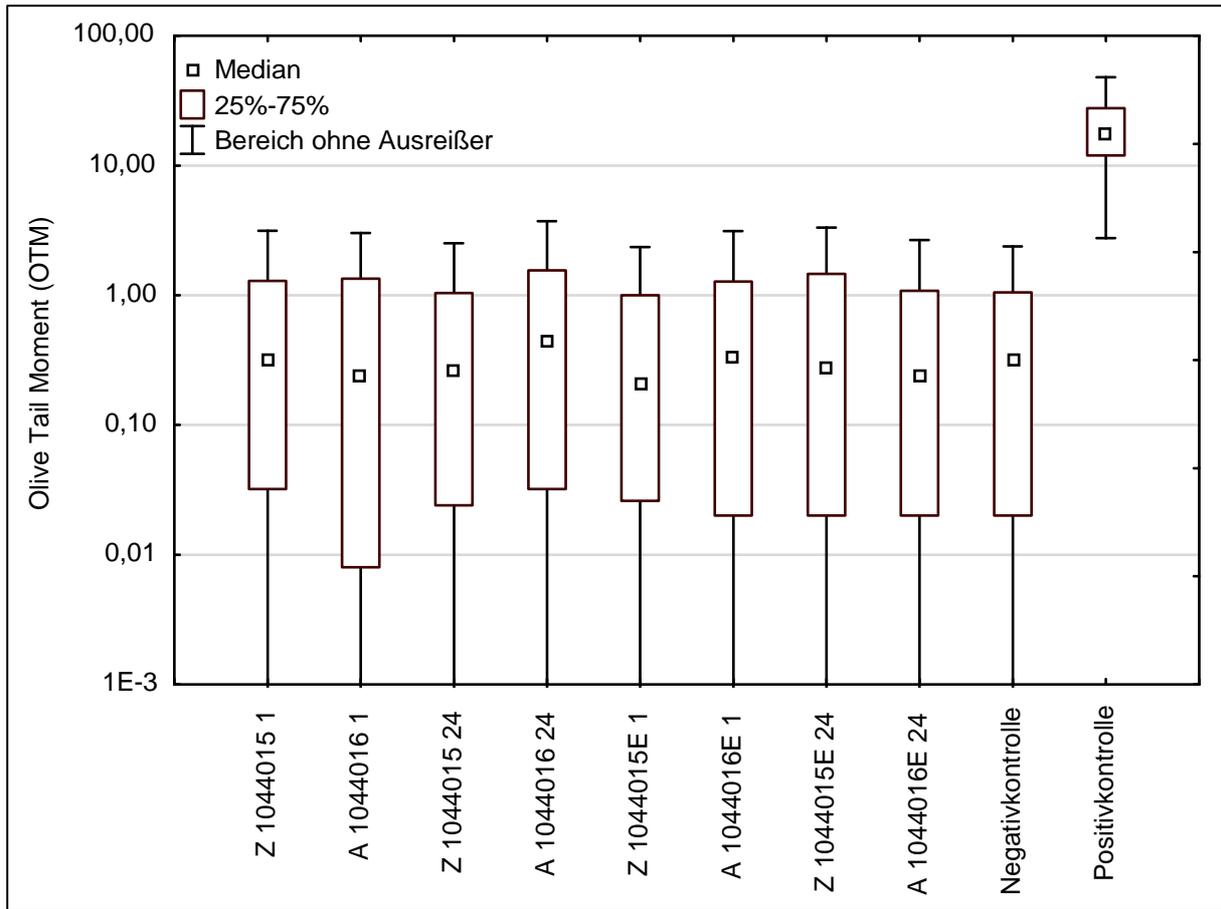


Abbildung 4-23: Olive-Tail-Moment der Probenahme 1 vom 20.10.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.

Probenahme 2 (2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert)

Die Lage- und Streuungsmaße des OTM lagen in allen Ansätzen in etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle, unabhängig davon, ob Abwasser oder die Extrakte verwendet wurden. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte des OTM zwischen Zulauf und Ablauf oder zwischen Zulauf/Ablauf und der Negativkontrolle wurden nicht festgestellt.

Tabelle 4-13: Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 2 vom 03.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p Probe vs. Negativkontrolle	p Zulauf vs. Ablauf
Z 1044524 1	153	1,10 ± 1,78	0,14	0,96
A 1044537 1	153	1,05 ± 1,49	0,99	
Z 1044524 24	153	1,35 ± 1,68	0,10	0,63
A 1044537 24	153	1,09 ± 1,34	0,81	
Z 1044024E 1	153	0,82 ± 1,07	0,19	0,63
A 1044537E 1	153	0,95 ± 1,23	0,17	
Z 1044024E 24	153	0,86 ± 1,09	0,26	0,12
A 1044537E 24	153	1,08 ± 1,43	0,07	
Negativkontrolle	153	1,05 ± 1,50		
Positivkontrolle	153	4,29 ± 4,62		

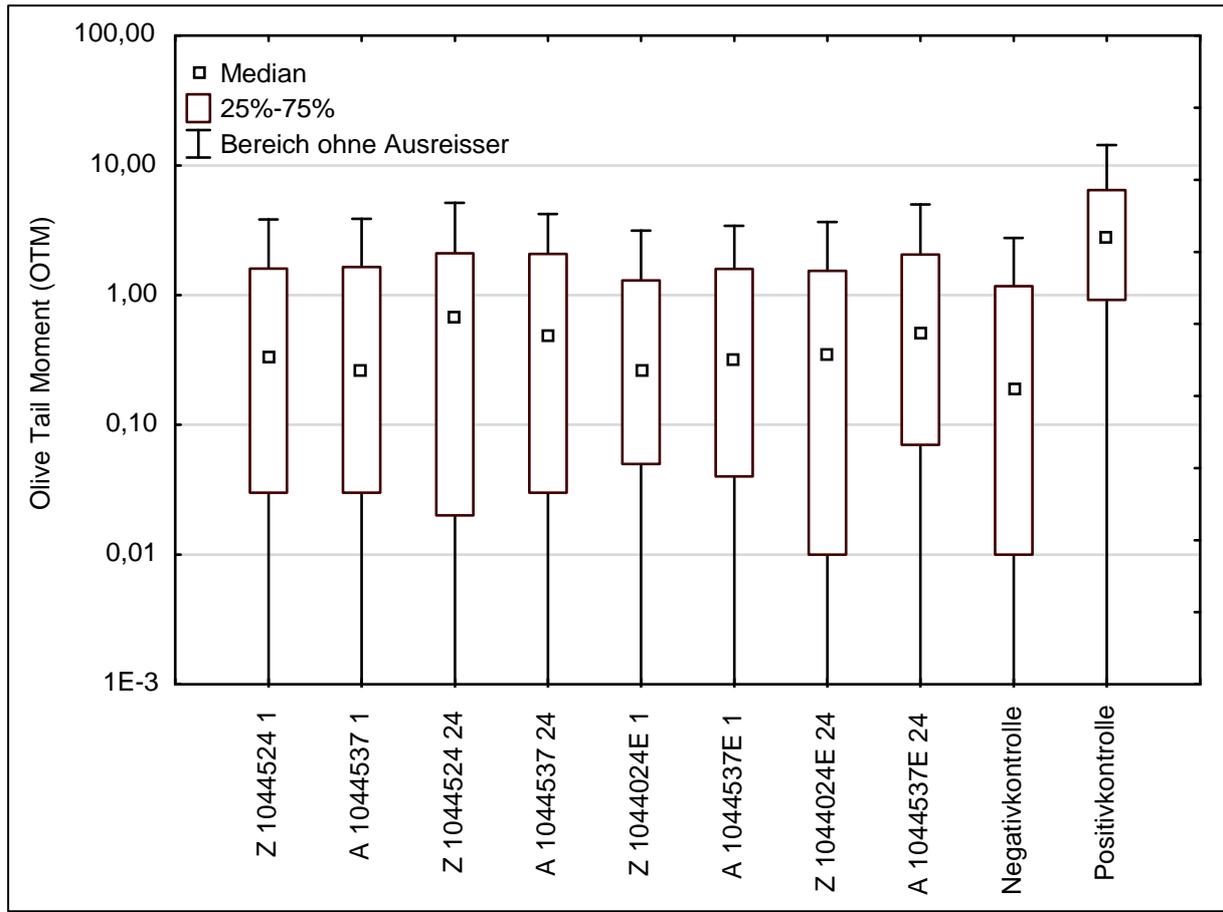


Abbildung 4-24: Olive-Tail-Moment der Probenahme 2 vom 03.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.

Probenahme 3 (5 mg/L Ozon, volumengesteuert)

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der Mittelwerte des OTM zwischen Zulauf und Ablauf und zwischen Ablauf und Negativkontrolle ($p < 0,001$) wurde in der Abwasserprobe bei 24 Stunden Inkubationszeit festgestellt. Dieser Effekt trat bei den untersuchten aufkonzentrierten Extrakten nicht auf.

Tabelle 4-14: Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 3 vom 18.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p-Wert (Probe vs. Negativkontrolle)	p-Wert (Zulauf vs. Ablauf)
Z 1044531 1	153	0,62 ± 0,79	0,78	0,40
A 1044544 1	153	0,56 ± 0,68	0,26	
Z 1044531 24	153	0,72 ± 1,06	0,55	0,0005
A 1044544 24	153	0,37 ± 0,52	0,009	
Z 1044531E 1	153	0,77 ± 1,02	0,36	0,88
A 1044544E 1	153	1,06 ± 2,08	0,45	
Z 1044531E 24	153	1,16 ± 2,76	0,77	0,28
A 1044544E 24	153	1,05 ± 2,16	0,16	
Negativkontrolle	153	0,72 ± 0,95		
Positivkontrolle	153	4,29 ± 4,62		

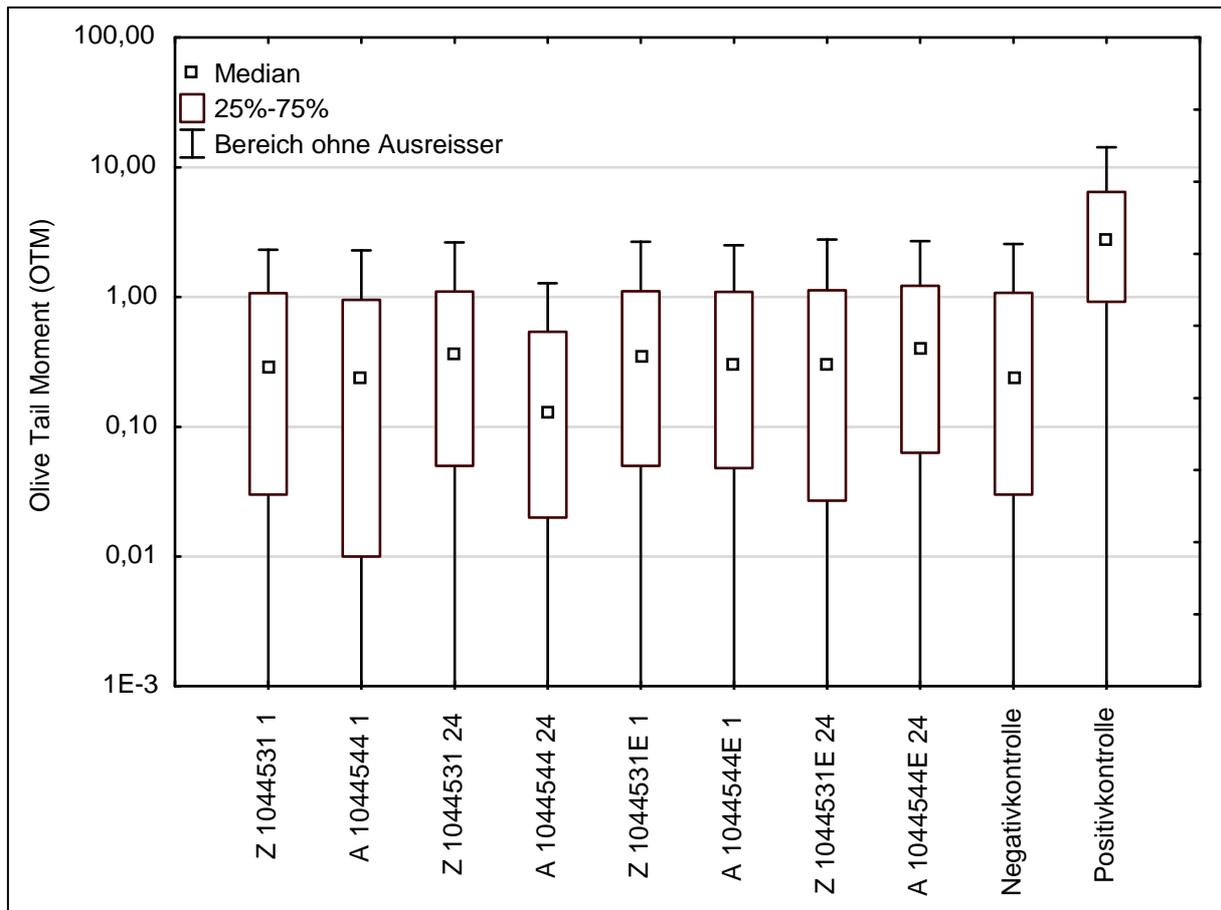


Abbildung 4-25: Olive-Tail-Moment der Probenahme 3 vom 18.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden, * $p < 0,001$ Zulauf / Ablauf, $p < 0,01$ Ablauf / Negativkontrolle.

Probenahme 4 (5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert)

Die Lage- und Streuungsmaße des OTM lagen in allen Ansätzen in etwa auf dem Niveau der Negativkontrolle, unabhängig davon, ob Abwasser oder die Extrakte verwendet wurden. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte des OTM zwischen Zulauf und Ablauf oder zwischen Zulauf/Ablauf und der Negativkontrolle wurden nicht festgestellt.

Tabelle 4-15: Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 4 vom 23.11.2010, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p-Wert (Probe vs. Negativkontrolle)	p-Wert (Zulauf vs. Ablauf)
Z 1044533 1	153	0,84 ± 0,90	0,25	0,52
A 1044546 1	153	0,92 ± 1,34	0,08	
Z 1044533 24	153	0,89 ± 1,13	0,74	0,27
A 1044546 24	153	0,73 ± 1,33	0,88	
Z 1044533E 1	102	0,88 ± 1,23	0,23	0,72
A 1044546E 1	153	0,82 ± 1,20	0,43	
Z 1044533E 24	153	0,76 ± 1,32	0,78	0,10
A 1044546E 24	153	0,98 ± 1,44	0,19	
Negativkontrolle	153	0,72 ± 0,95		
Positivkontrolle	153	4,29 ± 4,62		

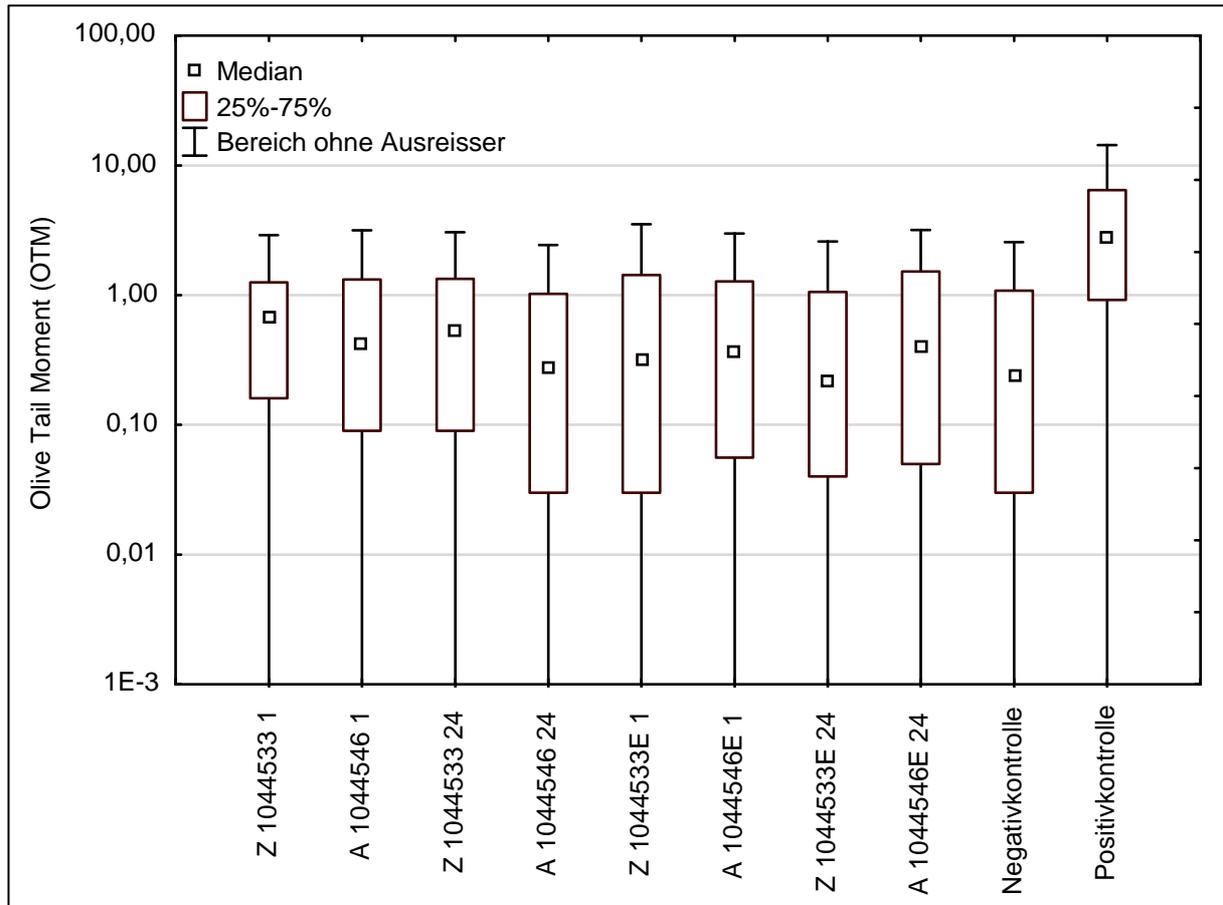


Abbildung 4-26: Olive-Tail-Moment der Probenahme 4 vom 23.11.2010, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden.

Probenahme 5 (2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert)

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) der Mittelwerte des OTM zwischen Zulauf und Ablauf und zwischen Zulauf und Negativkontrolle ($p < 0,05$) wurde in den Extrakten der Probe bei 24 Stunden Inkubationszeit festgestellt. Dieser Effekt wurde bei einer Wiederholung des Versuchs bestätigt ($p < 0,05$) (Tabelle 4-17).

Tabelle 4-16: Lage- und Streuungsmaße für das „Olive-Tail-Moment“ im Comet-Assay der Probenahme 5 vom 08.02.2011, Zulauf (Z)/ Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden (10%ig Abwasser / 50x Extrakte).

Probe	Anzahl gemessener Zellkerne	Mittelwert	p-Wert (Probe vs. Negativkontrolle)	p-Wert (Zulauf vs. Ablauf)
Z 1048044 1	153	1,06 ± 1,63	0,14	0,21
A 1048045 1	153	1,08 ± 1,28	0,26	
Z 1048044 24	153	1,00 ± 1,56	0,20	0,92
A 1048045 24	102	0,85 ± 1,08	0,23	
Z 1048044E 1	153	0,76 ± 1,05	0,55	0,37
A 1048045E 1	153	1,04 ± 1,64	0,19	
Z 1048044E 24	153	1,35 ± 1,65	0,004	0,03
A 1048045E 24	153	0,93 ± 1,09	0,30	
Negativkontrolle	153	0,82 ± 1,20		
Positivkontrolle	102	11,79 ± 13,54		

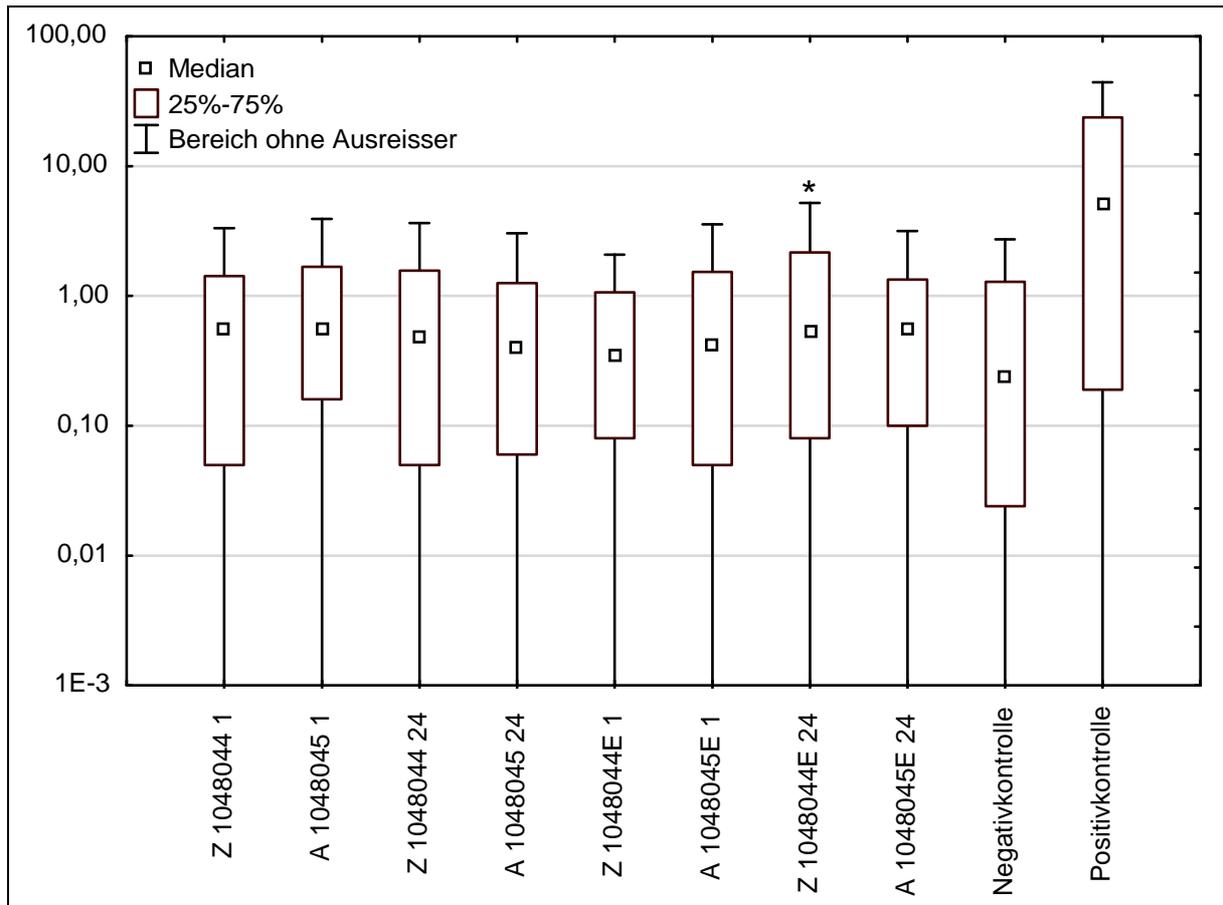


Abbildung 4-27: Olive-Tail-Moment der Probenahme 5 vom 08.02.2011, Zulauf (Z) / Ablauf (A) Ozonung, Inkubationszeiten 1 Stunde, 24 Stunden, * $p < 0,01$ Zulauf / Ablauf, $p < 0,05$ Zulauf / Negativkontrolle.

Tabelle 4-17: 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	0,001	0,003
A 1048045E 24	153	0,89 ± 1,06	0,67	
Negativkontrolle	153	0,85 ± 1,01		
Positivkontrolle	102	23,12 ± 10,61		

Die untersuchten Proben waren bis auf zwei Ausnahmen unauffällig im Ames-Test und Comet-Assay. Die Signifikanzunterschiede des Comet-Assay der Ablaufprobe nach 24-stündiger Inkubation (A 1044544 24) aus der Probenahme 3 (erniedrigte DNA-Strangbruchrate gegenüber Zulauf und Negativkontrolle) sind vermutlich ein zufälliges Ereignis, da dieser Effekt bei einer höheren Konzentration in den untersuchten 50-fach angereicherten Extrakten nicht gezeigt werden konnte.

Bei der Probenahme 5 war die Zulaufprobe im Comet-Assay nach 24-stündiger Inkubation (Z 1048044E 24) statistisch auffällig. Das OTM war sowohl zur dazugehörigen Ablaufprobe als auch zur Negativkontrolle signifikant erhöht ($p < 0,05$), jedoch nicht nach nur 1 h Inkubation. Bei der wiederholten Untersuchung konnte dieser Effekt bestätigt werden. Bei dieser Probe scheint es im aufkonzentrierten Extrakt nach längerer Inkubationszeit eine schwache Erhöhung der DNA-Strangbruchrate zu geben, die nach der Ozonbehandlung der Abwässer nicht mehr festgestellt wurde.

Auch im Ames-Test war diese Probe auffällig. Im Zulauf (Abwasser und Extrakt) zeigte sich eine erhöhte Mutationsrate für den Teststamm TA100 gegenüber der Negativkontrolle, jedoch konnte keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Im Wiederholungsversuch konnte eine Erhöhung der Induktionsdifferenz nicht bestätigt werden.

4.6 *In-vivo*-Untersuchungen (AP 9)

4.6.1 Ökotoxikologische *In-vivo*-Tests (9.1)

Nachfolgend werden die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Abwasserproben der Kläranlage Bad Sassendorf dargestellt. In allen durchgeführten Tests wurden die erforderlichen Gültigkeitskriterien eingehalten.

Zusätzlich zu der Testung der direkten Abwässer wurden im Algentest ebenfalls Extrakte der Abwasserproben nach Ozonung (Abläufe) untersucht, als Vorbereitung zur Untersuchung von unterschiedlichen Fraktionen, um eine Eingrenzung und wenn möglich eine Identifizierung der für die erhöhte Algentoxizität verantwortlichen Substanzen vornehmen zu können. Dazu musste zunächst der Algenwachstumshemmtest miniaturisiert werden. Die Ergebnisse der Miniaturisierung des Algentests werden im Folgenden im Kapitel a.1. vorgestellt.

a. DIN-Algenhemmtest mit *Desmodesmus subspicatus*

Im Algenhemmtest wurden toxische Wirkungen des Abwassers auf die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* beobachtet (Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29). Die Intensität der Hemmung war in den Ansätzen mit dem modifizierten Altenburger-Medium [35] deutlich stärker als im herkömmlichen Nährmedium nach DIN. Im DIN-Medium traten in drei der fünf durchgeführten Tests Wachstumsförderungen durch das Abwasser im Vergleich zur Mediumkontrolle auf (Abbildung 4-28), dies war vor allem im Zulauf der Ozonung der Fall. In beiden Nährmedien (DIN, Altenburger) war die Wachstumsrate der Algen im Ablauf der Ozonung stärker gehemmt als im Zulauf. Deutlich ausgeprägter war dieser Effekt im nährstoffreicheren Medium nach [35], da es in diesem optimierten Medium nicht zu Wachstumsförderungen durch im Abwasser enthaltene Nährstoffe im Vergleich zum Kontrollmedium kam.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abwasserproben nach Ozonbehandlung meist eine höhere toxische Wirkung aufweisen als das nicht ozonierte Abwasser (Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29). Dabei wurden bei der höheren Ozondosis von 5 mg/L stärkere Effekte auf die Algen beobachtet als bei der geringeren Ozondosis von 2 mg/L (Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29). Einen Gesamtüberblick über die G-Werte der Abwassertests gibt Tabelle 4-23. Die G-Werte für das Algenwachstum lagen im Altenburger-Medium in allen Ablaufproben bei 8 und größer, im DIN-Medium in drei Tests ebenfalls bei 8 und >8. Bereits im Zulauf der Ozonung wurde eine algentoxische Wirkung festgestellt, die sich im Altenburger-Medium in G-Werten von 8 und größer widerspiegelte, im DIN-Medium dagegen vermutlich durch Überlagerungseffekte aufgrund von wachstumsfördernden Nährstoffen im Abwasser nur G-Werte von maximal 4 erreichte.

Die Testergebnisse mit dem nährstoffreicheren Medium spiegeln daher besser die algentoxische Wirkung wider. Allerdings wurde in diesem nährstoffreicheren Medium in Ansätzen mit höheren Abwasseranteilen Ausfällungen beobachtet, die höchstwahrscheinlich durch zusätzliche Phosphate im Abwasser zu einer Überschreitung der Löslichkeit geführt haben. Unserer Einschätzung nach führt dies nicht zu einer Beeinträchtigung des Testverfahrens. Bei bisherigen Untersuchungen von Abwasserproben mit dem modifizierten Medium sind diese Störungen durch Ausfällungen nicht bekannt (nach Angaben des DIN AK Bioteste, der an der Optimierung des Mediums für den Algentest mitgearbeitet hat).

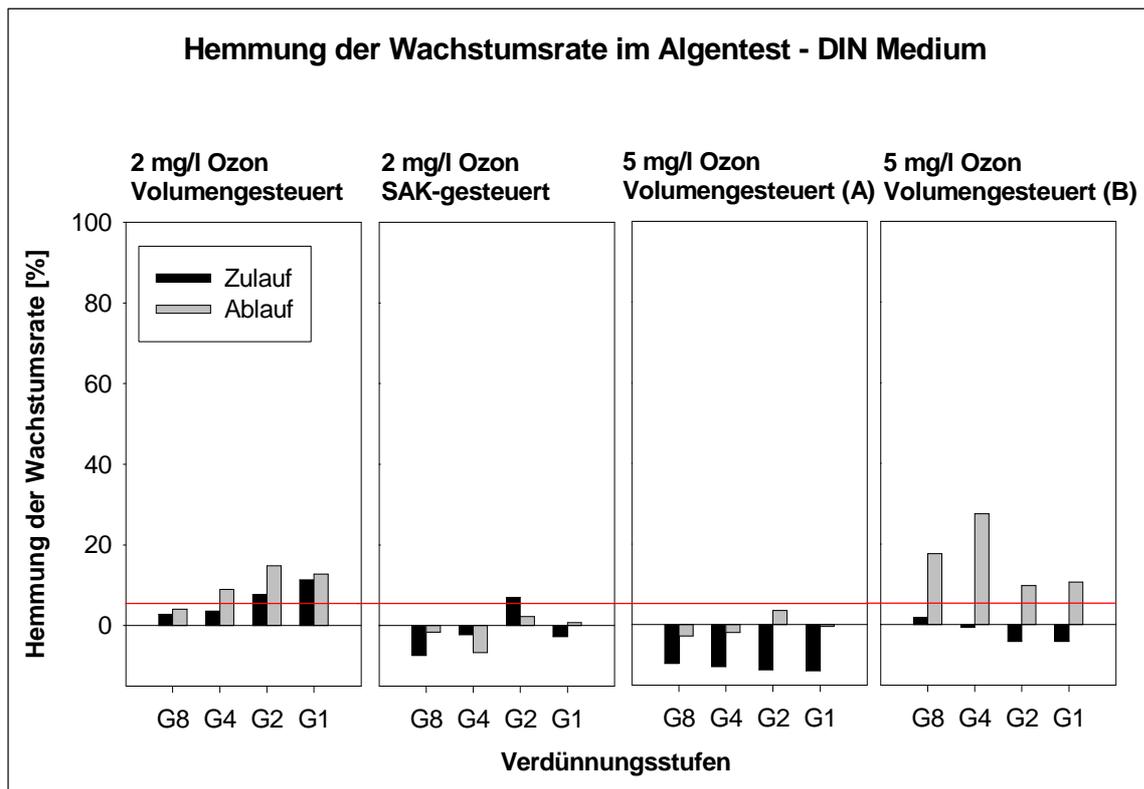


Abbildung 4-28: Ergebnisse des DIN-Algenhemmtests mit Rohwasserproben in verschiedenen Verdünnungsstufen G in DIN-Medium (—: 5 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).

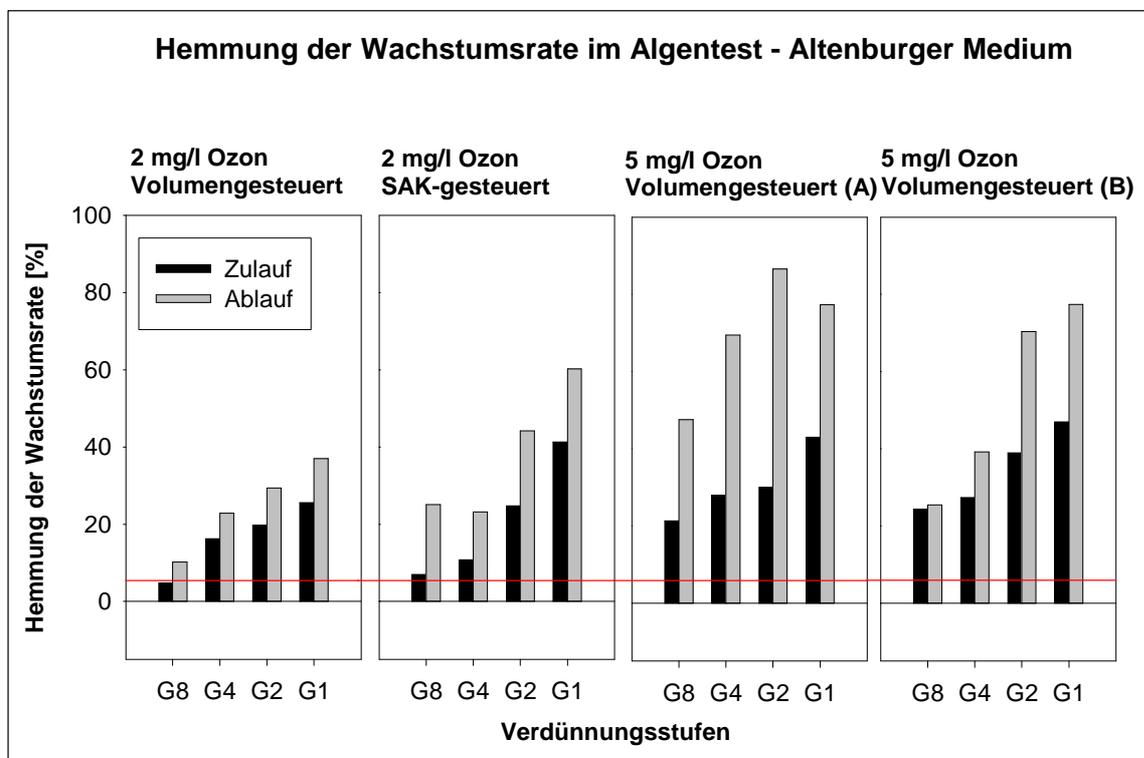


Abbildung 4-29: Ergebnisse des DIN-Algenhemmtests mit Rohwasserproben in verschiedenen Verdünnungsstufen G in Altenburger-Medium (—: 5 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts).

a.1. Miniaturisierter Algenhemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* in Mikrotiterplatten

Die Methodenentwicklung des miniaturisierten Algentests wurde erfolgreich abgeschlossen.

Nach einer kurzen lag-Phase zeigen die Algen in den Negativkontrollen ein annähernd exponentielles Wachstum mit geringen Streuungen zwischen den Replikaten auf einer Platte, aber auch zwischen unterschiedlichen Platten (Tabelle 3-18). Mit der hier etablierten Methode wurden mittlere Wachstumsraten in der Kontrolle (bezogen auf 6 Wells) von 1,50 bis 1,57 /d erreicht (Tabelle 4-18). Die mittlere Wachstumsrate von fünf Kontrollansätzen angesetzt auf fünf verschiedenen Mikrotiterplatten lag bei 1,53 /d mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 3 %. Innerhalb einer Platte lag der Variationskoeffizient zwischen den 6 Kontrollreplikaten bei maximal 4,1 % (Tabelle 4-18).

Mit den im Material- und Methodenteil beschriebenen Einstellungen wurden die in der vorläufigen ISO-Vorschrift (ISO/WD Algal test - Microplate) vorgeschlagenen Validitätskriterien für alle Kontrollansätze eingehalten. Diese fordert für das Wachstum in der Negativkontrolle eine minimale Wachstumsrate von 1,4 /d sowie einen maximalen Variationskoeffizienten für die Wachstumsrate von 5 %. Darüber hinaus wird gefordert, dass der pH-Wert in der Negativkontrolle im Versuchsverlauf nicht mehr als 0,5 pH-Einheiten ansteigt. Alle Validitätskriterien wurden in unseren Versuchen eingehalten. Zusätzlich wurde auf einer Platte eine Positivkontrolle (Kaliumdichromat 1,5 mg/L) mitgeführt. Diese führte zu einer starken Hemmung des Algenwachstums von 86 % (Abbildung 4-30). Hier wurde nur eine Wachstumsrate von 0,21 /d erreicht. Die starke Hemmung in der Positivkontrolle zeigt an, dass das Testsystem funktioniert und in der Lage ist, algentoxische Effekte zu detektieren.

Die Prozesskontrolle zeigte keine signifikanten Abweichungen zu den Kontrollen, während die Methanolkontrolle von 0,2 % eine um 8 % signifikant verringerte Wachstumsrate aufwies. Die mitgeführte Prozesskontrolle zeigt, dass das in den Extrakten enthaltene Lösungsmittel Methanol in den eingesetzten Konzentrationen, die unterhalb von 0,2 % lagen, keinen Einfluss auf das Algenwachstum hatte (Tabelle 4-19 und Abbildung 4-30).

Tabelle 4-18: Wachstumsraten der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* in den Kontrollansätzen nach 72 h im miniaturisierten Algentest mit Altenburger-Medium

Replikat	Kontrolle Platte 1	Kontrolle Platte 2	Kontrolle Platte 3	Kontrolle Platte 4	Kontrolle Platte 5	Mittel- wert
1	1.49	1.59	1.50	1.47	1.55	
2	1.52	1.53	1.51	1.46	1.51	
3	1.60	1.52	1.57	1.62	1.48	
4	1.66	1.55	1.56	1.48	1.54	
5	1.61	1.55	1.58	1.47	1.45	
6	1.56	1.53	1.48	1.50	1.48	
Mittelwert	1.57	1.55	1.53	1.50	1.50	1.53
Standard- abweichung	0.06	0.02	0.04	0.06	0.04	0.05
Variations- koeffizient [%]	4.1	1.5	2.7	4.0	2.5	3.0

Tabelle 4-19: Kenngrößen der Wachstumsrate über 72 h in den Kontrollansätzen des miniaturisierten Algentests mit *Desmodesmus subspicatus* (***: signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$)

	Kontrolle	Prozess- kontrolle G1	Prozesskontrolle G1 10fach	Methanolkontrolle 0.2 %	Positiv- kontrolle
Mittelwert	1.50 - 1.57	1.49	1.57	1.41***	0.21***
Standard- abweichung	0.02 - 0.06	0.05	0.07	0.12	0.24
Variations- koeffizient [%]	1.5 - 4.1	3.3	4.4	8.3	112
% Hemmung		2.4	-2.6	8.1	86.2

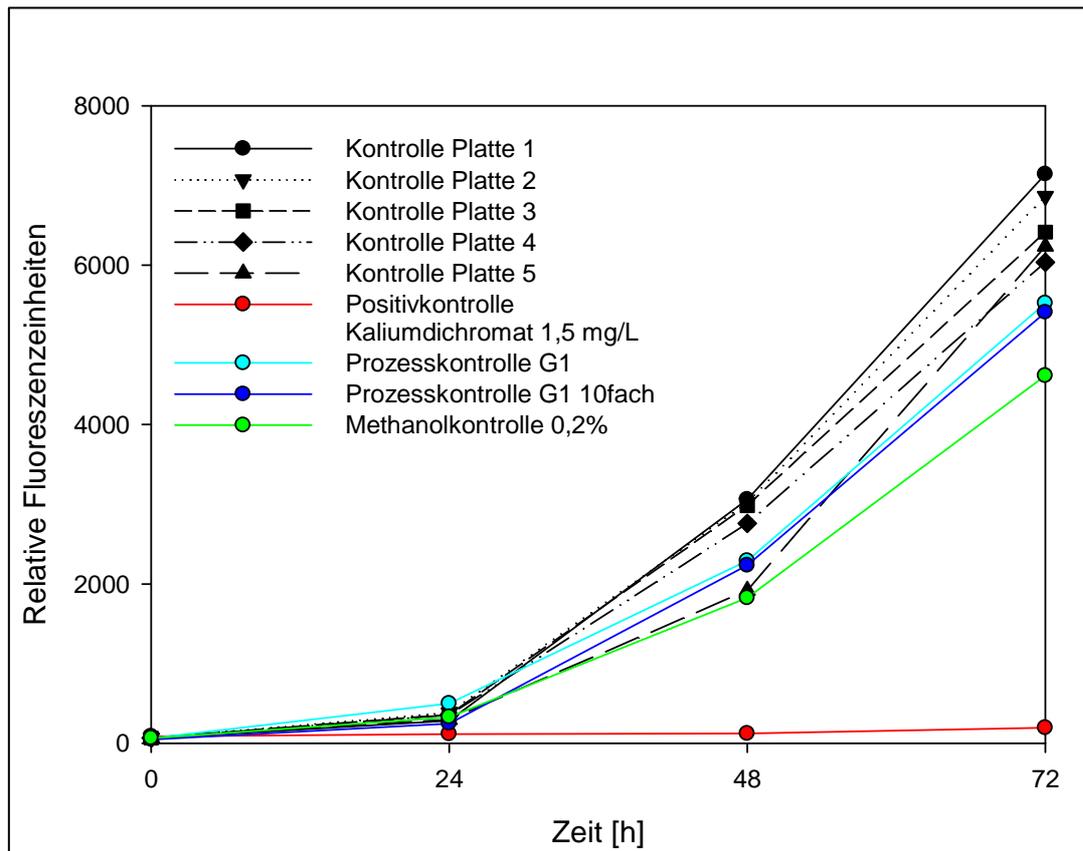


Abbildung 4-30: Mittlere Wachstumskurven von *Desmodesmus subspicatus* in den Kontrollansätzen des miniaturisierten Algenhemmtests mit Altenburger-Medium.

Ergebnisse der Untersuchung der Extrakte im miniaturisierten Algentest

Im miniaturisierten Algenhemmtest wurden bisher aus Zeitgründen nur die Extrakte der Abläufe untersucht. Hierbei wurden die Extrakte in zwei Konzentrationen eingesetzt, einer Konzentration, die dem originalen Abwasser (nachfolgend als 1-fach bezeichnet) entsprach, und einer Konzentration, die der zehnfachen Menge im Vergleich zur Abwasserprobe (nachfolgend als 10-fach bezeichnet) entsprach.

Generell wurden bei der Testung der Extrakte geringere algentoxische Effekte beobachtet als bei den Rohwasserproben (Tabelle 4-20), aber in allen Proben wurden auch bei der Testung der Extrakte die negativen Effekte auf das Algenwachstum bestätigt. Während in den 1-fachen-Konzentraten ein verringertes Algenwachstum im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde (Tabelle 4-20 und Abbildung 4-31), führten die 10-fach-Konzentrate meist zu geringeren Effekten im miniaturisierten Algentest, in drei Fällen sogar zu Förderungen (Tabelle 4-20). Wodurch dies bedingt ist und warum die Effekte in den Extrakten geringer sind als in den Rohwässern konnte nicht endgültig geklärt werden und muss in weiteren Untersuchungen ermittelt werden.

Tabelle 4-20: Hemmung der Wachstumsrate [%] im Algenhemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* in Rohwasserproben und Konzentraten von Abwässern (Faktor 1, Faktor 10; ***: signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$)

Probenentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Probestelle	Probennummer	Rohwasser (DIN)	Rohwasser (Altenburger)	Konzentrat 1-fach (Altenburger)	Konzentrat 10-fach (Altenburger)
19. - 20.10.2010	2 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Zulauf	1044015	11.3***	25.5***		
		Ablauf	1044016	12.7***	37.0***	14.3***	-1.9
02. - 03.11.2010	2 mg O ₃ /l SAK-Steuerung	Zulauf	1044524	-2.9	41.3***		
		Ablauf	1044537	0.5	60.2***	10.1***	-9.2***
17. - 18.11.2010	5 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Zulauf	1044531	-12.5***	43.0***		
		Ablauf	1044544	-1.4	77.3***	10.0***	-3.3
22. - 23.11.2010	5 mg O ₃ /l SAK-Steuerung	Zulauf	1044533	-4.3	46.9***		
		Ablauf	1044546	10.4	77.4***	6.8	4.2
07. - 08.02.2011	2 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Zulauf	1048044	7.3***	64.3***		
		Ablauf	1048045	9.8***	11.9***	4.9	5.6

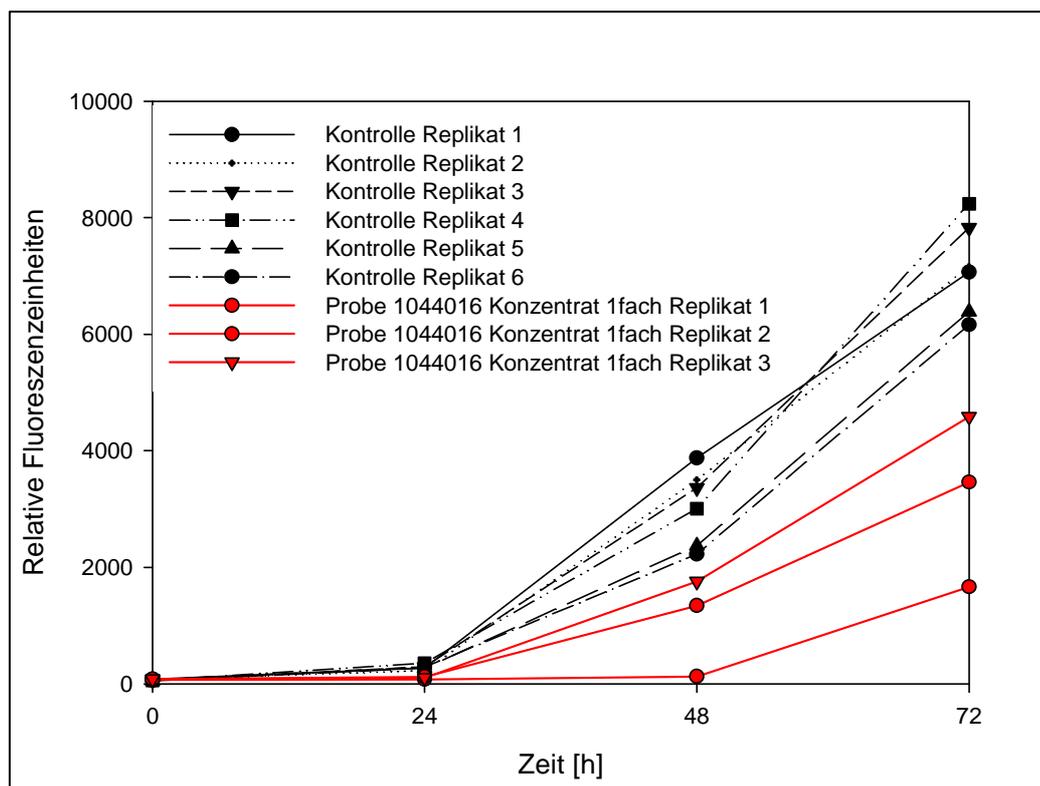


Abbildung 4-31: Wachstumskurven von *Desmodesmus subspicatus* in den Kontrollansätzen und Ansätzen mit Konzentrat einer Rohwasserprobe (1044016) im miniaturisierten Algenhemmtest mit Altenburgermedium

b. Wachstumshemmtest mit *Lemna minor*

Die Ergebnisse der Wachstumshemmtests mit der Wasserlinse *Lemna minor* zeigen ebenfalls einen toxischen Einfluss des Abwassers auf das Wachstum der Wasserlinsen (Abbildung 4-32). Mit höheren Anteilen Abwasser im Test war tendenziell eine stärkere Hemmung zu beobachten, wobei in der Probe mit dem höchsten Abwasseranteil (D1) häufig eine geringere Hemmung beobachtet wurde als in der nächsten Verdünnungsstufe D2 (Abbildung 4-32 und Abbildung 4-33). Dies deutet darauf hin, dass es auch bei der Wasserlinse wie bei dem Algentest in DIN-Medium zu überlagernden Effekten von Nährstoffen und toxischen Substanzen im Abwasser der Kläranlage Bad Sassendorf kommt.

Generell reagierte der Beobachtungsparameter Frondfläche sensitiver als die Frondzahl (Abbildung 4-32 und Abbildung 4-33). Die Frondfläche war in den meisten Fällen stärker beeinträchtigt und die resultierenden Giftigkeitswerte (G_w , siehe Tabelle 4-23) waren höher als bei der Auswertung über die Frondzahl. Viele Schadstoffe führen dazu, dass die Pflanze unter Stress weiter Fronds bildet, aber eine geringere Biomasse aufbaut. Dies führt zur Bildung kleinerer Fronds, wodurch der Parameter Frondfläche empfindlicher ist als die Frondzahl. Die Ozonbehandlung führte nur zu einer geringfügigen Änderung der Toxizität gegenüber der Wasserlinse *Lemna minor* (Abbildung 4-32 und Abbildung 4-33). In den Behandlungen mit 2 mg/L Ozon waren die Ablaufproben geringfügig weniger toxischer als vor Ozonung, bei einer Ozondosis von 5 mg/L wurde in einigen Verdünnungsstufen auch eine geringfügig erhöhte Toxizität nach Ozonung beobachtet.

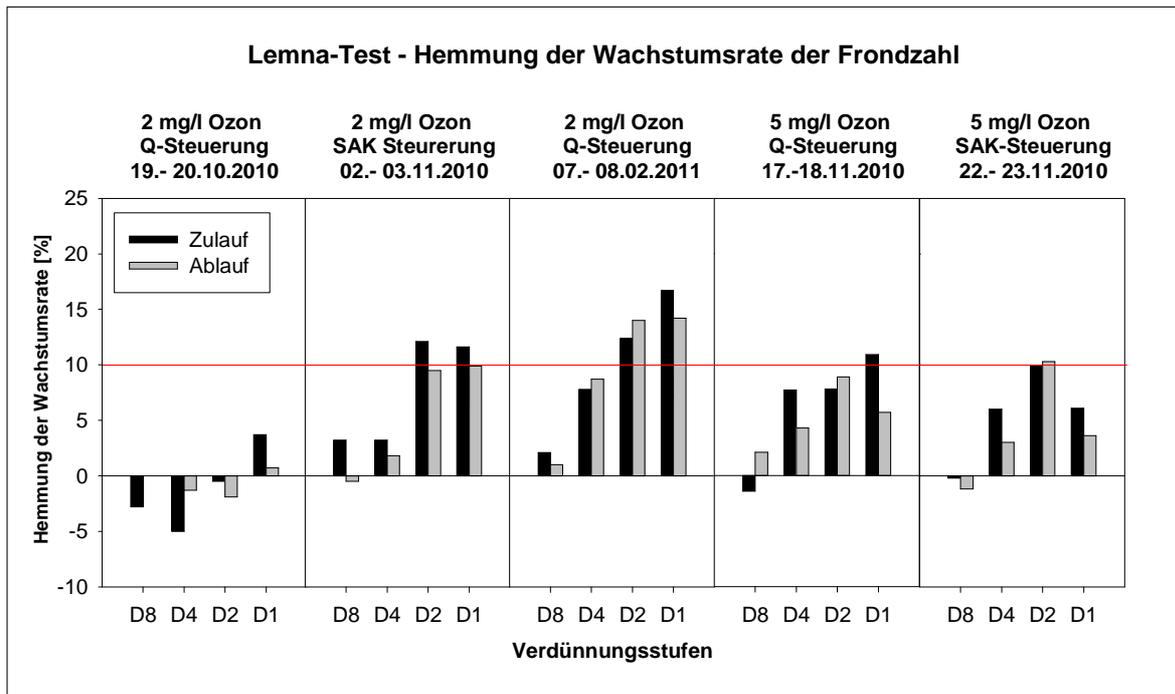


Abbildung 4-32: Ergebnisse des Wachstumshemmtests mit *Lemna minor* für den Beobachtungsparameter Frondzahl (—: 10 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts)

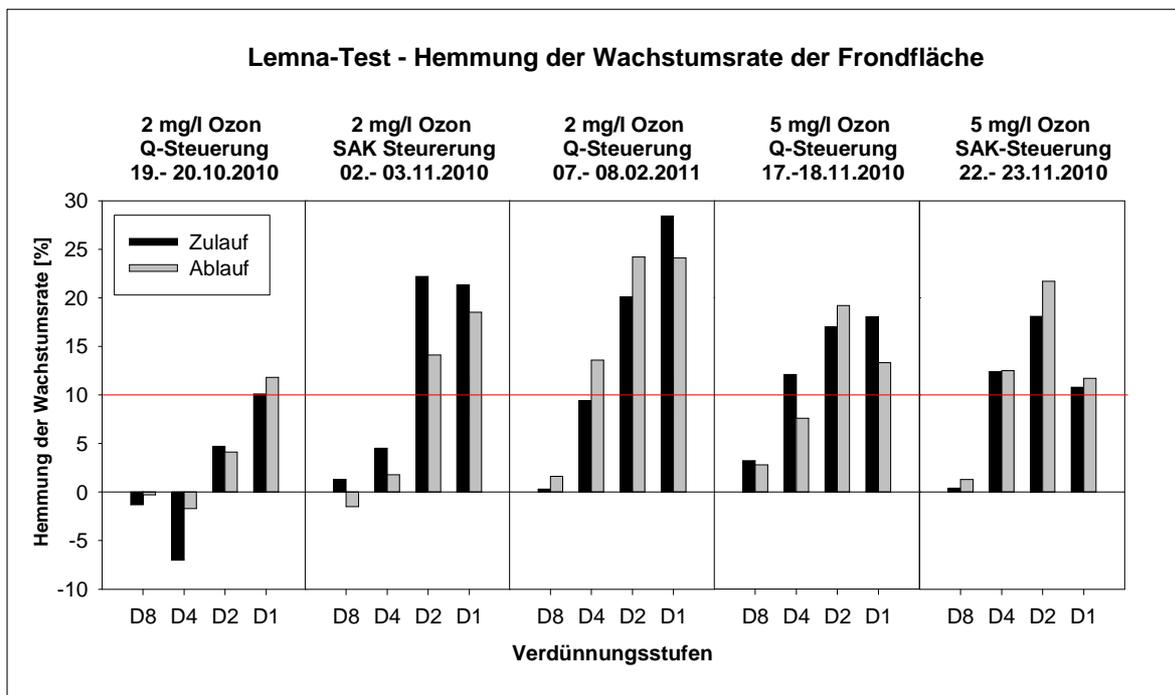


Abbildung 4-33: Ergebnisse des Wachstumshemmtests mit *Lemna minor* für den Beobachtungsparameter Frondfläche (—: 10 % Grenze zur Bestimmung des G-Werts)

c. Akuter Test mit *Daphnia magna*

In den untersuchten Abwasserproben wurde weder im Zulauf noch im Ablauf eine akute toxische Wirkung auf *D. magna* festgestellt (Tabelle 4-21). Damit wurde in allen Abwasserproben ein G_D -Wert von 1 ermittelt.

Tabelle 4-21: Ergebnisse des akuten Tests mit *Daphnia magna*

Probenentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Probe-stelle	Proben-nummer	<i>Daphnia magna</i> Immobilität [%]
19. - 20.10.2010	2 mg O3/l	Zulauf	1044015	0
	Q-Steuerung	Ablauf	1044016	0
02. - 03.11.2010	2 mg O3/l	Zulauf	1044524	0
	SAK-Steuerung	Ablauf	1044537	0
17. - 18.11.2010	5 mg O3/l	Zulauf	1044531	0
	Q-Steuerung	Ablauf	1044544	0
22. – 23.11.2010	5 mg O3/l	Zulauf	1044533	0
	SAK-Steuerung	Ablauf	1044546	0
07. – 08.02.2011	2 mg O3/l	Zulauf	1048044	0
	Q-Steuerung	Ablauf	1048045	0

d. Reproduktionstest mit *Daphnia magna*

In den Reproduktionstests wurden nur geringfügige Mortalitäten von max. 20 % bei den Muttertieren und maximal 0,8 % bei den Nachkommen beobachtet (Tabelle 4-22). Diese Größenordnung liegt im Bereich der natürlichen Mortalität und deutet nicht auf eine toxische Wirkung des Abwassers hin. In keinem der untersuchten Abwässer wurde eine Induktion von Männchen beobachten, welche durch endokrin wirksame Substanzen hervorgerufen werden kann (Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22: Ergebnisse des Reproduktionstests mit *Daphnia magna* in direkten Abwasserproben. Darstellung der Mortalität und der Männchenbildung.

Probenentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Probestelle	Probennummer	Mortalität der Muttertiere [%]	Mortalität der Nachkommen [%]	Anteil Männchen [%]
19. - 20.10.2010	2 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Kontrolle		10	0,3	0
		Zulauf	1044015	12,5	0,1	0
		Ablauf	1044016	0	0,7	0
02. - 03.11.2010	2 mg O ₃ /l SAK-Steuerung	Kontrolle		10	0,3	0
		Zulauf	1044524	0	0,1	0
		Ablauf	1044537	0	0,1	0
17. - 18.11.2010	5 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Kontrolle		10	0,1	0
		Zulauf	1044531	20	0,8	0
		Ablauf	1044544	10	0,4	0
07. – 08.02.2011	2 mg O ₃ /l Q-Steuerung	Kontrolle		10	0	0
		Zulauf	1048044	0	0	0
		Ablauf	1048045	10	0	0

Die Auswertung der kumulativen Anzahl von Nachkommen pro lebendes Muttertier zeigte eine deutliche Förderung der Reproduktion (8 bis 114 %) in den Abwasserproben (Abbildung 4-34). Die Reproduktion war in den Abwasserproben im Vergleich zur Kontrolle meist signifikant erhöht (One way-Anova, post hoc Holm-Sidak-Test). Ein Einfluss der Ozonbehandlung lässt sich nicht nachweisen, da die Zulauf- und Ablaufproben keinen signifikanten Unterschied aufwiesen oder im Ablauf eine höhere Nachkommenzahl festgestellt wurde. Die höhere Anzahl an Nachkommen in den Abwasserproben wurde wahrscheinlich durch ein erhöhtes Nahrungsangebot (v. a. Bakterien) im Abwasser ausgelöst. Es ist bekannt, dass Daphnien neben Algen auch Bakterien als Nahrungsressource verwerten können.

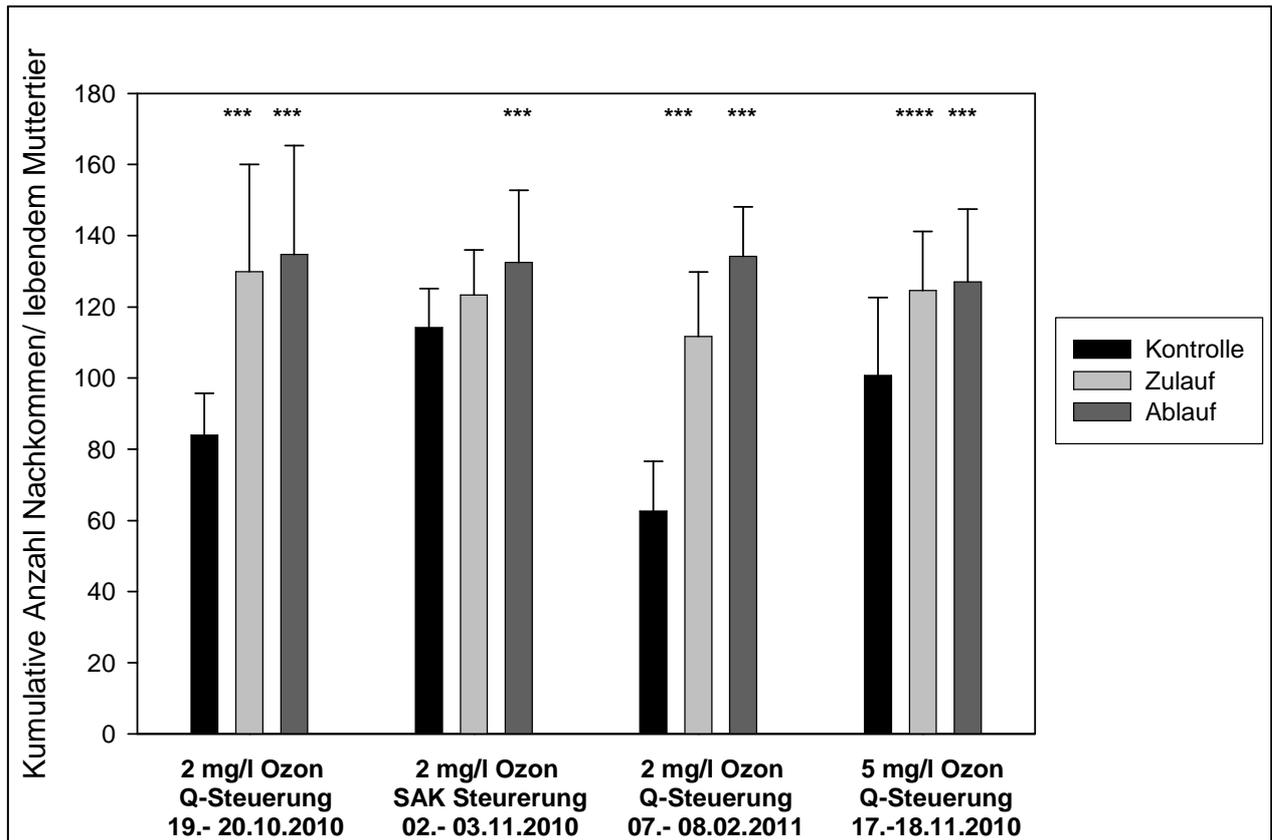


Abbildung 4-34: Ergebnisse des Reproduktionstests mit *Daphnia magna*. Darstellung der kumulativen Anzahl an Nachkommen (*:signifikante Abweichung zur Kontrolle, One Way-ANOVA mit nachgeschaltetem Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$).

e. Fischeitest mit *Danio rerio*

In den untersuchten Abwasserproben war bei 2 mg Ozon/L weder im Zulauf noch im Ablauf eine erhöhte Mortalität zu beobachten. Lediglich in einzelnen Verdünnungsstufen wurden einzelne Mortalitätswerte über 10 % beobachtet (Abbildung 4-35), was wahrscheinlich auf zufallsbedingte Ereignisse zurückzuführen ist, aber nicht auf eine toxische Wirkung des Abwassers hinweist, zumal keine Dosis-abhängige Wirkung beobachtet wurde. Bei einer Ozonkonzentration von 5 mg/L wurden erhöhte Mortalitätsraten von bis zu 30 % beobachtet, allerdings traten diese Effekte auch im Zulauf auf und auch hier zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Effekt. Ob bei Ozonkonzentrationen von 5 mg/L möglicherweise leichte Effekte auf die Entwicklung der Fischeier auftreten, muss in weiteren Kläranlagen untersucht werden.

In den bisher untersuchten Abwasserproben zeigte die Ozonbehandlung keinen Einfluss auf die Entwicklung des Fischembryos und es wurden in allen Proben Giftigkeitswerte (G_{EI}) von 1 erreicht (Tabelle 4-23).

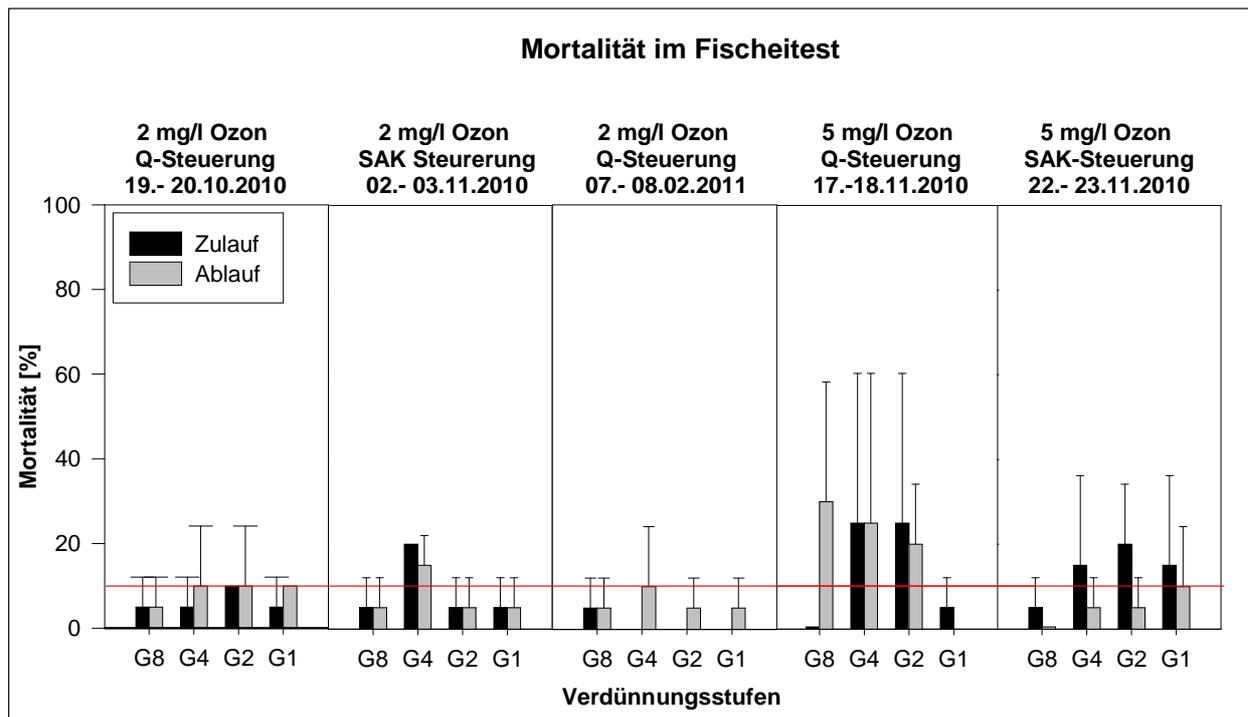


Abbildung 4-35: Ergebnisse des Fischei-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils 2 unabhängigen Tests.

4.6.2 Zusammenfassung der ökotoxikologischen *In-vivo*-Tests (9.1)

Nachfolgend sind alle Giftigkeitswerte für die bisher untersuchten Abwasserproben der Kläranlage Bad Sassendorf in Tabelle 4-23 aufgeführt.

Tabelle 4-23: Zusammenfassung der ökotoxikologischen Untersuchungen mit Standard-Testverfahren

Probenentnahmedatum	Verwendete Einstellung	Probestelle	Probennummer	Fischei-test	Akuter Daphnia-Test	Algentest DIN-Medium	Algentest Altenburger-medium	Lemna Frondzahl	Lemna Frondfläche
19. - 20.10.2010	2 mg O ₃ /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 ₃ /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 ₃ /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 ₃ /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 ₃ /l Q-Steuerung	Zulauf	1048044	G1	G1	G4	G>8	G4	G4
		Ablauf	1048045	G1	G1	G>8	G>8	G4	G8

Es waren keine toxischen Wirkungen des Abwassers vor und nach Ozonbehandlung auf *D. magna* (akut und chronisch) und im Fischeitest mit *Danio rerio* festzustellen. Geringe bis höhere Toxizität wurde auf die hier untersuchten Primärproduzenten nachgewiesen. Dabei wurden bereits in den Zulaufproben schädliche Wirkungen auf das Wachstum beobachtet.

Ein negativer Einfluss der Ozonung auf das Wachstum der Algen kann nach den Untersuchungen in Bad Sassendorf nicht ausgeschlossen werden. Welche Substanzen für die erhöhte Algtoxizität verantwortlich sind, sollen die Untersuchungen der fraktionierten Proben im neu etablierten und optimierten miniaturisierten Algentest zeigen.

4.6.3 *In-vivo*-Tests im Durchfluss (9.2)

Untersucht wurden die nachfolgenden Kläranlagen. In der ersten Versuchsserie wurden die Abwässer vor und nach der Ozonungsstufe in Bad Sassendorf mit den drei Testsystemen vor Ort untersucht. Die Ozonkonzentration lag bei 5 mg/L. Die Untersuchungen in Schwerte konnten bis zum Ende der ersten Projektphase aufgrund von technischen Problemen nicht durchgeführt werden. Stattdessen wurde an der Kläranlage Bad Sassendorf der Ablauf nach dem Schönungsteich, als weitergehender Nachbehandlungsschritt untersucht (2. Versuchsserie). Diese Untersuchung musste aufgrund von technischen Komplikationen nach drei Wochen vorzeitig abgebrochen werden. Im Anschluss wurde die 3. Versuchsserie in Duisburg Vierlinden durchgeführt. Alle Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

1. Versuchsserie an der Kläranlage Bad Sassendorf

a. Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*

Nach der Testdauer von 28 Tagen konnte in allen Behandlungen eine Reproduktionsrate von größer vier beobachtet werden. Die Anzahl der Würmer lag bei 43,8 in der Kontrolle, bei 62,8 für die Zulaufproben und bei 54,8 für das ozonte Abwasser (Abbildung 4-36 A). Für die Biomasse wurden bei den Tieren der Kontrolle 41,5 mg, für die mit dem Abwasser aus der Nachklärung exponierten Tiere 62,1 mg und für die im ozonten Abwasser exponierten Tiere 45,2 mg gemessen (Abbildung 4-36 B). Das entspricht einer Reduktion von 12,7 % für die Wurmzahl bzw. 27,2 % für die Gesamtbiomasse durch die Behandlung mit ozonten Abwasser. Diese Unterschiede zwischen den Behandlungen in beiden Endpunkten waren jeweils statistisch signifikant. Auch bei der Biomasse pro Individuum konnte eine im Vergleich zum Zulauf (0,991 mg) um 16,3 % verringerte Masse in den mit ozonbehandeltem Abwasser exponierten Tieren (0,829 mg) nachgewiesen werden.

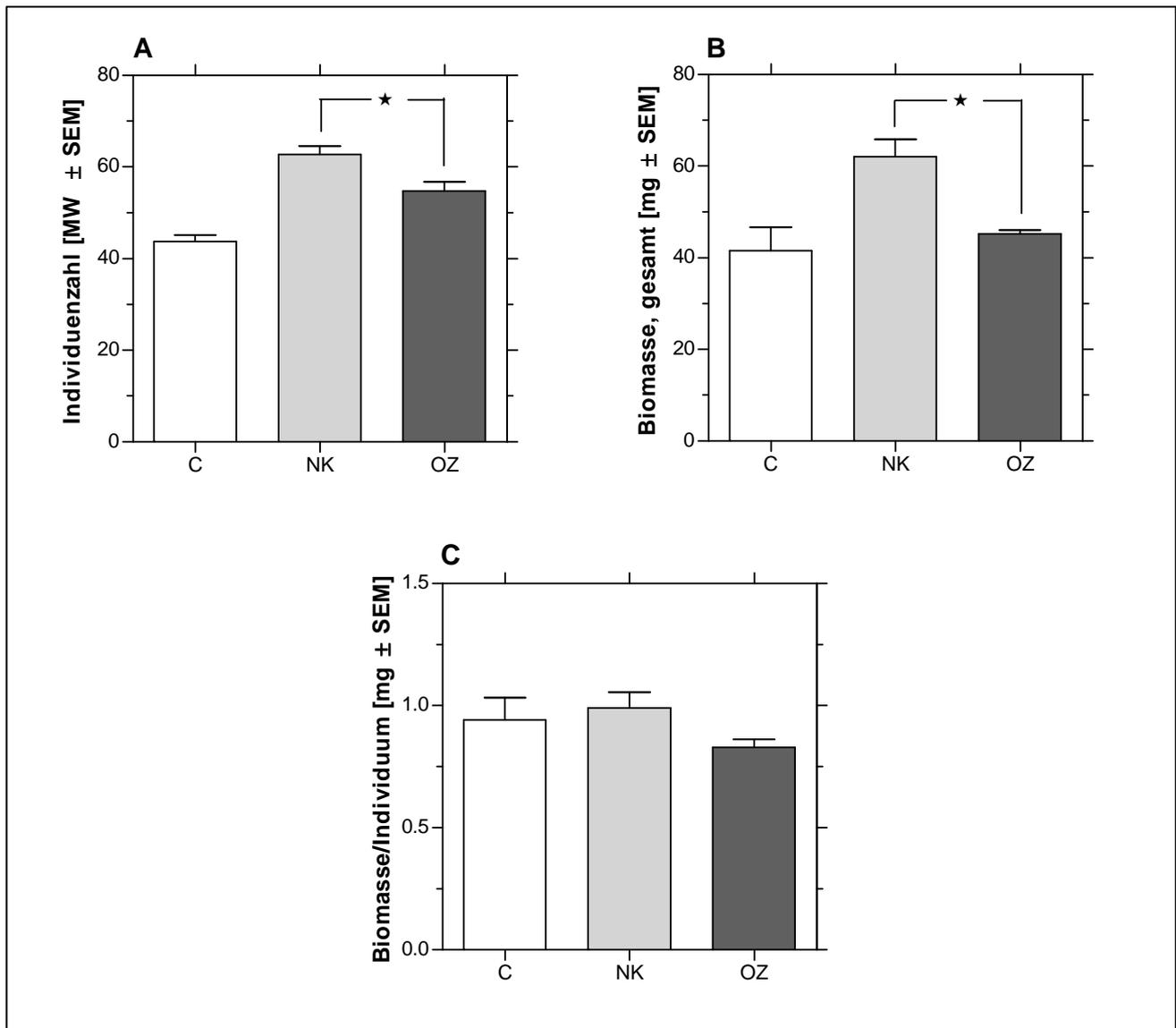


Abbildung 4-36: Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*. Individuenzahl (A) und Biomasse pro Replikat (B), Biomasse pro Individuum (C) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n=5$.

Die höheren Reproduktionsraten in den Untersuchungen sind sehr wahrscheinlich auf die durch den hohen Schwebstoffanteil im Abwasser und damit einhergehendem höheren Nahrungsangebot zurückzuführen. Dieser Anteil an Schwebstoffen bleibt durch den Ozonreaktor unverändert, da dieser keine mechanische Barriere darstellt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Transformationsprodukte nach der Ozonung für die Reduktion der Reproduktionsleistung verantwortlich sind.

Eine im Vergleich zur Kontrolle um 11,9 % verringerte Biomasse pro Individuum nach der Ozonung und eine reduzierte Reproduktion und Biomasse (Abbildung 4-36) deuten auf eine allgemein erhöhte Toxizität im Vergleich zum konventionell behandelten Abwasser hin.

Insgesamt lassen die Ergebnisse auf die Bildung toxischer Transformationsprodukte infolge der Ozonung schließen. Vermutlich ist die verringerte Reproduktion bzw. Biomasse nach dem Ozonreaktor nicht auf eine Reduktion des Nahrungsangebotes durch Ozon zurückzuführen, da in vorangehenden Untersuchungen an der Halbtechnischen Kläranlage Neuss [48] und der Kläranlage Regensdorf (Schweiz) [49] jeweils eine biologisch aktive Sandfiltration zu einer Verringerung der Effekte auf Ausgangsniveau nach dem Nachklärbecken geführt hat, obwohl auch das Nahrungsangebot durch Filtration von Schwebstoffen verringert wurde. Diese Verringerung der Effekte wird mit dem Abbau bzw. Entgiftung von toxischen Transformationsprodukten erklärt [48, 49].

b. Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Die Validität des Reproduktionstests mit *Potamopyrgus antipodarum* wurde bestätigt aufgrund der signifikant erhöhten Gesamtembryonenzahl in der Positivkontrolle nach 17 β -Ethinylestradiol-Exposition (ca. 14,7 Embryonen) im Vergleich zur Kontrolle (ca. 11,9 Embryonen; Abbildung 4-37 B).

Nach der Abwasserexposition liegt die Embryonenzahl bei 14,3 und damit etwa auf Kontrollniveau. Infolge der Ozonung sinkt die Gesamtembryonenzahl auf 12,4 (Abbildung 4-37 B). Die Anzahl unbeschalteter Embryonen sinkt von durchschnittlichen 7,2 Embryonen nach der konventionellen Klärung auf 5,8 nach der Ozonung und damit ebenfalls nahezu auf Kontrollniveau (6,2; Abbildung 4-38 A).

Die Schalenhöhe der abwasserexponierten Schnecken ist signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollen, was auf mögliche wachstumshemmende Effekte von toxischen Abwasserinhaltsstoffen hinweist (Abbildung 4-37 A). Hierbei könnten allerdings auch die unterschiedliche Leitfähigkeit und andere Wasserparameter zugrunde liegende Ursachen sein.

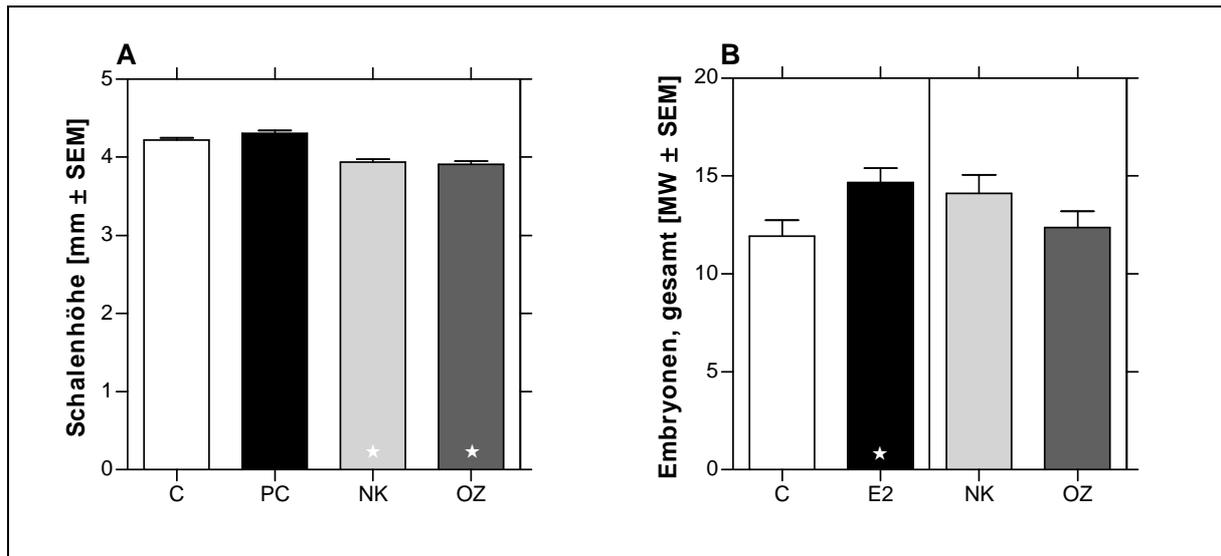


Abbildung 4-37: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Schalenhöhe (A) und Anzahl der Gesamt-Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; PC: Positivkontrolle mit 17β-Ethinylestradiol; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n=40$.

Die reduzierte Embryonenzahl nach der Ozonbehandlung ist vermutlich auf eine reduzierte östrogene Aktivität durch die oxidative Transformation östrogen aktiver Substanzen zurückzuführen.

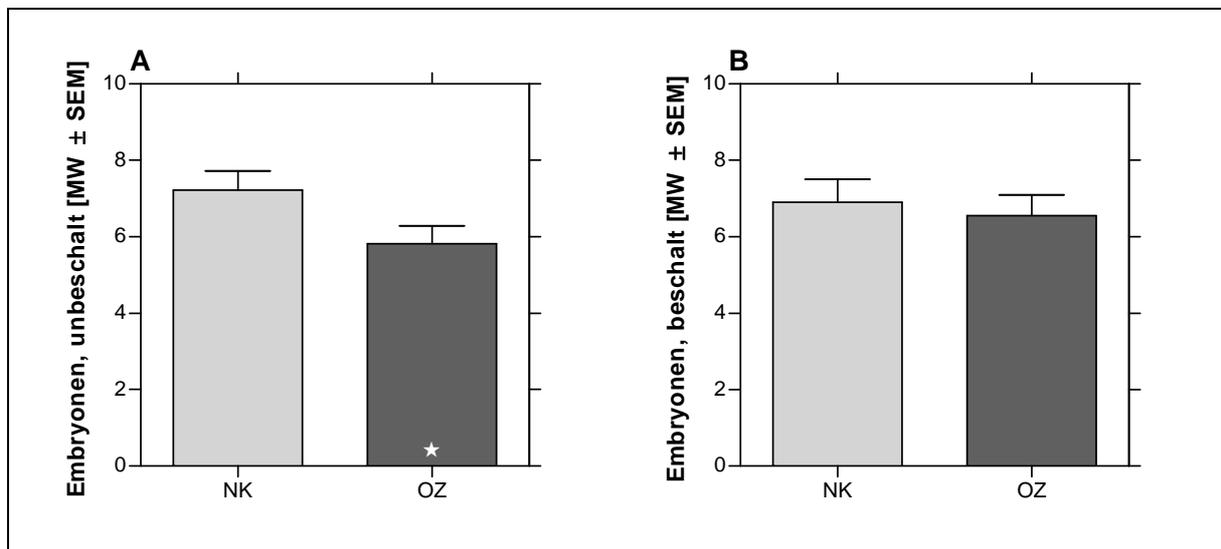


Abbildung 4-38: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Anzahl unbeschalteter Embryonen (A) und Anzahl der beschalteter Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n=40$.

In Abbildung 4-38 wird deutlich, dass die reduzierte Gesamtembryonenzahl im Wesentlichen an der Reduktion unbeschalteter Embryonen liegt. Dieser Parameter gilt im 4-wöchigen Test als besonders sensitiv, da unbeschaltete Embryonen jünger sind als die beschalteten.

c. Toxizitätstest mit *Dreissena polymorpha*

Die Mortalität beim Toxizitätstest mit *Dreissena polymorpha* lag bei allen Testwässern bei 0 % und des Weiteren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Biomasse zwischen den Behandlungsgruppen. Dadurch ergeben sich keinerlei Hinweise auf eine Veränderung der Toxizität vor und nach Ozonung des Abwassers. In vorangegangenen Versuchen an der Kläranlage Neuss [48] wurde dagegen eine erhöhte Toxizität nach der Ozonung festgestellt (erhöhte Mortalität und Gentoxizität), sowie eine Reduktion der Toxizität nach anschließender Sandfiltration auf Ausgangsniveau nach konventioneller Reinigung. Das Ausbleiben einer Toxizitätserhöhung könnte auf eine abweichende Abwasserzusammensetzung zurückzuführen sein. Auch eine höhere Ozondosis an der halbtechnischen Kläranlage Neuss (ca. 7 mg/L Ozon) im Vergleich zu Bad Sassendorf (5 mg/L Ozon) könnte ein wichtiger Einflussfaktor sein. Hier können nur die weiteren Untersuchungen der beiden anderen Kläranlagen wichtige Informationen zu einer möglichen Generalisierung der Aussagen liefern. Darüber hinaus könnten sensitive Biomarkeruntersuchungen (beispielsweise auf oxidativen Stress) hilfreich sein, um weitergehend interpretierbare Ergebnisse zu erzielen.

2. Versuchsserie an der Kläranlage Bad Sassendorf

In dieser zweiten Versuchsserie wurde im Wesentlichen der Ablauf aus dem Schönungsteich im Anschluss an den Ozonreaktor vergleichend mit den Abwässern nach dem Nachklärbecken und direkt nach der Ozonung toxikologisch untersucht. Es wird vermutet, dass toxische Transformationsprodukte, die nach der Ozonung entstehen, in einem relativ kurzen Zeitraum durch biotische und abiotische Prozesse abgebaut und damit entgiftet werden [49]. Die hydraulische Retentionszeit im Schönungsteich beträgt im Durchschnitt 36 Stunden. Aufgrund dessen wird eine ausreichende Entgiftung des ozonten Abwassers vor Erreichen des Vorfluters vermutet. Um dies zu verifizieren, wurden die Tests mit positiven toxikologischen Befunden an dieser Kläranlage noch einmal eingesetzt. Mit dem *Lumbriculus variegatus* Toxizitätstest wurde eine mögliche Entgiftung nach dem Schönungsteich untersucht, während mit dem *Potamopyrgus antipodarum* Reproduktionstest eine verringerte östrogene Aktivität verifiziert werden sollte.

Diese zweite Untersuchungsserie in Bad Sassendorf musste allerdings nach drei Wochen Testlaufzeit aufgrund eines längeren Ausfalles der Ozonanlage und der fehlenden Sicherheit einer über vier Wochen stabil laufenden Ozonanlage, vorzeitig abgebrochen werden.

Aufgrund der unvollständigen Untersuchung vor Ort wurden die Auswertung der Daten verworfen. Daher können die Ergebnisse nicht in den Abschlussbericht der ersten Projektphase mit einbezogen werden. Diese Tests werden in der zweiten Projektphase nach erfolgter Reparatur bzw. Aufrüstung der technischen Anlage, wiederholt.

3. Versuchsserie an der Kläranlage Duisburg-Vierlinden

An der Kläranlage Duisburg-Vierlinden wurden Abwässer vor und nach Ozonung mit allen drei Testsystemen vergleichend untersucht. Schwerpunkt war hierbei im Wesentlichen die Überprüfung, ob auch an dieser Kläranlage mit unterschiedlicher Abwasserzusammensetzung eine erhöhte Toxizität nach der Ozonung feststellbar ist. Zum anderen wurde untersucht, ob zwei verschiedene Ozoneintragsmethoden (Ozoneintrag mittels Injektor und Diffusor) die Toxizität beeinflussen. Ein biologischer Nachbehandlungsschritt konnte in dieser Versuchsserie noch nicht untersucht werden, da dieser im Zeitraum der Versuchsserie noch nicht funktionsfähig in das Abwasserreinigungssystem implementiert war. Um zu überprüfen, ob ein solcher Nachbehandlungsschritt toxische Transformationsprodukte effektiv eliminieren kann, wird eine entsprechende Untersuchung für die zweite Projektphase angestrebt. Die untersuchte Ozonkonzentration lag bei 5 mg/L. Die nachfolgenden Abkürzungen werden weiter im Text verwendet: Testwässer: C, Kontrolle; NK, Nachklärbecken; OZ_I, ozoniert mit Injektor (Straße 1); OZ_D, ozoniert mit Diffusor (Straße 2).

a. Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*

Nach der Testdauer von 28 Tagen konnte in allen Behandlungen eine Reproduktionsrate von größer vier beobachtet werden. Die Anzahl der Würmer lag bei 71,8 in der Kontrolle, bei 64,4 für die Zulaufproben, bei 45,0 für das mittels Injektor ozonte Abwasser und 60,8 mittels Diffusor ozonte Abwasser (Abbildung 4-39 A). Für die Biomasse wurden bei den Tieren der Kontrolle 70,6 mg, für die mit dem Wasser aus der Nachklärung exponierten Tiere 81,3 mg und für die im ozonten Abwasser exponierten Tiere 66,8 mg (Injektor) und 58,1 mg (Diffusor) gemessen (Abbildung 4-39 B). Das entspricht einer Reduktion von 30,1 % (OZ_I) bzw. 5,6 % (OZ_D) für die Wurmzahl und 17,9 % (OZ_I) und 28,5 % (OZ_D) für die Gesamtbiomasse durch die Behandlung mit ozonten Abwasser im Vergleich zum Abwasser aus dem Nachklärbecken. Allerdings war nur die Reduktion der Individuenzahl statistisch signifikant (Abbildung 4-39 A). Bei der Biomasse pro Individuum wurde dagegen eine im Vergleich zum Zulauf (1,266 mg) um 14,2 % erhöhte Biomasse bei den mit Injektor-ozoniertem Abwasser (OZ_I) exponierten Tieren (1,446 mg) nachgewiesen. In OZ_D sinkt dagegen die Biomasse um 22,1 % im Vergleich zu NK.

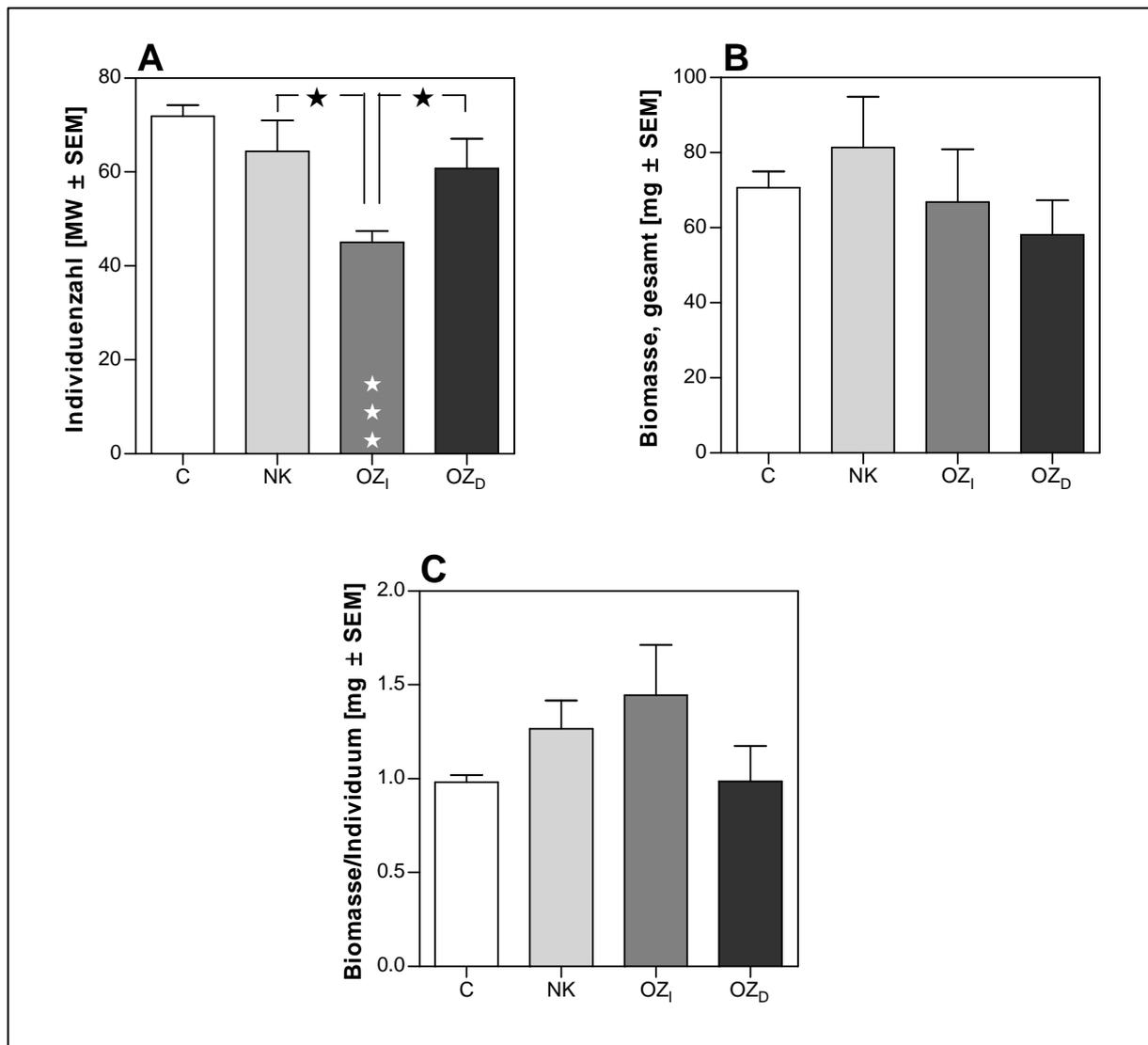


Abbildung 4-39: Toxizitätstest mit *Lumbriculus variegatus*. Individuenzahl (A) und Biomasse pro Replikat (B), Biomasse pro Individuum (C) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ_I, Abwasser nach dem Ozoninjektor; OZ_D, Abwasser nach dem Ozondiffusor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$; ★★★, $p < 0,001$ (t-Test); weiße Sterne, Signifikanz gegenüber Kontrolle; schwarze Sterne, Signifikanz gegenüber anderen Testwässern; $n=5$.

Auch in dieser Versuchsserie gibt es Hinweise auf eine gesteigerte Toxizität infolge der Abwasser ozonung. Sowohl die Individuenzahl als auch die Biomasse sinken, wobei lediglich bei OZ_I eine signifikante Reduktion beobachtet wurde. Die Unterschiede bei den zwei Ozonierungsmethoden können noch nicht abschließend erklärt werden. Hierzu sollten die Ergebnisse in der zweiten Projektphase mit weiteren Daten (chemischer Analytik, Toxizitätstests) abgeglichen werden.

b. Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*

Nach vierwöchiger Exposition zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung sowohl der unbeschalten (C: 8,12; NK: 23,4; OZ_i: 13,8; OZ_D: 13,1) als auch der beschalten Embryonen in allen Behandlungsgruppen, was auf einen reproduktionssteigernden Stimulus in Form von östrogen aktiven Substanzen hinweist (Abbildung 4-41). Die Embryonen in den ozonten Abwasser exponierten Schnecken waren gegenüber denen der konventionellen Behandlung deutlich reduziert (NK: 37,9; OZ_i: 27,0; OZ_D: 27,7; Abbildung 4-40). Bei den unbeschalten Embryonen ergab sich eine Reduktion von mehr als 40% während bei den beschalten Embryonen keine signifikanten Abweichungen zu beobachten waren (Abbildung 4-41). Die bekanntermaßen hohen Eliminationsraten von Östrogenen durch Ozonung sind hierfür die wahrscheinlichste Ursache. Zwischen den Ozonapplikationsformen gab es keine Unterschiede.

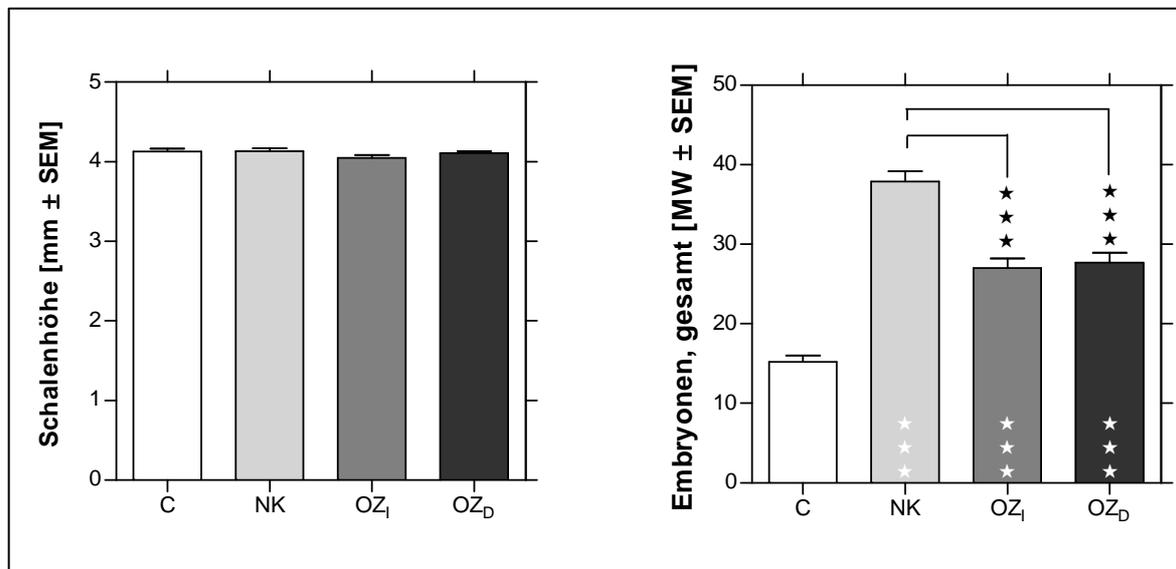


Abbildung 4-40: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Schalenhöhe (A) und Anzahl der Gesamt-Embryonen pro Schnecke (B) nach 28-tägiger Exposition. C, Kontrolle; PC: Positivkontrolle mit 17 β -Ethinylestradiol; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n = 40$.

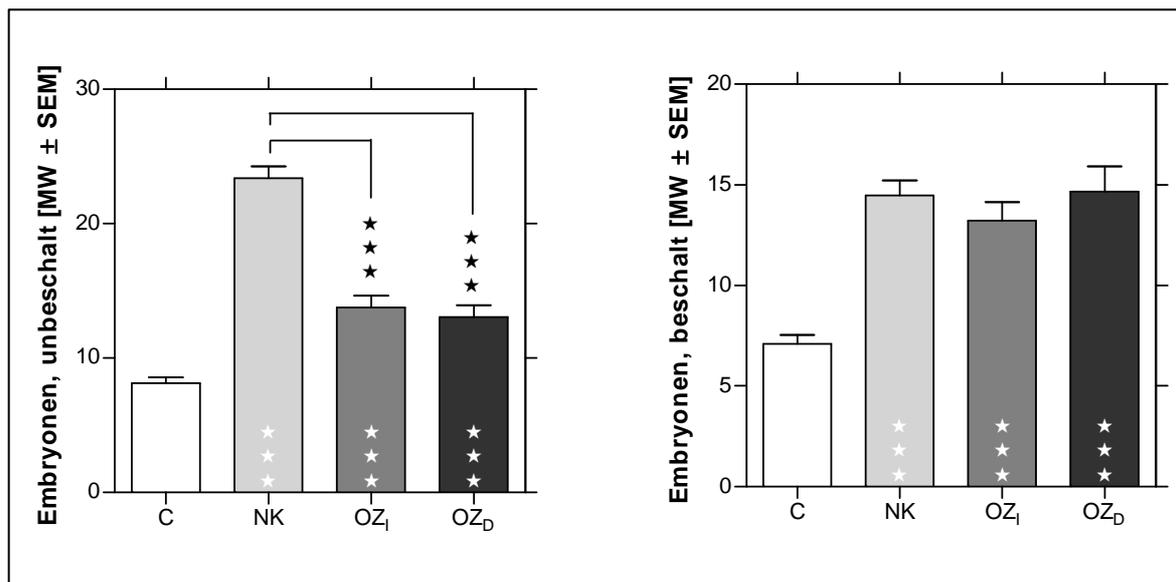


Abbildung 4-41: Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum*. Anzahl unbeschalteter Embryonen (A) und Anzahl der beschalteter Embryonen pro Schnecke (B) nach 28 tägiger Exposition. C, Kontrolle; NK, Abwasser aus dem Nachklärbecken; OZ, Abwasser nach dem Ozonreaktor; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; ★, $p < 0,05$ (t-Test); $n = 40$.

c. Toxizitätstest mit *Dreissena polymorpha*

Ebenso wie in Bad Sassendorf, konnten auch in Duisburg Vierlinden keine Effekte auf die Muscheln infolge der Abwasserexposition festgestellt werden. Die Mortalität beim Toxizitätstest mit *Dreissena polymorpha* lag bei allen Testwässern bei 0 %. Dadurch ergeben sich keinerlei Hinweise auf eine Veränderung der Toxizität vor und nach Ozonung des Abwassers. Das Ausbleiben einer Toxizitätserhöhung könnte auf eine abweichende Abwasserzusammensetzung oder abweichenden Versuchsbedingungen im Vergleich zu vorangegangenen Versuchen [48] zurückzuführen sein.

4.7 Erste Ergebnisse der Untersuchungen auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden

Zu Prozessanalytikzwecken wurde während der Inbetriebnahme der Ozonung auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden ebenfalls ein eingeschränktes Spurenstoffspektrum analysiert. Eine Erfassung der genauen Ozonkonzentrationen war jedoch aufgrund des Einfahrbetriebes der Ozonanlagen nicht möglich. Es war jedoch bekannt, dass die Ozondosis der Injektorstraße während des ersten Versuchstages durch einen zu hohen Ozongehalt im Off-Gas heruntergeregelt wurde.

Die bisherigen Untersuchungen konnten die Vermutung einer besseren Spurenstoffelimination in der Injektorstraße bestätigen. Anhand der Abbildung 4-42 ist erkennbar, dass bei gleichen Ozondosen (Versuchstag 2) die Injektorstraße höhere Eliminationen der betrachteten Modellsubstanzen Diclofenac und Metoprolol erreichen kann. Die Ergebnisse von Versuchstag 1 (14./15.06.2011) zeigen deutlich die heruntergeregelt Ozondosis der Injektorstraße auf.

Auffällig war, dass auch bei hohen Ozondosen (Zieldosis war 7 mg/L) keine Bromatbildung (Bromatkonzentration < 0,1 µg/L) beobachtet werden konnte, was zum Teil auch durch den im Vergleich zu Bad Sassendorf niedrigen Bromidgehalt des Abwassers erklärt werden kann. Die detaillierten Ergebnisse der Messungen sind im Anhang 8.2 zu finden.

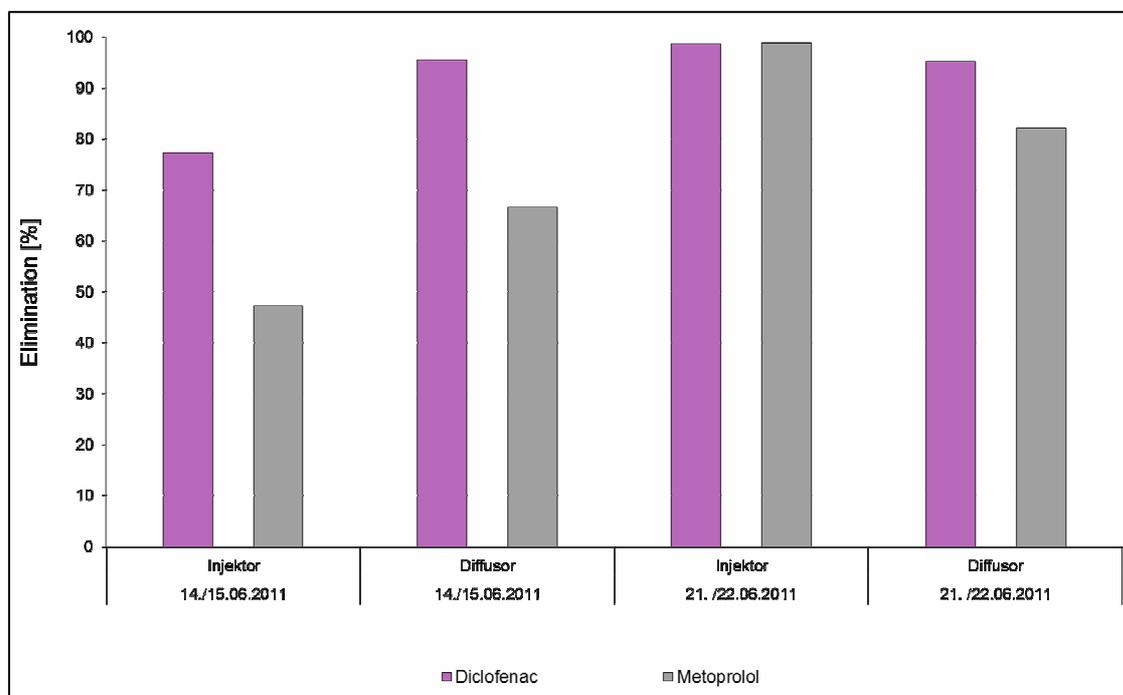


Abbildung 4-42: Vergleich der Eliminationsleistungen der Injektor- und der Diffusorstraße der Kläranlage Duisburg-Vierlinden.

5 Fazit und Ausblick

Die Probenahme bei verschiedenen Betriebseinstellungen auf der Kläranlage Bad Sassendorf und die anschließende Probenlogistik sind aufgrund der im Vorfeld geleisteten koordinativen Arbeiten und der gemeinsamen Abstimmungen mit allen Projektpartnern während mehrerer Projekttreffen im IWW sowie mit den Kläranlagenbetreibern im Rahmen der Workshops des Teilprojekts MKUNLV-EA6 (Elimination von Arzneimittelrückständen in kommunalen Kläranlagen) erfolgreich verlaufen. Dabei wurden fünf Betriebseinstellungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen (2 und 5 mg/L) und Betriebsteuerungen (Volumen- und SAK-Steuerung) der Ozonanlage über 24 Stunden mengenproportional beprobt. Eine Übersicht der genauen Einstellungen und spezifischen Parameter gibt die Tabelle 3-3 wider. Die besondere Herausforderung der für EA10 benötigten, sehr großen Probemengen von jeweils ca. 60 L aus dem Zu- und Ablauf der Ozonung, die nachfolgend homogenisiert werden mussten, wurde dabei dank der Unterstützung durch die Kläranlagenbetreiber erfolgreich gelöst.

Die Abwasserproben wurden direkt sowie nach einer 1000-fachen Anreicherung (Empfindlichkeitssteigerung der effektbasierten Untersuchungen), entsprechend des erstellten Logistikplans an alle Projektteilnehmer verteilt und kühl bzw. gefroren gelagert. Anschließend wurden die im Bericht ausführlich erläuterten effektbasierten Untersuchungen (toxikologisch und massenspektrometrisch) durchgeführt. Parallel dazu wurden in den Abwasserproben die möglichen Oxidationsnebenprodukte Bromat und Nitrosamine bestimmt sowie eine Charakterisierung des Spurenstoffabbaus anhand der Ozonzehrung / Hydroxylradikal-Exposition im Labormaßstab vorgenommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass unter den bisher gewählten Versuchsbedingungen von 2 und 5 mg/L Ozon im Abwasser selbst der für das Trinkwasser geltende Bromatgrenzwert von 10 µg/L und für Nitrosamine geltende GOW-Wert von 10 ng/L bei den im Rahmen des Einzelauftrages 10 untersuchten Betriebseinstellung eingehalten werden konnte. Bei zusätzlichen Untersuchungen im Rahmen des Einzelprojekts Nr. 6, bei denen 7 mg/L Ozon volumengesteuert untersucht wurde, konnte eine Bromatkonzentration von 30 µg/L, aber keine Auffälligkeiten bei den Nitrosaminen detektiert werden. Bei erhöhten Temperaturen kam es aufgrund des gesteigerten Bromatbildungspotenzials in Einzelfällen auch bei niedrigeren Ozondosen (5 mg/L Ozon) zu einzelnen Überschreitungen des Trinkwassergrenzwertes im Kläranlagenablauf nach der Ozonung. Im Gegensatz dazu konnte bei ersten Untersuchungen in Duisburg-Vierlinden bei vergleichbar hohen Ozondosierungen kein Bromat in Konzentrationen > 0,1 µg/L gefunden werden. Ob dieser Unterschied auf unterschiedliche Zulaufkonzentrationen an Bromid zurückzuführen ist und welchen Einfluss die Temperatur bzw. die Korrelation zu Z_{spez} hat, soll im Vergleich aller drei Kläranlagen in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Die Untersuchungen der

Ozonzehrung und Hydroxylradikal-Exposition haben gezeigt, 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. Die Auswirkungen einer Erhöhung der Ozondosierung auf die Kinetik des Spurenstoffabbaus und der Ozonzehrung auf die Leistungsfähigkeit des ozonbasierten Prozesses sollen im Rahmen von Laborversuchen weitergehend abgeschätzt werden.

Die ersten orientierenden massenspektrometrischen GC- und LC-MS-Screenings 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 [50]. 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. 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. Anhand der vorgeschlagenen Summenformeln und dem Fragmentierungsverhalten konnten den beiden Transformationsprodukten Strukturformeln 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 qualitativ zu erfassen.

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. 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 sowie das Vorhandensein von Schwebstoffen zu den unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten sein. Um diese Effekte genauer untersuchen zu können, ist es notwendig die entsprechenden Proben zu fraktionieren und die erhaltenen Fraktionen erneut auf ihre östrogene Aktivität zu untersuchen. 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 um so mehr, als die Ergebnisse verschiedener Tests, die östrogene Wirkung anzeigen könnten, bisher kein eindeutiges Bild ergeben.

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. 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) in dieser Probenahme eine erniedrigte Genotoxizität aufgetreten zu sein. Dieser Befund müsste durch eine wiederholte Untersuchung (wiederholte Probenahmen unter konstanten Bedingungen) verifiziert werden. Die Arbeiten um [31] zeigen eine effektive Reduktion der Genotoxizität nach der Ozon-Behandlung von Abwässern, während [34] lediglich von einer um 10 % reduzierten Genotoxizität nach der Ozonung sprechen. Dagegen merken [28] 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.

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 nach Ozonung nur in einer Abwasserprobe stärker gehemmt. Die Untersuchungen mit dem Wasserfloh *Daphnia magna* und den Fischeiern des Zebraäbrblings zeigten in Bad Sassendorf keine Beeinträchtigung der Invertebraten und der Fische durch die nach der Ozonung gebildeten Transformationsprodukte an.

Die ökotoxikologischen Vor-Ort-Untersuchungen im Durchflusssystem an der Kläranlage Bad Sassendorf und Duisburg-Vierlinden lassen zum einen auf eine leicht erhöhte Toxizität unmittelbar nach der Ozonung schließen (*Lumbriculus* Toxizitätstest: verringerte Biomasse + Reproduktion). Zum anderen sind aber auch deutliche Hinweise auf eine verringerte Östrogenität *in-vivo* feststellbar (Reproduktionstest mit der Zwergdeckelschnecke). 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 [48, 49]. 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.

Die Tabelle 5-1 und Tabelle 5-2 stellt die bisherigen toxikologischen Ergebnisse der Abwasseruntersuchungen der Kläranlage Bad Sassendorf vor (Zulauf) und nach (Ablauf) der Ozonungsstufe zusammen.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der *In-vitro*-Tests

<i>In-vitro</i>-Tests					
Testsystem/-organismus	Getestete toxische Wirkung	Ergebnis Zulauf	Ergebnis Ablauf	Unterschied Zu- und Ablauf	Bemerkungen
XTT, NR, SRB (CHO)	Zytotoxizität	Positiv (nur Extrakte)	Positiv (nur Extrakte)	Keiner	
LDHe (CHO)	Zytotoxizität	Negativ	Negativ		
MTT (T47D)	Zytotoxizität	Negativ	Negativ		
ER Calux (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 5-2: Zusammengefassten *In-vivo*-Tests

<i>In-vivo</i>-Tests					
Testsystem/-organismus	Getestete toxische Wirkung	Ergebnis Zulauf	Ergebnis Ablauf	Unterschied Zu- und Ablauf	Bemerkungen
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, endocrine Effekte	Negativ	Negativ		
Eier des Zebraäbrblings (<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		

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).

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 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 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 zu treffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Reineke, N., Bester, K., Hühnerfuss, H., Weigel, S., Jastorff, B. (2002): Bioassay-directed analysis of river Elbe (Germany) surface water including large volume extractions and high performance fractionation, *Chemosphere* 47, 717-723
2. 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
3. Wahl, M., Huber, A. (2005): Ionenchromatographische Verfahren zur Bromatbestimmung in Trink- und Mineralwässern. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 10/2005 Sonderteil Biotechnologie, 2-4
4. 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
5. Abegglen, C., Escher, B., Hollender, J., Koepke, S., Ort, C., Peter, A., Siegrist, H., von Gunten, U., Zimmermann, S. (2009): Ozonung von gereinigtem Abwasser. Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Hollender, J., Zimmermann, S.G., Koepke, S., Krauss, M., McArdell, 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.
10. Abellán, M.N., Gebhardt, W., Schröder, H.F.R. (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.

11. 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, Kurzreferate S. 213-217; Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in der GDCh, 28.-30.04.2008, Trier, (Germany).
12. 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).
13. 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).
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Von Gunten, U. (2003): Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37(7), 1443-1467.
19. Von Sonntag, C. (2008): Advanced oxidation processes: Mechanistic aspects. *Water Science and Technology*, 1015-1021.

20. 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.
21. Huber, M.M., Canonica, S., Park G.Y., von Gunten, U. (2003): Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environmental Science and Technology* 37(5), 1016-1024.
22. Huber, M.M., Ternes, T.A., von Gunten, U. (2004): Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science and Technology* 38(19), 5177-5186.
23. Hoigne, J. (1994): Characterization of water quality criteria for ozonation processes. Part I: Minimal set of analytical data. *Ozone: Science and Engineering* 16(2), 113-120.
24. Kaiser, H.P., von Gunten, U. (2000): Die Bewertung von Ozonreaktoren. *Gas Wasser Abwasser* 80, 50-61.
25. Elovitz, M.S., von Gunten, U., Kaiser, H.P. (2000): The influence of dissolved organic matter character on ozone decomposition rates and Rct, in ACS Symposium Series. 248-269.
26. Elovitz, M.S., von Gunten, U., Kaiser, H.P. (2000): Hydroxyl radical/ozone ratios during ozonation processes. II. The effect of temperature, pH, alkalinity, and DOM properties. *Ozone: Science and Engineering* 22(2), 123-150.
27. 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).
28. 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.
29. 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.
30. Ferk, F., Misik, M., Grummt, T., Majer, B., Fuerhacker, M., Buchmann, C., Vital, M., Uhl, M., Lenz, K., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A., Knasmüller, S. (2009): Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672(2), 69-75.

31. 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.
32. Olive, P. L. and J. P. Banath (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." *Nat Protoc* 1(1): 23-29.
33. 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.
34. 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.
35. Altenburger, R., Krüger, J., Eisenbürger, A., (2010): Proposing a pH stabilised nutrient medium for algal growth bioassays. *Chemosphere* 78, 864–870.
36. DIN EN ISO 8692 (2005): Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen. Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich.
37. Eisenbürger, A., Dott, W., Klein, J., Hahn, S. (2003): Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3), 346-354.
38. DIN EN ISO 20079 (2006): Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) – Wasserlinsen-Wachstumshemmtest. Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich.
39. DIN EN ISO 6341 (1996): Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich.
40. ISO 10706 (2000): Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organisation of Standardization, Genf.
41. DIN EN ISO 15088 (2009): Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*). Beuth Verlag Berlin, Wien, Zürich.
42. 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.
43. Fuast, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H. (2003): Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology* 63(1), 43-63.

44. Flaherty, C. M., Dodson, S.I. (2005): Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61(2), 200-207.
45. Jernbro, S., Rocha, P.S., Keiter, S., Skutlarek, D., Farber, H., Jones, P.D., Giesy, J.P., Hollert, H., Engwall, M. (2007). Perfluorooctane sulfonate increases the genotoxicity of cyclophosphamide in the micronucleus assay with V79 cells - Further proof of alterations in cell membrane properties caused by PFOS. *Environmental Science and Pollution Research* 14(2), 85-87.
46. OECD (2007): Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. OECD guidelines for the testing of chemicals 225.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Li, H.-Q., Jiku, F., Schröder, H.Fr., (2000): Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and –tandem mass spectrometry – Comparison of conventional and membrane assisted biological wastewater treatment processes. *J. Chromatogr. A* 889, 155-176.
51. Schrank, S.G., et al., (2009): Generation of endocrine disruptor compounds during ozone treatment of tannery wastewater confirmed by biological effect analysis and substance specific analysis. *Water Science and Technology*, 59(1), 31-38.
52. Westerhoff, P., (2002): Kinetic based models for bromate formation in natural waters. EPA Final Report (R826835-01-0).
53. Bahr, C., Ernst, M., Jekel, M., (2007): Pilotuntersuchungen zur kombinierten oxidativ-biologischen Behandlung von Klärwerksabläufen für die Entfernung von organischen Spuren- und Wirkstoffen und zur Desinfektion. Kompetenzzentrum Wasser Berlin, (5).

7 Autorenverzeichnis

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

8 Anhang

8.1 Ames-Test (AP 8)

Ergebnisse der durchgeführten Salmonellen-Mutagenitäts-Tests mit den Stämmen TA98 und TA100.

Tabelle 8-1: Probenahme 1 vom 20.10.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		17,33 ± 3,21	108,33 ± 4,51	17,33 ± 0,58	131,67 ± 7,51
1044524	0,01	17,67 ± 4,73	85,00 ± 15,72	21,00 ± 1,73	128,67 ± 25,79
1044524	0,02	15,33 ± 6,43	80,00 ± 8,89	16,67 ± 2,08	130,67 ± 13,01
1044524	0,04	15,33 ± 1,53	96,00 ± 6,56	17,67 ± 2,31	146,00 ± 23,07
1044524	0,07	21,67 ± 2,08	109,00 ± 12,17	18,50 ± 0,71	135,33 ± 12,22
1044524	0,17	15,33 ± 0,58	112,67 ± 14,64	23,67 ± 3,06	111,33 ± 12,22
Positivkontrolle		80,00 ± 20,22	300,67 ± 25,48	905,67 ± 73,92	938,67 ± 82,40
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		7,67 ± 2,89	136,67 ± 21,57	12,67 ± 3,21	131,33 ± 5,51
1044524E	0,5	10,00 ± 1,00	134,00 ± 14,14	11,67 ± 2,89	136,33 ± 14,84
1044524E	1	9,67 ± 2,08	145,00 ± 23,81	13,33 ± 3,21	157,67 ± 8,74
1044524E	2	12,67 ± 2,08	154,67 ± 17,39	11,00 ± 6,24	105,00 ± 14,93
1044524E	4	13,00 ± 2,00	137,67 ± 15,63	11,67 ± 1,15	118,33 ± 4,93
1044524E	8,5	9,67 ± 0,58	144,00 ± 2,00	15,00 ± 4,00	143,00 ± 16,52
Positivkontrolle		533,00 ± 82,53	650,67 ± 30,29	1207,33 ± 104,16	1886,00 ± 356,80
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		14,33 ± 3,51	108,33 ± 4,51	17,33 ± 0,58	132,67 ± 5,77
1044537	0,01	18,33 ± 2,52	97,67 ± 24,01	20,33 ± 2,31	133,67 ± 11,15
1044537	0,02	16,67 ± 4,51	119,33 ± 12,66	17,67 ± 1,53	121,67 ± 14,84
1044537	0,04	16,33 ± 1,53	98,33 ± 23,86	24,33 ± 3,21	123,00 ± 21,52
1044537	0,07	14,00 ± 1,73	107,00 ± 3,46	21,33 ± 4,16	118,33 ± 12,01
1044537	0,17	16,00 ± 5,00	112,33 ± 11,37	15,67 ± 1,53	137,33 ± 14,84
Positivkontrolle		118,67 ± 9,45	300,67 ± 25,48	905,67 ± 73,92	938,67 ± 82,40
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		7,67 ± 2,89	136,67 ± 21,57	12,67 ± 3,21	131,33 ± 5,51
1044537E	0,5	11,67 ± 2,08	128,00 ± 12,17	10,67 ± 2,31	124,67 ± 13,58
1044537E	1	11,33 ± 3,06	116,00 ± 10,44	10,67 ± 2,08	111,00 ± 17,35
1044537E	2	10,67 ± 4,93	128,33 ± 11,59	10,67 ± 6,35	104,67 ± 28,71
1044537E	4	11,67 ± 2,08	138,67 ± 16,17	12,67 ± 2,08	121,33 ± 11,68
1044537E	8,5	13,67 ± 5,03	137,33 ± 8,14	13,33 ± 3,21	107,67 ± 14,64
Positivkontrolle		533,00 ± 82,53	650,67 ± 30,29	1207,33 ± 104,16	1886,00 ± 356,80

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-2: Probenahme 2 vom 03.11.2010, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		12,00 ± 2,00	94,33 ± 12,10	12,67 ± 3,21	131,33 ± 5,51
1044524	0,01	12,67 ± 4,04	86,00 ± 6,08	10,33 ± 2,08	151,33 ± 14,47
1044524	0,02	18,00 ± 4,00	91,33 ± 8,39	13,33 ± 1,53	155,67 ± 15,95
1044524	0,04	17,67 ± 6,51	87,67 ± 4,62	11,67 ± 4,51	127,00 ± 12,12
1044524	0,07	14,67 ± 5,51	95,67 ± 13,32	10,67 ± 4,04	142,33 ± 30,24
1044524	0,17	11,67 ± 3,06	101,00 ± 5,57	11,33 ± 1,53	143,67 ± 25,11
Positivkontrolle		188,67 ± 51,16	324,00 ± 8,00	1207,33 ± 104,16	1886,00 ± 356,80
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		43,31 ± 6,25	189,27 ± 10,88	19,47 ± 4,68	161,98 ± 8,90
1044524E	0,5	41,53 ± 8,96	175,03 ± 9,80	18,19 ± 7,94	90,54 ± 38,54
1044524E	1	41,53 ± 8,03	186,90 ± 17,80	17,01 ± 2,69	181,65 ± 72,42
1044524E	2	35,60 ± 4,71	204,70 ± 4,71	19,95 ± 10,01	105,87 ± 60,92
1044524E	4	37,38 ± 5,34	210,04 ± 6,17	21,12 ± 5,28	133,73 ± 46,24
1044524E	8,5	33,82 ± 7,12	185,12 ± 10,07	17,60 ± 6,35	165,50 ± 59,59
Positivkontrolle		550,11 ± 48,08	922,63 ± 50,36	1064,36 ± 77,44	1509,44 ± 191,82
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		12,00 ± 2,00	94,33 ± 12,10	17,33 ± 0,58	132,67 ± 5,77
1044537	0,01	7,67 ± 2,08	98,33 ± 9,61	14,67 ± 4,93	144,67 ± 30,02
1044537	0,02	14,67 ± 4,62	104,33 ± 6,66	20,33 ± 11,02	141,33 ± 22,68
1044537	0,04	14,33 ± 2,31	87,33 ± 15,95	19,00 ± 4,36	143,33 ± 30,99
1044537	0,07	13,33 ± 5,86	91,67 ± 7,51	17,33 ± 2,31	118,67 ± 23,86
1044537	0,17	17,50 ± 0,71	99,67 ± 10,02	16,00 ± 1,73	152,50 ± 20,51
Positivkontrolle		188,67 ± 51,16	324,00 ± 8,00	905,67 ± 73,92	937,67 ± 81,00
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		43,31 ± 6,25	102,65 ± 89,11	19,47 ± 4,68	104,38 ± 12,15
1044537E	0,5	37,97 ± 7,19	165,54 ± 9,91	23,47 ± 2,69	141,86 ± 28,58
1044537E	1	36,19 ± 1,03	177,41 ± 46,90	18,77 ± 5,38	147,05 ± 45,25
1044537E	2	45,00 ± 8,14	163,17 ± 8,96	19,95 ± 7,11	92,84 ± 22,84
1044537E	4	38,57 ± 4,48	166,73 ± 60,03	17,60 ± 3,05	93,42 ± 9,53
1044537E	8,5	35,01 ± 10,88	175,33 ± 18,88	21,71 ± 3,66	121,85 ± 40,35
Positivkontrolle		550,11 ± 48,08	922,63 ± 50,36	1064,36 ± 77,44	1405,34 ± 87,09

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-3: Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, Volumengesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		16,11 ± 3,58	134,60 ± 15,46	23,14 ± 8,16	104,43 ± 8,32
1044531	0,01	21,39 ± 14,41	175,41 ± 9,69	29,06 ± 3,70	107,95 ± 9,03
1044531	0,02	20,78 ± 2,27	141,97 ± 5,08	22,75 ± 1,75	101,49 ± 9,03
1044531	0,04	26,90 ± 6,88	164,85 ± 14,97	23,33 ± 8,08	96,80 ± 10,99
1044531	0,07	15,75 ± 5,28	174,83 ± 21,00	23,33 ± 1,01	119,09 ± 15,77
1044531	0,17	25,51 ± 20,48	195,95 ± 33,27	22,75 ± 9,26	100,91 ± 4,43
Positivkontrolle		395,67 ± 75,13	664,11 ± 43,98	834,51 ± 96,80	963,31 ± 34,32
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		16,71 ± 4,13	127,89 ± 3,66	17,21 ± 6,25	161,98 ± 8,90
1044531E	0,5	17,19 ± 4,04	123,79 ± 11,45	20,77 ± 6,25	190,07 ± 16,94
1044531E	1	15,25 ± 5,38	126,63 ± 6,23	15,43 ± 1,03	173,85 ± 24,17
1044531E	2	12,32 ± 6,10	118,07 ± 17,83	20,77 ± 2,72	173,25 ± 10,43
1044531E	4	9,97 ± 1,02	182,15 ± 18,53	23,14 ± 5,34	179,19 ± 10,28
1044531E	8,5	15,84 ± 7,04	134,09 ± 27,19	20,77 ± 1,03	167,91 ± 25,75
Positivkontrolle		276,26 ± 39,31	586,08 ± 19,99	1533,17 ± 13,36	1509,44 ± 191,82
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		16,11 ± 3,58	134,60 ± 15,46	23,14 ± 8,16	104,43 ± 8,32
1044544	0,01	14,24 ± 1,78	138,45 ± 15,46	20,42 ± 4,40	103,84 ± 14,41
1044544	0,02	17,21 ± 5,44	136,11 ± 10,01	21,58 ± 2,67	118,51 ± 18,67
1044544	0,04	10,68 ± 1,78	140,21 ± 18,49	18,38 ± 3,71	111,47 ± 10,01
1044544	0,07	14,83 ± 4,11	242,29 ± 10,61	20,13 ± 16,09	124,37 ± 5,38
1044544	0,17	17,21 ± 4,48	168,96 ± 4,66	18,67 ± 7,07	109,71 ± 14,23
Positivkontrolle		395,67 ± 75,13	664,11 ± 43,98	834,51 ± 96,80	963,31 ± 34,32
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		16,71 ± 4,13	127,89 ± 3,66	17,21 ± 6,25	161,98 ± 8,90
1044544E	0,5	10,56 ± 1,76	128,75 ± 29,59	32,04 ± 6,17	168,84 ± 31,10
1044544E	1	13,49 ± 5,66	149,52 ± 12,84	32,63 ± 4,48	175,33 ± 24,17
1044544E	2	17,60 ± 6,35	127,57 ± 17,10	21,36 ± 11,67	173,25 ± 10,43
1044544E	4	16,43 ± 1,02	115,11 ± 12,88	17,21 ± 5,14	185,12 ± 10,28
1044544E	8,5	15,84 ± 6,35	112,24 ± 27,56	23,14 ± 1,78	167,91 ± 25,75
Positivkontrolle		276,26 ± 39,31	586,08 ± 19,99	1533,17 ± 13,36	1509,44 ± 191,82

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-4: Wiederholte Untersuchung der Probenahme 3 vom 18.11.2010, 5 mg/L Ozon, Volumengesteuert, Abwasser, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle			88,33 ± 6,43		
1044531	0,01		101,67 ± 14,57		
1044531	0,02		103,33 ± 17,04		
1044531	0,04		103,67 ± 4,51		
1044531	0,07		81,33 ± 15,53		
1044531	0,17		94,33 ± 6,35		
Positivkontrolle			298,00 ± 33,05		
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle			88,33 ± 6,43		
1044544	0,01		128,75 ± 29,59		
1044544	0,02		149,52 ± 12,84		
1044544	0,04		127,57 ± 17,10		
1044544	0,07		115,11 ± 12,88		
1044544	0,17		112,24 ± 27,56		
Positivkontrolle			298,00 ± 33,05		

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-5: Probenahme 4 vom 23.11.2010, 5 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		28,48 ± 1,78	195,21 ± 13,83	29,67 ± 4,11	150,71 ± 25,82
1044533	0,01	29,67 ± 6,74	207,67 ± 24,94	30,85 ± 9,13	147,74 ± 31,49
1044533	0,02	42,72 ± 8,16	180,37 ± 12,12	25,51 ± 12,50	144,18 ± 16,05
1044533	0,04	31,76 ± 9,29	184,53 ± 19,03	20,17 ± 17,47	166,73 ± 9,80
1044533	0,07	28,48 ± 5,34	170,88 ± 21,58	22,55 ± 6,25	167,32 ± 6,17
1044533	0,17	31,45 ± 5,44	165,54 ± 5,03	30,26 ± 8,90	172,07 ± 3,71
Positivkontrolle		264,63 ± 25,82	1124,64 ± 40,89	1102,41 ± 161,19	1422,81 ± 97,01
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		28,48 ± 1,78	195,21 ± 13,83	29,67 ± 4,11	150,71 ± 25,82
1044533E	0,5	38,57 ± 5,72	177,41 ± 18,27	32,04 ± 12,46	158,42 ± 12,84
1044533E	1	29,67 ± 11,58	177,41 ± 21,24	37,97 ± 3,71	159,31 ± 16,54
1044533E	2	32,04 ± 9,42	217,75 ± 22,54	32,63 ± 5,72	165,84 ± 25,49
1044533E	4	27,89 ± 6,74	178,00 ± 32,38	33,82 ± 10,83	186,43 ± 9,58
1044533E	8,5	30,26 ± 9,42	186,90 ± 17,62	33,82 ± 6,42	168,26 ± 16,41
Positivkontrolle		264,63 ± 25,82	1124,64 ± 40,89	1102,41 ± 161,19	1422,81 ± 97,01
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		14,20 ± 1,59	138,45 ± 8,13	13,49 ± 4,06	162,89 ± 29,58
1044546	0,01	14,67 ± 4,06	176,00 ± 27,44	17,60 ± 7,04	125,30 ± 13,51
1044546	0,02	9,97 ± 3,66	154,88 ± 16,79	21,12 ± 6,10	169,45 ± 19,80
1044546	0,04	19,95 ± 2,69	131,41 ± 9,69	25,23 ± 8,32	173,63 ± 7,80
1044546	0,07	15,25 ± 2,69	176,27 ± 8,68	21,12 ± 6,35	171,24 ± 22,09
1044546	0,17	19,36 ± 6,35	171,24 ± 7,23	24,05 ± 8,86	173,03 ± 4,13
Positivkontrolle		588,43 ± 152,12	766,77 ± 24,02	1215,57 ± 161,06	1659,93 ± 117,12
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		28,48 ± 1,78	195,21 ± 13,83	29,67 4,11	150,71 ± 25,82
1044546E	0,5	39,75 ± 1,03	226,65 ± 48,46	26,70 ± 0,00	138,84 ± 13,90
1044546E	1	34,41 ± 2,72	179,78 ± 23,95	32,04 ± 5,34	136,17 ± 7,19
1044546E	2	33,23 ± 5,72	160,79 ± 22,68	39,16 ± 11,12	143,59 ± 11,85
1044546E	4	30,85 ± 7,41	144,77 ± 12,88	38,57 ± 15,14	132,61 ± 20,06
1044546E	8,5	41,53 ± 4,48	163,76 ± 32,72	44,50 ± 1,78	169,10 ± 28,48
Positivkontrolle		264,63 ± 25,82	1124,64 ± 40,89	1102,41 ± 161,19	1422,81 ± 97,01

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-6: Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		43,31 ± 6,25	102,65 ± 89,11	64,20 ± 28,82	104,38 ± 12,15
1048044	0,01	35,60 ± 1,78	239,11 ± 45,88	75,95 ± 40,99	86,50 ± 19,65
1048044	0,02	40,94 ± 18,07	277,09 ± 27,82	65,36 ± 10,93	129,75 ± 21,61
1048044	0,04	35,01 ± 8,78	218,05 ± 19,27	30,74 ± 11,59	89,96 ± 23,97
1048044	0,07	32,63 ± 7,41	236,15 ± 14,50	41,18 ± 6,59	85,64 ± 23,40
1048044	0,17	37,97 ± 7,41	246,53 ± 21,40	40,02 ± 13,81	109,57 ± 25,09
Positivkontrolle		550,11 ± 48,08	922,63 ± 50,36	1130,52 ± 241,86	1405,34 ± 87,09
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		43,31 ± 6,25	102,65 ± 89,11	64,20 ± 28,82	161,98 ± 8,90
1048044E	0,5	42,72 ± 1,78	288,95 ± 37,73	25,52 ± 4,02	98,61 ± 19,95
1048044E	1	40,35 ± 3,71	310,91 ± 19,61	43,50 ± 15,17	142,73 ± 46,75
1048044E	2	45,09 ± 8,96	357,19 ± 41,38	22,81 ± 6,36	106,68 ± 27,59
1048044E	4	39,75 ± 6,74	259,29 ± 97,89	37,97 ± 16,15	106,40 ± 13,44
1048044E	8,5	39,75 ± 3,71	225,17 ± 33,98	38,48 ± 7,99	126,29 ± 27,68
Positivkontrolle		550,11 ± 48,08	922,63 ± 50,36	1130,52 ± 241,86	1509,44 ± 191,82
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		28,83 ± 11,12	80,37 ± 15,97	19,47 ± 4,68	98,61 ± 37,55
1048045	0,01	29,89 ± 3,41	134,94 ± 19,95	25,37 ± 2,70	94,00 ± 19,90
1048045	0,02	20,06 ± 4,45	89,38 ± 11,78	21,21 ± 4,73	103,80 ± 20,40
1048045	0,04	30,68 ± 4,09	122,25 ± 38,70	25,23 ± 2,69	113,60 ± 34,14
1048045	0,07	30,68 ± 7,15	75,54 ± 19,06	23,47 ± 4,43	108,99 ± 34,73
1048045	0,17	25,96 ± 7,98	65,74 ± 12,23	17,01 ± 2,03	65,74 ± 22,62
Positivkontrolle		308,52 ± 43,16	301,60 ± 32,93	1064,36 ± 77,44	1212,73 ± 365,63
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		28,83 ± 11,12	80,37 ± 15,97	19,47 ± 4,68	98,61 ± 37,55
1048045E	0,5	29,31 ± 5,66	82,46 ± 18,17	20,65 ± 1,02	89,38 ± 10,43
1048045E	1	18,88 ± 5,69	73,81 ± 21,63	19,44 ± 3,10	79,58 ± 12,48
1048045E	2	31,86 ± 4,68	98,03 ± 41,10	25,81 ± 4,43	112,45 ± 34,47
1048045E	4	29,50 ± 9,08	68,05 ± 11,52	22,29 ± 4,43	104,67 ± 33,14
1048045E	8,5	23,01 ± 3,54	75,26 ± 1,22	9,39 ± 2,03	65,74 ± 28,58
Positivkontrolle		308,52 ± 43,16	301,60 ± 32,93	1064,36 ± 77,44	1212,73 ± 365,63

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

Tabelle 8-7: Wiederholte Untersuchung Probenahme 5 vom 08.02.2011, 2 mg/L Ozon, SAK-gesteuert, Abwasser und 50-fach Extrakte, Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abwasser		Zulauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		214,80 ± 37,89			
1048044	0,01	210,33 ± 11,50			
1048044	0,02	218,33 ± 48,44			
1048044	0,04	222,00 ± 39,61			
1048044	0,07	230,00 ± 31,19			
1048044	0,17	222,67 ± 27,30			
Positivkontrolle		1180,80 ± 42,45			
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		214,80 ± 37,89			
1048044E	0,5	232,10 ± 13,19			
1048044E	1	237,47 ± 52,17			
1048044E	2	252,99 ± 18,11			
1048044E	4	246,42 ± 5,17			
1048044E	8,5	200,48 ± 5,06			
Positivkontrolle		1180,80 ± 42,45			
Abwasser		Ablauf			
Prob. Nr.	VF	Teststamm			
		TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		214,80 ± 37,89			
1048045	0,01	198,67 ± 18,58			
1048045	0,02	201,33 ± 3,51			
1048045	0,04	216,00 ± 19,16			
1048045	0,07	170,00 ± 26,63			
1048045	0,17	205,33 ± 16,50			
Positivkontrolle		1180,80 ± 42,45			
Extrakte		Teststamm			
Prob. Nr.	VF	TA98 - S9	TA100 - S9	TA98 + S9	TA100 + S9
Negativkontrolle		214,80 ± 37,89			
1048045E	0,5	191,53 ± 54,62			
1048045E	1	157,52 ± 28,42			
1048045E	2	181,98 ± 34,54			
1048045E	4	146,78 ± 3,58			
1048045E	8,5	229,12 ± 23,48			
Positivkontrolle		1180,80 ± 42,45			

S9: Rattenleberenzym-Mix, VF: Verdünnungsfaktor, n=3

8.2 Bromid und Bromatkonzentrationen

Tabelle 8-8: Detailergebnisse der Bromid und Bromatkonzentrationen (AP 2 und Teilergebnisse aus TP 6)

Anlage	Datum	Versuchsbeschreibung	Probenart	Zspez [mg O ₃ /mg DOC]	Wasser- temperatur [°C]	Bromid [µg/L]	Bromat [µg/L]
Bad Sassendorf	18.10.2010	vor Ozonung	24 h MP			140	< 1,0
Bad Sassendorf	18.10.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,5	15,9	150	4,8
Bad Sassendorf	19.10.2010	vor Ozonung	24 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.10.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,3	15,7	140	2,7
Bad Sassendorf	20.10.2010	vor Ozonung	24 h MP			130	n. b.
Bad Sassendorf	20.10.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,3	15,2	130	1,3
Bad Sassendorf	02.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			160	n. b.
Bad Sassendorf	02.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,4	14,9	160	3,3
Bad Sassendorf	03.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			160	n. b.
Bad Sassendorf	03.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,3	15,1	160	3,5
Bad Sassendorf	04.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			110	n. b.
Bad Sassendorf	04.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,4	14,4	110	2,9
Bad Sassendorf	09.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	09.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,7	14,0	140	7,9
Bad Sassendorf	10.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			80	n. b.
Bad Sassendorf	10.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,8	13,8	70	4,3
Bad Sassendorf	11.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			90	n. b.
Bad Sassendorf	11.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,6	12,4	90	6,9
Bad Sassendorf	16.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			110	n. b.
Bad Sassendorf	16.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,8	13,5	120	7,5
Bad Sassendorf	17.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			110	n. b.
Bad Sassendorf	17.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,9	13,5	150	8,9
Bad Sassendorf	18.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			110	n. b.
Bad Sassendorf	18.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	1,0	13,5	110	8,1
Bad Sassendorf	22.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	22.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	1,0	13,3	120	8,2
Bad Sassendorf	23.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			130	n. b.
Bad Sassendorf	23.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	0,3	13,2	120	3,1
Bad Sassendorf	24.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			130	n. b.
Bad Sassendorf	24.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	k.A.	12,6	110	8,8
Bad Sassendorf	29.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			150	n. b.
Bad Sassendorf	29.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	k.A.	12,2	140	7,9
Bad Sassendorf	30.11.2010	vor Ozonung	24 h MP			160	n. b.
Bad Sassendorf	30.11.2010	nach Ozonung	24 h MP	k.A.	12,1	140	5,1
Bad Sassendorf	06.12.2010	vor Ozonung	24 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	06.12.2010	nach Ozonung	24 h MP	k.A.	10,9	130	8,7
Bad Sassendorf	07.12.2010	vor Ozonung	24 h MP			150	n. b.
Bad Sassendorf	07.12.2010	nach Ozonung	24 h MP	k.A.	11,2	150	11,7
Bad Sassendorf	09.05.2011	vor Ozonung	8 h MP			180	n. b.
Bad Sassendorf	09.05.2011	vor Ozonung	10 h MP			190	n. b.
Bad Sassendorf	10.05.2011	vor Ozonung	6 h MP			180	n. b.

Anlage	Datum	Versuchsbeschreibung	Probenart	Zspez [mg O ₃ /mg DOC]	Wasser- temperatur [°C]	Bromid [µg/L]	Bromat [µg/L]
Bad Sassendorf	10.05.2011	vor Ozonung	8 h MP			170	n. b.
Bad Sassendorf	10.05.2011	vor Ozonung	10 h MP			170	n. b.
Bad Sassendorf	11.05.2011	vor Ozonung	6 h MP			170	n. b.
Bad Sassendorf	09.05.2011	vor Ozonung	24 h MP			190	n. b.
Bad Sassendorf	10.05.2011	vor Ozonung	24 h MP			170	n. b.
Bad Sassendorf	09.05.2011	nach Ozonung	8 h MP	1,0	15,8	190	34
Bad Sassendorf	09.05.2011	nach Ozonung	10 h MP	1,0	15,8	180	31
Bad Sassendorf	10.05.2011	nach Ozonung	6 h MP	0,9	15,8	180	37
Bad Sassendorf	10.05.2011	nach Ozonung	8 h MP	1,0	15,8	170	35
Bad Sassendorf	10.05.2011	nach Ozonung	10 h MP	1,1	16,0	170	30
Bad Sassendorf	11.05.2011	nach Ozonung	6 h MP	1,1	16,0	160	36
Bad Sassendorf	09.05.2011	nach Ozonung	24 h MP			170	35
Bad Sassendorf	10.05.2011	nach Ozonung	24 h MP			160	34
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			120	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			130	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			130	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	2 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	8 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	19.05.2011	vor Ozonung	10 h MP			140	n. b.
Bad Sassendorf	20.05.2011	vor Ozonung	6 h MP			160	n. b.
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	27
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	29
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	28
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	27
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	31
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	26
Bad Sassendorf	18.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	25
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	26
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	23
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			120	23
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			110	26
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	2 h MP			110	28
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	8 h MP	1,1	15,7	120	20
Bad Sassendorf	19.05.2011	nach Ozonung	10 h MP	1,1	15,7	120	15
Bad Sassendorf	20.05.2011	nach Ozonung	6 h MP	1,0	15,7	130	15
Bad Sassendorf	23.05.2011	vor Ozonung	8 h MP			110	n. b.

Anlage	Datum	Versuchsbeschreibung	Probenart	Zspez [mg O ₃ /mg DOC]	Wasser- temperatur [°C]	Bromid [µg/L]	Bromat [µg/L]
Bad Sassendorf	23.05.2011	vor Ozonung	10 h MP			110	n. b.
Bad Sassendorf	24.05.2011	vor Ozonung	6 h MP			120	n. b.
Bad Sassendorf	23.05.2011	nach Ozonung	8 h MP	0,7	16,5	120	5
Bad Sassendorf	23.05.2011	nach Ozonung	10 h MP	0,7	16,7	120	5,4
Bad Sassendorf	24.05.2011	nach Ozonung	6 h MP	0,7	16,7	120	6,4
Bad Sassendorf	24.05.2011	vor Ozonung	8 h MP			120	n. b.
Bad Sassendorf	24.05.2011	vor Ozonung	10 h MP			120	n. b.
Bad Sassendorf	25.05.2011	vor Ozonung	6 h MP			120	n. b.
Bad Sassendorf	24.05.2011	nach Ozonung	8 h MP	0,8	17,0	120	9,5
Bad Sassendorf	24.05.2011	nach Ozonung	10 h MP	0,8	17,0	120	8,2
Bad Sassendorf	25.05.2011	nach Ozonung	6 h MP	0,8	17,0	120	8,3
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			30	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP				< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0

Anlage	Datum	Versuchsbeschreibung	Probenart	Zspez [mg O ₃ /mg DOC]	Wasser- temperatur [°C]	Bromid [µg/L]	Bromat [µg/L]
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	15.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14./15.06.2011	Zulauf Ozonanlage	24 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	14./15.06.2011	Injektor	24 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	14./15.06.2011	Diffusor	24 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			60	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	n. b.
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	n. b.
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	n. b.
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Zulauf Ozonanlage	2 h MP			40	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	2,6
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	1
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	1,3
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	1,5
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	1,1
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 1	2 h MP			50	1,5
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	1,5
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	1,5
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			60	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			80	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	22.06.2011	Ablauf Ozonanlage Straße 2	2 h MP			50	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21. /22.06.2011	Zulauf Ozonanlage	24 h MP			50	n. b.
Duisburg-Vierlinden	21. /22.06.2011	Injektor	24 h MP			40	< 1,0
Duisburg-Vierlinden	21. /22.06.2011	Diffusor	24 h MP			60	< 1,0