

# Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

1. Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.

2. Universität Duisburg-Essen, Institut für Umweltanalytik

3. Universität Duisburg-Essen, Universitätsklinikum Essen, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur  
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie  
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **15862 N**

***Untersuchungen zur Bewertung und Vermeidung von toxischen Oxidationsnebenprodukten  
bei der oxidativen Abwasserbehandlung***

(Bewilligungszeitraum: 01.11.2008 - 30.04.2011)

der AiF-Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Duisburg, den 30.06.2011

Essen, den 28.06.2011

Essen, den 29.06.2011

Ort, Datum

Dr. Jochen Türk

PD Dr. Kai Bester

Prof. Dr. Elke Dopp

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)  
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung .....	2
2.1 Anlass des Forschungsantrags und Ausgangssituation.....	2
2.2 Stand der Forschung und Technik.....	7
2.2.1 Einleitung .....	7
2.2.2 Erweiterte Oxidationsverfahren (Advanced Oxidation Processes – AOP).....	9
2.2.3 Toxikologische Testsysteme zur Bewertung von AOP-Verfahren.....	12
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Experimentelles.....	15
3.1.1 Chemikalien zur Durchführung der AOP Versuche.....	15
3.1.2 Ozonierungsversuche im Labormaßstab am IUTA .....	16
3.1.3 Ozonierungsversuche im Labormaßstab an der Universität Duisburg-Essen .	16
3.1.4 Ozonierungsversuche im Pilotmaßstab .....	17
3.1.5 UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Labormaßstab.....	17
3.1.6 UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Versuche mit TPP, TBEP und TCPP .....	18
3.1.7 UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Pilotmaßstab.....	18
3.1.8 UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation in der Durchflussanlage.....	19
3.2 Analysenmethoden .....	20
3.2.1 Probenvorbereitung Festphasenextraktion (SPE).....	20
3.2.2 Probenvorbereitung Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).....	22
3.2.3 HPLC-MS/MS .....	23

3.2.4	GC-MS .....	25
3.3	Toxizitäts-Tests .....	27
3.3.1	Chemikalien und Zellen .....	27
3.3.2	Ansetzen der Zellkultur .....	28
3.3.3	Probenvorbereitung .....	29
3.3.4	Cytotoxizität .....	29
3.3.5	Gentoxizität (Alkaline Comet Assay) .....	31
3.3.6	Mutagenität (Ames MPF 98/100 Aqua Test) .....	33
3.3.7	Östrogenität (ER Calux) .....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	Auswahl und Priorisierung repräsentativer Markersubstanzen (AP 3.3.1) .....	35
4.2	Adaptierung der toxikologischen Methoden an die Matrix Kläranlagen- ablauf (AP3.3.4) .....	36
4.3	Chemische und toxikologische Untersuchungen der einzelnen Oxidationsversuche .....	38
4.3.1	Amidotrizoesäure .....	39
4.3.2	Atenolol .....	41
4.3.3	Bisphenol A .....	42
4.3.4	Carbamazepin .....	45
4.3.5	Ciprofloxacin .....	48
4.3.6	Diclofenac .....	53
4.3.7	Ethinylestradiol .....	55
4.3.8	Galaxolid (HHCB) .....	58
4.3.9	Irgarol 1051 .....	61
4.3.10	Metoprolol .....	65
4.3.11	Ofloxacin .....	69
4.3.12	Organophosphate .....	74

4.3.13	Sulfamethoxazol.....	79
4.3.14	Terbutryn.....	83
4.3.15	Tonalid (AHTN).....	88
4.3.16	Triclosan .....	92
4.3.17	Substanzmix .....	96
4.4	Installation, Inbetriebnahme und Ergebnisse der UV-Durchflussanlage.....	101
4.5	Erstellung einer Datenbank über Oxidationsnebenprodukte .....	106
5	Diskussion und Ausblick.....	109
5.1	Diskussion.....	109
5.2	Ausblick.....	112
6	Gegenüberstellung der erzielten Ergebnisse mit den im Forschungsantrag beabsichtigten Zielen .....	114
7	Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (KMU) .....	118
7.1	Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse.....	118
7.2	Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU.. ..	119
8	Transfer der Ergebnisse in die Wirtschaft.....	121
8.1	Veröffentlichungen .....	123
8.1.1	Publikationen .....	124
8.1.2	Vorträge .....	125
8.1.3	Posterpräsentationen .....	127
8.2	Abschlussarbeiten .....	129
8.3	Projektbearbeiter .....	130
8.4	Autoren des Schlussberichtes .....	131
9	Literaturverzeichnis .....	132

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wellenlängenbereiche und zu Grunde liegende Photoreaktionen der AOP mit Licht [74].....	9
Abbildung 2: Aufbau der Laboranlage. ....	17
Abbildung 3: Aufbau der Pilotanlage.....	19
Abbildung 4: Aufbau der Durchflussanlage.....	20
Abbildung 5: Blutagarplatten mit Bakterienkolonien. Nach Ausstrich einer unbehandelten Kläranlagenablaufprobe (a) und eine Platte ohne Kolonien nach Ausstrich einer steril gefilterten Kläranlagenablaufprobe (b) nach 24 h Inkubation bei 37 °C. ....	37
Abbildung 6: Gentoxizitätsuntersuchungen von UV-behandelten Proben. Statistische Auswertung durch Mann Whitney Test: **signifikant; ***hoch signifikant. ....	38
Abbildung 7: Abbaukurven von Amidotrizoesäure aus dotiertem Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab. ....	40
Abbildung 8: Cytotoxizität und Genotoxizität von Amidotrizoesäure bei der UV-Oxidation. a) Cytotoxische Effekte konnten weder vor noch nach der Behandlung nachgewiesen werden. b) Die Proben ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , sowie die Probe vor der Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> wiesen keine gentoxischen Eigenschaften auf. Ein Nachweis der Gentoxizität für die mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und für 10 min behandelte Probe war auf Grund einer zu starken Schädigung nicht mehr möglich. n.a. = nicht auswertbar. ....	41
Abbildung 9: Cyto- und Genotoxizitätsergebnisse von ozonisierten Atenolol. a) Keine Cytotoxizität von 0,2 mg/L Atenolol in Reinstwasser vor und nach der Ozonbehandlung. b) Keine erhöhte DNA Schädigung vor und nach der Ozonierung von Atenolol. ....	42
Abbildung 10: Toxizität von Bisphenol A vor und nach der Ozonierung und UV Oxidation. a) Der Nachweis auf ein cytotoxisches Potenzial fiel für alle vor und nach der Ozonierung untersuchten Proben negativ aus. b) Auch konnte für keine dieser Proben eine Gentoxizität nachgewiesen werden. c) Außer für die Reinstwasserprobe nach 60 min UV Behandlung konnten für keine weitere Probe cytotoxische Effekte nachgewiesen werden. d) Außer der cytotoxischen Probe, die nicht auf gentoxische Effekte untersucht wurde, waren alle Proben im Alkaline Comet Assay negativ. ....	44
Abbildung 11: Abbaukurven von Carbamazepin in Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab sowie mit der Durchflussanlage.....	46
Abbildung 12: Eliminationsraten von Carbamazepin aus dotiertem Reinstwasser (c <sub>0</sub> = 0,05 mmol/L als Einzelsubstanz bzw. c <sub>0</sub> = 100 µg/L im Substanzmix), Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf (c <sub>0</sub> = 0,05 mmol/L) mittels verschiedener Ozonkonzentrationen. ....	47

Abbildung 13: a) Keine Cytotoxizität der Proben mit 10 µg/L Carbamazepin, weder vor noch nach der UV-Oxidation mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . b) Die ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandelten Proben haben kein gentoxisches Potenzial, wohingegen, die Proben mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nach 10 min und 30 min UV-Behandlung gentoxisch wirken. n.a. = nicht auswertbar. ....	48
Abbildung 14: Laborversuche zum Abbau von Ciprofloxacin mittels UV und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aus dotierten HPLC Wasser und Kläranlagenablauf, c <sub>0</sub> = 16 µg/L.....	49
Abbildung 15: Cytotoxizität von Ciprofloxacin in Kläranlagenablauf. a) Keine cytotoxischen Effekte von 1,4 mg/L Ciprofloxacin vor und nach der Ozonierung. b) Keine Cytotoxizität von 1,7 mg/L Ciprofloxacin vor und nach der UV Oxidation.....	51
Abbildung 16: Reinstwasser mit (c <sub>0</sub> Ozonierung = 1,4 mg/L, c <sub>0</sub> UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 0,1 mg/L) und ohne Ciprofloxacin. Keine cytotoxischen Effekte vor und nach der Ozonierung oder UV Oxidation.....	51
Abbildung 17: Gentoxizität von Ciprofloxacin in Reinstwasser (RW) oder Kläranlagenablauf (AW) vor und nach der Ozonierung (1,4 mg/L Ciprofloxacin) oder UV Oxidation (0,1 mg/L Ciprofloxacin). a) Ozonierung in RW. b) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oxidation in RW. c) Ozonierung von AW. d) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oxidation von AW.....	52
Abbildung 18: Abbaukurven von Diclofenac in dotiertem Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab sowie mit der Durchflussanlage. ....	54
Abbildung 19: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von 10 µg/L Diclofenac in Reinstwasser vor und nach der UV Oxidation mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . In keinem der Tests konnten toxische Effekte nachgewiesen werden.....	55
Abbildung 20: Abbau von Ethinylestradiol (c <sub>0</sub> = 0,05 mmol/L) aus Reinstwasser mittels UV-Oxidation unter Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (c = 0,3 g/L).....	56
Abbildung 21: Eliminationsraten von Ethinylestradiol (c <sub>0</sub> = 0,05 mmol/L) in Reinstwasser unter Zugabe verschiedener Ozonkonzentrationen. ....	56
Abbildung 22: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) ozonierten HHCB Probe. ....	58
Abbildung 23: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) mit UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandelten HHCB Probe. ....	59
Abbildung 24: Keine cytotoxischen (a) und gentoxischen Effekte (b) von HHCB und HHCB Lacton im MTT Test und Alkaline Comet Assay bis zu einer Konzentration von 50 µg/L. ....	60
Abbildung 25: a) Stark cytotoxische Effekte der 60 min UV-behandelten Probe, keine Effekte der unbehandelten und der für 30 min behandelten Probe. b) Keine gentoxischen Effekte vor der Behandlung und nach 30 min. n.g. = nicht getestet. ....	61
Abbildung 26: Abbaukinetik von Irgarol 1051 (c <sub>0</sub> = 200 µg/mL) in Kläranlagenablauf in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration. ....	62

Abbildung 27: Zeitlicher Ablauf der Oxidation von Irgarol 1051 bei der UV-Oxidation mit und ohne Wasserstoffperoxidzugabe. ....	63
Abbildung 28: Keine cytotoxischen (a) und gentoxischen (b) Effekte von 0,75 mg/L Irgarol vor und nach der Ozonierung mit 140 und 1000 µg Ozon je Liter. ....	64
Abbildung 29: UV-Chromatogramm einer unbehandelten (grün) und einer ozonierten (blau) Metoprolollösung ( $c_0 = 14$ mg/L). ....	65
Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf von Bildung und Abbau der Haupttransformationsprodukte bei der UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung von Metoprolol, $c_0 = 14$ mg/L, HPLC Wasser, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.3$ g/L im Labormaßstab. ....	66
Abbildung 31: Möglicher Abbauweg der UV-Oxidation von Metoprolol. ....	67
Abbildung 32: Ergebnisse der Cytotoxizitäts- und Genotoxizitätsuntersuchungen für Metoprolol. a) Keine cytotoxischen Effekte der Proben mit und ohne Metoprolol vor und nach der (a) Ozonierung (1,4 mg/L) und (b) UV Oxidation (0,1 mg/L). c) Keine Gentoxizität vor und nach der Ozonierung (c) oder UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oxidation (d). ....	68
Abbildung 33: Laborversuche zum Abbau von Ofloxacin mittels UV und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aus dotierten HPLC Wasser und Kläranlagenablauf, $c_0 = 18$ µg/L. ....	69
Abbildung 34: Bildung und Abbau der Haupttransformationsprodukte bei der UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung von Ofloxacin, $c_0 = 18$ mg/L, HPLC Wasser, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.3$ g/L, Labormaßstab. ....	71
Abbildung 35: Möglicher Abbauweg von Ofloxacin nach Behandlung mit AOP. ....	72
Abbildung 36: Cytotoxizität und Genotoxizität von 0,018 g/L Ofloxacin bei Ozon- und UV-Behandlung. Die Ozonierung ergab weder cytotoxische (a) noch gentoxische (b) Effekte. Keine cytotoxischen (c) oder gentoxischen (d) Effekte vor oder nach der UV Oxidation. Kläranlagenablauf mit 0,018 g/L Ofloxacin wurde ebenfalls sowohl vor als auch nach der Ozonierung oder UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oxidation auf ein mögliches toxikologisches Potenzial untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Oxidationsmethoden nicht zur Bildung toxischer Oxidationsnebenprodukte führen. Weder konnten cytotoxische Effekte (Abbildung 37a) noch gentoxische Effekte (Abbildung 37b) nachgewiesen werden. ....	73
Abbildung 37: Ofloxacin in dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 0,018$ g/L) vor und nach der Ozonierung oder UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung. a) Weder vor noch nach (60 min) der jeweiligen oxidativen Behandlung liegt eine Cytotoxizität (a) oder eine Gentoxizität (b) vor. ....	74
Abbildung 38: Konzentrationsverlauf der Organophosphate TPP, TBEP und TCPP nach kontinuierlicher Ozonierung von 5 mg O <sub>3</sub> /L über 120 Minuten [µg/mL]. ....	75
Abbildung 39: Konzentrationsabnahme von TPP durch Behandlung mit UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	76
Abbildung 40: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von TPP ( $c_0 = 0,1$ mg/L) vor und nach der UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung und Ozonierung (c = Cytotoxizität, d = Gentoxizität). ....	77

Abbildung 41: Toxizitätsuntersuchungen von TCEP ( $c_0 = 0,1 \text{ mg/L}$ ). a) Keine cytotoxischen oder gentoxischen Effekte (b) vor und nach 60 min Ozonierung. c) Keine cytotoxischen Effekte der unbehandelten Probe, aber stark cytotoxische Effekte nach 60 min UV-Oxidation. d) Gentoxische Effekte konnten weder vor noch nach der UV-Oxidation nachgewiesen werden. ....78

Abbildung 42: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von TCPP ( $c_0 = 0,1 \text{ mg/L}$ ). a) 60 min UV Oxidation führen zu mäßig cytotoxischen Effekten. Ozonierete und nicht die nicht UV Oxidierte Proben haben keine Effekte. b) Keine gentoxischen Effekte der getesteten Proben. n.g. = nicht getestet, da cytotoxisch.....79

Abbildung 43: UV-Chromatogramm einer ozonierten Sulfamethoxazol-Lösung ( $c_0 = 1 \text{ mg/L}$ ) vor (grün) und nach (blau) der Behandlung mit 5 mg Ozon pro Liter. ....80

Abbildung 44: Möglicher Abbauweg der Oxidation von Sulfamethoxazol.....81

Abbildung 45: Cytotoxizität von Sulfamethoxazol in Reinstwasser und Kläranlagenablauf. a) Reinstwasser mit Sulfamethoxazol und UV Oxidation. b) Kläranlagenablauf mit Sulfamethoxazol und Ozonierung. c) Ozoniertes Reinstwasser mit und ohne Sulfamethoxazol. d) Ozonierter Kläranlagenablauf mit und ohne Sulfamethoxazol. ....82

Abbildung 46: Untersuchung von gentoxischen Effekte nach der Ozonierung oder UV Oxidation in a) Reinstwasser und b) Kläranlagenablauf.....83

Abbildung 47: GC-MS TIC Chromatogramm von Terbutryn ( $2 \mu\text{mol/L}$ ) - (A) nicht oxidiert und oxidiert mit verschiedenen Ozon Konzentrationen ( $c_0 = 2$  (B), 5 (C) und  $10 \mu\text{mol/L}$ (D)).....84

Abbildung 48: HPLC-Orbitrap Produkt Ionen Scan eines Oxidationsproduktes von Terbutryn ( $m/z 258.14$ ; CID: 30 eV).....85

Abbildung 49: Abbaukinetik von Terbutryn ( $c_0 = 200 \mu\text{g/L}$ ) in Kläranlagenablauf in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration. ....86

Abbildung 50: Zeitlicher Ablauf der Oxidation von Terbutryn bei der UV-Oxidation mit und ohne Wasserstoffperoxid Zugabe. ....87

Abbildung 51: Cytotoxizität und Genotoxizität von ozonisiertem Terbutryn ( $c_0 = 490 \mu\text{g/L}$ ). a) Terbutryn vor der Behandlung, sowie nach der Ozonierung mit verschiedenen Konzentrationen hat keine cytotoxischen Effekte. b) Gentoxizität der unbehandelten, sowie der mit 36, 100 und  $195 \mu\text{g}/400 \text{ mL O}_3$  behandelten Probe.  $800 \mu\text{g}/400 \text{ mL}$  Ozon führen zu keinen gentoxischen Effekten.....88

Abbildung 52: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) ozonierten AHTN Probe. ....89

Abbildung 53: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) mit UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten AHTN Probe.....90

Abbildung 54: Toxizität von  $0,1 \text{ mg/L}$  AHTN in Reinstwasser. Die UV Oxidation von resultierte weder in cytotoxischen (a) noch in gentoxischen (b) Effekten. c) AHTN war weder vor noch nach der Ozonierung gentoxisch.....91

Abbildung 55: HPLC-MS/MS Q1-Scan Chromatogramm einer Probe mit einem Triclosan:Ozon-Verhältnis von 1:2 über (Elektronenspray-Ionisation mit negativer Polarisierung ESI (-) und Vorschlag zur Identifikation).....	93
Abbildung 56: Mögliche Abbauprodukte des Triclosans.....	94
Abbildung 57: Cytotoxizität und Genotoxizität von Triclosan und 2,4-Dichlorophenol. a) Triclosan und 2,4-Dichlorophenol haben bis zu einer Konzentration von 100 µg/L keine cytotoxischen Effekte. b) Triclosan wirkt mit steigenden Konzentrationen gentoxisch, 2,4-Dichlorophenol hingegen nicht.. ..	96
Abbildung 58: Abbaukurven des Substanzmix aus dotiertem Reinstwasser ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) mittels UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation (0,3 g/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	97
Abbildung 59: Abbaukurven des Substanzmix aus dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation (0,3 g/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	98
Abbildung 60: Eliminationsraten des Substanzmix im Kläranlagenablauf, dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) und dotiertem Reinstwasser ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) mittels verschiedener Ozonkonzentrationen.....	99
Abbildung 61: Toxizität eines Arzneimittelmixes mit je 10 µg/L Amidotrizoesäure, Sulfamethoxazol, Metoprolol, Diclofenac und Carbamazepin. a) Keine Verringerung der Vitalität vor und nach der UV Oxidation des Arzneimittelmixes mit und ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . B) Keine gentoxische Effekte vor oder nach der UV Oxidation ohne H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Vor und nach 15 min UV Oxidation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> keine Gentoxizität, nach 60 min UV Oxidation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gentoxische Effekte. n.a. = nicht auswertbar auf Grund zu starker DNA Schäden.....	100
Abbildung 62: Abbaukurven von ausgewählten Leitsubstanzen in dotiertem Leitungswasser und Kläranlagenablauf mittels UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation im Batchbetrieb der Durchflussanlage. .	102
Abbildung 63: Luftaufnahme der Kläranlage Bottrop (Quelle: Emschergenossenschaft). ...	102
Abbildung 64: Aufzeichnung des Messdatenschreibers während eines 24 h-Versuches. ...	103
Abbildung 65: Eliminationsraten der 24 h-Versuche im Ablauf der Kläranlage Bottrop für Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol mittels UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation. ....	104
Abbildung 66: Eliminationsraten von Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol aus Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Oxidation aus Stichprobenversuchen mit einer Durchflussrate von 6 m <sup>3</sup> /h. ....	105
Abbildung 67: Suchmaske der open source Datenbank DAIOS online.....	107
Abbildung 68: Eintrag des Analgetikums Diclofenac in der Datenbank DAIOS online.....	107

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien zur Durchführung der AOP Versuche.....	15
Tabelle 2: SPE-Methoden des Gilson-Systems. ....	21
Tabelle 3: Massenübergänge der Analyten in HPLC-MS/MS. ....	23
Tabelle 4: Massenübergänge der Analyten in GC-MS. ....	26
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Zellen der toxikologischen Untersuchungen.....	27
Tabelle 6: Grad der Cytotoxizität laut DIN EN ISO 10993-5.....	30
Tabelle 7: Benötigte Lösungen zur Durchführung des Alkaline Comet Assay. ....	31
Tabelle 8: Statistische Angaben des Mann-Whitney Testes. ....	32
Tabelle 9: Pipettierschema der Exposition der Bakterienstämme. ....	33
Tabelle 10: Zusammenfassung der Konzentrationsbereiche im Ablauf von kommunalen Kläranlagen und Vorkommen der Substanzen in Oberflächengewässern [33, 66-68, 98-171]. .....	35
Tabelle 11: Effekte von 10 % Reinstwasser im Expositionsmedium. ....	36
Tabelle 12: Toxizität verschiedener Methanolkonzentrationen im MTT Test und Alkaline Comet Assay.....	37
Tabelle 13: Östrogenität (pM ER Calux EEQ) von 0,1 mg/L Bisphenol A in Reinstwasser vor und nach der Ozonierung. n.n. = keine Östrogenität nachgewiesen. ....	45
Tabelle 14: Ergebnisse des Ames Tests mit 1,4 µg/L Ciprofloxacin in Reinstwasser vor und nach der UV Oxidation. Dargestellt ist der Mittelwert der positiven Wells. ....	53
Tabelle 15: Ergebnisse der Cytotoxizitäts- und Östrogenitätsmessung von 0,015 g/L Ethinylestradiol in Reinstwasser vor und nach der Ozonierung oder UV Oxidation.....	57
Tabelle 16: Strukturformeln von HHCB und dem Oxidationsnebenprodukt HHCB-Lacton. ....	59
Tabelle 17: Summenformeln von Transformationsprodukten von Ofloxacin, deren Masse mittels TOF-Messungen genau ermittelt werden konnte.....	70
Tabelle 18: Elementzusammensetzung von vier identifizierten Oxidationsnebenprodukten von Terbutryn. ....	84
Tabelle 19: Strukturformeln von AHTN und Oxidationsprodukten.....	89
Tabelle 20: GC-MS Ergebnisse für die Identifikation der Transformationsprodukte. ....	92
Tabelle 21: HPLC-MS/MS Ergebnisse für die Identifikation der Transformationsprodukte. ....	94

Tabelle 22: Zeitplan der Arbeitspakete des Forschungsvorhabens.....115

Tabelle 23: Aufstellung der geplanten und durchgeführten Arbeitsschritte.....116

Tabelle 24: Umgesetzte Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft. ....121

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AHTN	Tonalid
AM	Universitätsklinikum Essen, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin
AOI	Adsorbierbares organisch gebundenes Jod
AOP	Erweiterte Oxidationsverfahren (Advanced Oxidation Processes)
AP	Arbeitspaket
ATS	Amidotrizoesäure
AW	Abwasser (hier: Kläranlagenablauf)
BPA	Bisphenol A
BSB <sub>5</sub>	Biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
c <sub>0</sub>	Ausgangskonzentration
CBZ	Carbamazepin
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary
CI	Chemische Ionisation
CID	collision-induced dissociation
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DA	Dalton
DCFNC	Diclofenac
DEHP	Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUE	Universität Duisburg-Essen
E° <sub>H</sub>	Oxidationspotential
E	Einwohnergleichwert
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE2	17-α-Ethinylestradiol
EEQ	17-β-Estradiol Äquivalent
EI	Elektronenstoßionisation

EMEA	European Medicines Agency
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
ER Calux	chemical activated luciferase gene expression
ERE	Estrogen Responsive Element
ESI	Elektronenspray-Ionisierung
FKS	Fetales Kälberserum
GC	Gaschromatografie
GOW	Gesundheitlicher Orientierungswert
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HHCB	Galaxolide
HPLC	high performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IDA	Information Dependent Acquisition
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
KMU	Klein und mittlere Unternehmen
LC	Flüssigchromatografie
LC <sub>50</sub>	Letale Dosis
LDH	Laktatdehydrogenase
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction)
L.M.P.	Low melting point
LOEC	lowest observed effect concentration
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
MBR	Membran-Bioreaktor
MeOH	Methanol
MKULNV	Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz
MMA III	Monomethylarsen III
MPF	Microwell Platten Format
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl-tert-butylether
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

MW	Molgewicht
n.a.	Nicht auswertbar
n.g.	Nicht getestet
n.n.	Nicht nachgewiesen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Non-essential amino acids
NMR	Kernspinresonanz
O <sub>3</sub>	Ozon
OgewV	Oberflächengewässerverordnung
·OH	Hydroxylradikal
OTM	Olive Tail Moment
PA	Projektbegleitender Ausschuss
PAK	Pulveraktivkohle
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEC	predicted environmental concentration
PNEC	predicted no effect concentration
PTV	programmable temperature vaporizer
RKM	Röntgenkontrastmittel
RT	Retentionszeit
RW	Reinstwasser
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Selected Ion Mode
SMX	Sulfamethoxazol
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SRB	Sulforhodamin B
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBEP	Tris-(2-butoxyethyl)-phosphat
TCEP	Tris-(2-chlorethyl)phosphat
T CPP	Tris-(1-chloro-2-propyl)-phosphat
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TOC	Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (Total organic carbon)
TOF	Time of flight
TPP	Triphenylphosphat

UBA	Umweltbundesamt
UDE	Universität Duisburg-Essen
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]- 2H-tetrazolium

## 1 Zusammenfassung

Die Ziele des Vorhabens waren die chemische und toxikologische Validierung und Bewertung oxidativer Abwasserbehandlungs-Verfahren zur Eliminierung von Mikroverunreinigungen aus Kläranlagenabläufen. Neben der Untersuchung von 16 ausgewählten Spurenstoffen erfolgte zu zehn weiteren Arzneimittelwirkstoffen eine projektbegleitende Literaturlauswertung zur Bildung und Toxizität von Transformationsprodukten.

Der Schwerpunkt des Forschungsvorhabens lag auf der toxikologischen Untersuchung von oxidativ behandelten realen Kläranlagenabläufen. So wurden im Rahmen des IGF-Projektes zunächst neue toxikologische Testverfahren für die sichere und robuste Anwendung in Kläranlagen etabliert. Die zellbasierten Tests konnten nach Festphasenextraktion und HPLC-Fraktionierung mit einer maximalen Methanol-Konzentration von 10 % ohne Störungen durchgeführt werden. Bei der UV-Oxidation entstehende Peroxide mussten zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen mit Katalase zerstört werden. Mikrobielle Kontaminationen werden durch Sterilfiltration der Realproben verhindert. Die Anwendung von MTT Test, Alkaline Comet Assay und ER Calux zur Untersuchung der Cytotoxizität, Genotoxizität und Östrogenität von Kläranlagenabläufen ist somit sicher und robust möglich. Zur Bestimmung der Mutagenität mittels Ames MPFTM 98/100 Aqua waren keine Anpassungen notwendig.

In den Technikumsversuchen mit realen Abwässern unterschiedlicher Kläranlagenabläufe konnte die Arbeitshypothese bestätigt werden, dass die untersuchten AOP-Verfahrensvarianten ( $O_3$ , UV und UV/ $H_2O_2$ ) ohne die Bildung von toxikologisch relevanten Transformationsprodukten zur Spurenstoffelimination eingesetzt werden können. In der Literatur beschriebene toxische Effekte beziehen sich in der Regel auf nicht umweltrelevante, hohe Konzentrationen der untersuchten Substanzen.

Der Transfer der gewonnenen Erkenntnisse in die Praxis erfolgte über wissenschaftliche Publikationen und Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen. Zusätzlich werden die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen mit wirkstoffspezifischen Informationen zur Bildung von Transformationsprodukten in der DAIOS-online Datenbank als auch über die Internetseiten des IUTA der Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

Das Ziel, durch das Forschungsvorhaben die Leistungsfähigkeit der oxidativen Abwasserbehandlung zu demonstrieren, um die weitere Entwicklung und den Einsatz dieser Technologie zu fördern, wurde vollständig erreicht.

Mit dem Nachweis der sicheren Anwendung oxidativer Verfahren in der Abwassertechnik ist die Grundlage für umfangreiche Investitionen in innovative Abwasserreinigungsverfahren gelegt. Erste großtechnische Umsetzungen zur Ozonung finden derzeit an den Kläranlagen Bad Sassendorf, Schwerte und Duisburg-Vierlinden statt.

## **2 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung**

### **2.1 Anlass des Forschungsantrags und Ausgangssituation**

Durch so genannte erweiterte Oxidationsverfahren (advanced oxidation processes, AOP), wie z. B. Ozonung oder UV-Oxidation mit und ohne Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) lassen sich viele organische Mikroverunreinigungen aus Kläranlagenabläufen und anderen Abwässern entfernen [1-12]. Die Bewertung dieser oxidativen Verfahren kann anhand substanzspezifischer Analytik, oder über Summenparameter, wie z. B. den biologischen Sauerstoffbedarf in 5 Tagen ( $BSB_5$ ), den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) oder den Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (total organic carbon, TOC) vorgenommen werden. Eine Bewertung anhand toxikologischer Parameter, oder die Kombination aus chemischen und toxikologischen Analysen wurden bisher so gut wie nie durchgeführt.

Eine Betrachtung anhand substanzspezifischer Analytik ist bis heute nur anhand weniger typischer Abwasserinhaltsstoffe geschehen. Es ist jedoch nur unzureichend bekannt und erforscht, was mit diesen Substanzen bei der oxidativen Behandlung geschieht. Bei bisherigen Untersuchungen wurden ausschließlich limitierte Mengen an Oxidationsmitteln (z. B. 5 - 15 mg Ozon pro Kubikmeter Wasser [13, 14]) eingesetzt. Da aber nicht der gesamte TOC abgebaut wird, ist davon auszugehen, dass Transformationsprodukte gebildet werden. Über die auf diese Weise entstehenden Oxidationsnebenprodukte ist derzeit wenig bekannt. Dies gilt insbesondere für die toxikologischen Eigenschaften der möglicherweise stabilen Zwischenstufen.

Erhöhte Konzentrationen der Ausgangssubstanzen und der gebildeten Transformationsprodukte stehen möglicherweise im Widerspruch zu Grenzwerten und zu Verordnungen, die den „guten biologischen und chemischen Zustand des Gewässers“ gemäß EU Wasserrahmenrichtlinie (WRRL [15]) vorschreiben. Auch die weitere Nutzung als Trinkwasser oder Badegewässer macht eine zusätzliche Abwasserbehandlung notwendig.

Nachfolgend werden beispielhaft für einige im Rahmen dieses Projektes untersuchten Substanzgruppen Verletzungen von dezidierten Verordnungen und Gesetzen mit Grenzwerten aufgeführt.

Viele Stoffe, sowohl die 33 prioritären Stoffe laut Anhang X der WRRL, als auch weitere noch nicht abschließend bewertete Substanzen, können im Ablauf von Kläranlagen nachgewiesen werden [15, 16]. Substanzen bei denen ein PEC/PNEC (predicted environmental concentration/predicted no effect concentration) Verhältnis von 1 auftritt, oder bei denen sogar Effekte in Größenordnungen auftreten, wie sie in Oberflächengewässern nachweisbar sind, würden Handlungsbedarf auslösen. Die Vielfalt der Substanzen, die hier eine Rolle spielen, ist allerdings so hoch, dass bisher kein einheitliches Verfahren vorgeschlagen werden konnte, welches in der Lage wäre alle Substanzen abzubauen. Am nächsten kommen diesem Anspruch sicherlich die erweiterten Oxidationsprozesse.

Moschusduftstoffe: Diese Substanzen werden durch die Verbraucher eingetragen, da sie in einer Reihe Parfums, Shampoos, Waschmittel etc. enthalten sind. Derzeit stehen bei der Diskussion die beiden polyzyklischen Moschusduftstoffe HHCB (Galaxolid) und AHTN (Tonalid) im Vordergrund. Die nitroaromatischen Verbindungen (Moschus-Xylol und Moschus-Keton) treten dabei in Deutschland deutlich zurück, da der Einsatz der Nitroaromaten der freiwilligen Selbstbeschränkung unterliegt und stark rückläufig ist. Beide Substanzen (HHCB und AHTN), insbesondere aber HHCB zeigen hormonelle (östrogene) Aktivität. Für HHCB verdichten sich in den letzten Jahren Hinweise, dass einige Fischarten Auslöseschwellen aufzeigen, die in Bereichen liegen, die auch in urbanen Gewässern auftreten [17-19]. HHCB und AHTN werden in konventionellen Kläranlagen durch Sorption an Schlamm eliminiert, während die Transformation bei den realisierten Verweilzeiten eher weniger bedeutend ist [20, 21]. Einmal ins Gewässer gelangt, scheinen diese Verbindungen sehr stabil zu sein und in den Gewässern nicht weiter abgebaut zu werden [22, 23].

Triclosan wird als Desinfektionsmittel in Haushalten insbesondere in Zahnpasta, Mundwasser, in Funktionskleidung (Sport-Unterwäsche und Schuhen) und in der Lebensmittelhygiene eingesetzt [24]. Es gelangt somit in größeren Mengen in das Abwasser. Die Eliminierung in Kläranlagen ist i. d. R. recht gut (85-95 %) [25-27]. Auf der anderen Seite hat sich gezeigt, dass Phytoplankton sehr empfindlich auf diese Substanz reagiert. In urbanen Gewässern hat sich entsprechend gezeigt, dass die Konzentrationen in der Nähe der Wirkschwelle liegen [26, 28]. Bei Photooxidations-Versuchen im Labor wurde über das Auftreten von Chlorphenolen, chlorierten Chinonen und -dioxinen berichtet [29, 30]. Zudem wird bei der konventionellen Abwasserbehandlung mit aerober und anaerober Behandlung mit Belebtschlamm eine weitere Substanz, Triclosan-Methyl, gebildet, welche in hohem Maße bioakkumulierend ist [31, 32]. Darüber hinaus werden ebenfalls Oxidationsprozesse von Triclosan mithilfe von Manganoxiden beobachtet [33]. In natürlichen Gewässern scheinen dort, wo die Gewässer sehr stark belastet sind (z. B. wenn das Gewässer komplett

aus dem Ablauf einer weniger gut funktionierenden Kläranlage stammt [34, 35]), oder aber Verweilzeiten von mehreren Jahren im Gewässer relevant sind [36], Eliminierungsprozesse stattzufinden. Die „Normalsituation“ in Deutschland zeigt aber, dass trotz Eliminierungsraten von ca. 95 % bei Triclosankonzentrationen von weniger als 100 ng/L keine weitere Eliminierung stattfindet [26]. Dieser Konzentrationsbereich wird durchaus in urbanisierten Gewässern gefunden.

Organophosphate werden als Weichmacher, Flammschutzmittel und als Hydrauliköle eingesetzt. Die Einträge in Kläranlagenzuläufe sind erheblich [21, 37]. Je nach Substanz und Kläranlage schwanken die Eliminationsraten in Belebtschlamm-Kläranlagen zwischen 0 % bis zu 80 %. Im Fall geringen Abbaus führt dies zu gesundheitsrelevanten Konzentrationen in verschiedenen Oberflächengewässern. Dementsprechend erfolgen Beanstandungen nach Richtlinie 76/464/EWG [15] oder durch das Umweltbundesamt (UBA) [16].

Hormone werden derzeit in einer Reihe von Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern detektiert [38-42]. Sie stammen aus den normalen Ausscheidungsprozessen von Menschen. Die Anwesenheit von östrogenen Hormonen wurde ebenso wie die Anwesenheit von hormonwirksamen synthetischen Substanzen insbesondere in englischen Flüssen in Zusammenhang mit den erheblichen Verweiblichungsraten von männlichen Fischen gebracht [43-47]. Dies gilt trotz der niedrigen Konzentrationen in Ablaufwasser und in Oberflächengewässern, die in der Regel zwischen 1 und 10 ng/L für Ablaufwasser und um 1 ng/L für Oberflächenwasser liegen. Höhere Werte in der Literatur sind vermutlich eher auf unzureichende Analysemethoden denn tatsächlich auf höhere Werte zurückzuführen [23]. Diese niedrigen Konzentrationen sind dennoch ein Problem, da die Auslöseschwelle für diese Effekte unter 1 ng/L liegt. Erste Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die östrogene Wirkung der Hormone durch Oxidationen sehr schnell verschwindet [48].

Pharmaka treten bis zu einigen µg/L im kommunalen Abwasser auf [37, 48-50]. Viele Arzneimittel lassen sich in den derzeitigen kommunalen Kläranlagen fast überhaupt nicht eliminieren, da sie in der Regel sehr polar sind und von den Mikroorganismen in diesen Konzentrationen auch kaum abgebaut werden können. Dies führt zu erhöhten Konzentrationen in den Oberflächengewässern [23, 48], wobei das Abwasser in den Industrieländern ungefähr 1 / 10 verdünnt wird. Für den Abbau dieser Substanzen in den Oberflächengewässern haben sich bisher wenige Hinweise gefunden [23, 48, 50]. Als Hauptproblemsubstanzen haben sich in der Vergangenheit folgende Substanzen herauskristallisiert: Makrolid-Antibiotika (Erythromycin, Roxithromycin), Sulfonamide

(Sulfamethoxazol), Rheumamittel (Ibuprofen, Diclofenac), Antiepileptika (Carbamazepin), Fluorchinolone (Ciprofloxacin) und die toxikologisch allerdings unbedenklichen Röntgenkontrastmittel.

Während die hierbei benannten Probleme bei anderen Substanzen durch Veränderungen in den betreffenden Industriezweigen als prinzipiell lösbar erscheinen, sind für das Erreichen des von der EMEA angedachten Schutzziels von 1 ng/L Pharmazeutika in Oberflächengewässern keine anderen als oxidative Verfahren in den kommunalen Kläranlagen denkbar [51]. Die Gefahrenabschätzung von Arzneimittelwirkstoffen wird erschwert durch die zahlreichen Metabolite, die im Körper selbst oder bei der biologischen Abwasserbehandlung in Kläranlagen, entstehen. Dies verstärkt zusätzlich das Problem der sogenannten „Cocktail Effekte“: die Lebewesen in der Umwelt sind verschiedensten Arzneimittelwirkstoffen und Chemikalien ausgesetzt deren Wirkungen sich addieren, sofern sie denselben Wirkmechanismus aufweisen. In wie weit bei der oxidativen Behandlung entstehende Transformationsprodukte hierzu auch einen Beitrag leisten, war zu Beginn dieses Forschungsvorhabens unbekannt.

Hinzu kommt die Beobachtung, dass durch den hohen Verbrauch von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin und dem damit verbundenen Eintrag in die Umwelt vermehrt Antibiotikaresistenzen auftreten. So wurden z. B. schon in Klärschlamm humanpathogene multiresistente Stämme gefunden, die auch durch Abwasser weitergetragen wurden.

Verbindliche Grenzwerte in Oberflächen- und Grundwasser gibt es derzeit nur für wenige Arzneimittelwirkstoffe. Im März 2011 wurde eine neue Oberflächengewässerverordnung verabschiedet, die erstmals bundeseinheitliche Anforderungen zum Schutz von Oberflächengewässern festlegt [52]. Die Oberflächengewässerverordnung (OgewV) dient der bundeseinheitlichen Umsetzung der EU-Richtlinie über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik sowie der bisherigen Länderregelungen zur Umsetzung der Anhänge II, III und V der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) [53].

So beinhaltet die Oberflächengewässerverordnung beispielsweise Grenzwerte für das Antiepileptikum Carbamazepin (0,5 µg/L) und das Antibiotikum Sulfamethoxazol (0,1 µg/L). Auch Diclofenac wird in Deutschland als ubiquitärer vorkommender, umweltrelevanter Schadstoff betrachtet. Dennoch wurde in die Oberflächengewässerverordnung kein Grenzwert aufgenommen, da dieser Stoff derzeit als prioritärer Stoff auf EU-Ebene mit einem Grenzwert von 0,01-0,1 µg/L diskutiert wird, was seine Relevanz als Schadstoff besonders

hervorhebt. Es wird davon ausgegangen, dass bis Ende 2012 entsprechende Regelungen zu diesen Stoffen erlassen werden.

Für neu auftretende Spurenstoffe, zu denen auch Oxidationsnebenprodukten gezählt werden müssen, kann der vom Umweltbundesamt entwickelte GOW – Wert von 0,1 µg/L für „schwach bis wenig genotoxische oder noch nicht bewertete Stoffe in Abwesenheit weiterer experimenteller Daten“ herangezogen werden [54, 55].

## 2.2 Stand der Forschung und Technik

### 2.2.1 Einleitung

Bei der kommunalen Abwasserbehandlung sind Belebtschlammanlagen Stand der Technik. Diese sind darauf ausgelegt, die organische Fracht im Wasser ( $BSB_5$  bzw. TOC) zu eliminieren. Hinzu gekommen sind in den letzten Jahrzehnten die Stickstoffeliminierung (Nitrifikation/Denitrifikation) und im letzten Jahrzehnt die Phosphorfällung, so dass die Elimination dieser Parameter derzeit als weitgehend gut gelöst gilt [56, 57].

Nicht abschließend gelöst ist hingegen die Entfernung von organischen Mikroverunreinigungen aus dem Wasserkreislauf. Ein erheblicher Teil dieser Substanzen wird in der kommunalen Abwasserbehandlung nicht vollständig eliminiert und gelangt über die Vorfluter in Oberflächengewässer. Hierdurch kann es zu Verletzungen der Qualitätskriterien für Oberflächengewässer [53] sowie ggf. zu Problemen bei der Trinkwasseraufarbeitung (aus Oberflächengewässern) kommen. Derzeit wird von Wissenschaftlern und Behörden intensiv diskutiert, mit welchen Mitteln diese Probleme gelöst bzw. vermieden werden können [58].

Im Rahmen der EU-Forschungsvorhaben POSEIDON, REMPHARMAWATER und P-THREE wurden verschiedene Technologien zur Entfernung von Arzneistoffen in Kläranlagen und Wasserwerken untersucht [59-62]. Dabei zeigte sich, dass Membranverfahren zur Eliminierung von Mikroverunreinigungen in Kläranlagenabläufen kaum geeignet sind [60]. Mit Membran-Bioreaktoren (MBR) kann die Abbauleistung für einige Substanzen u. a. durch Erhöhung des Schlammalters um 10 bis 20 % verbessert werden [48]. Biologisch schwer abbaubare Substanzen können allerdings mit der eingesetzten Mikro- und Ultrafiltration nicht zurückgehalten werden. Erst durch Nanofiltration oder Umkehrosiose ist es möglich, diese Spurenstoffe zurückzuhalten. Am Beispiel von stark verschmutztem Oberflächenwasser zur Trinkwasseraufbereitung in Krisengebieten konnten Heberer et al. zeigen, dass mit einer mobilen Abwasseraufbereitungsanlage (Vorfiltration, Umkehrosiose, nachgeschaltete UV-Desinfektion und Chlorierung) Membranverfahren als Bestandteil eines Anlagenkonzeptes eingesetzt werden können [63, 64]. Unter Berücksichtigung der Investitions- und Betriebskosten sind Membranverfahren zur Eliminierung von Mikroverunreinigungen in kommunalen Kläranlagen jedoch derzeit wirtschaftlich nicht einsetzbar.

An ausgewählten Substanzen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung des Kläranlagenablaufs und des Trinkwassers durch Ozonisierung zu adäquaten Kosten möglich ist [65]. Mögliche Abbauege wurden exemplarisch am Beispiel von Carbamazepin [66, 67]

und Ethinylestradiol (EE2) [68] in deionisiertem Wasser untersucht. Die Bildung von Oxidationsnebenprodukten und deren Toxizität wurde dabei nicht betrachtet. Huber et al. [68] konnten am Beispiel von EE2 zeigen, dass durch die Ozonisierung die Östrogenität abgebaut werden kann.

Die Oxidation mit Ozon oder UV-Licht bieten sich als kostengünstige Option zur Eliminierung von Schadstoffen an. Derzeit werden diese Verfahren ausschließlich bei der industriellen Abwasserbehandlung zur Lösung von Spezialproblemen [69-75] oder zur Desinfektion an Orten eingesetzt, an denen gereinigtes Abwasser in Badegewässer eingeleitet wird, um einen einwandfreien hygienischen Zustand der Badegewässer zu gewährleisten [76-78].

Die Effektivität dieser AOP-Verfahren wurde u. a. auch in eigenen Arbeiten demonstriert [79-82]. Ein kritischer Diskussionspunkt, der den Einsatz solcher Anlagen zurzeit verhindert, ist die Frage nach der Bildung von toxischen Oxidationsnebenprodukten oder der Freisetzung von toxischen Verbindungen wie z. B. Kupfer [83] oder Bromat [84]. Insbesondere Grummt et al. konnten in ersten Untersuchungen von aromatischen Aminen, Nitro- und Azo-Verbindungen zeigen, dass nach der oxidativen Abwasserbehandlung mittels Ames-Test toxische Nebenprodukte gebildet werden können [85]. Eine weitergehende Charakterisierung und Bewertung dieser unbekanntenen Oxidationsprodukte erfolgte allerdings nicht [86]. Kann im Rahmen dieses FuE-Vorhabens der Nachweis erbracht werden, dass AOP-Verfahren ohne Bildung von toxischen Oxidations(neben)produkten eingesetzt werden können, so ist damit die Grundlage für umfangreiche Investitionen in innovative Abwasserbehandlungsverfahren gelegt.

## 2.2.2 Erweiterte Oxidationsverfahren (Advanced Oxidation Processes – AOP)

Als erweiterte Oxidationsverfahren werden Prozesse bezeichnet, bei denen der oxidative Abbau von Substanzen durch Hydroxylradikale erfolgt [87]. Die Oxidation sowohl mit Ozon als auch mit UV-Licht mit und ohne Wasserstoffperoxid führt zu chemischen Umwandlungen. Im Idealfall werden die organischen Substanzen zu Kohlendioxid und Wasser mineralisiert. Aus wirtschaftlichen Gründen erfolgt bei der Wasseraufbereitung häufig nur eine Teiloxidation, so dass andere, niedermolekulare Produkte beobachtet werden.

In bisherigen Forschungsprojekten zur Eliminierung von Mikroverunreinigungen wurden vor allem oxidative Verfahren in Verbindung mit einer entsprechenden Vorbehandlung untersucht. Überwiegend werden dabei die sogenannten advanced oxidation processes (AOP) [10, 13, 14, 50, 65, 69, 70, 72, 88, 89] eingesetzt. Wie in Abbildung 1 dargestellt, erfolgt die Oxidation im Wesentlichen über die entstehenden Hydroxylradikale, welche unter den in der Abwasserbehandlung üblicherweise eingesetzten Oxidationsmitteln das größte Oxidationspotenzial ( $E_{\text{H}}^0(\cdot\text{OH}) = 2,81 \text{ V}$ ) besitzen.

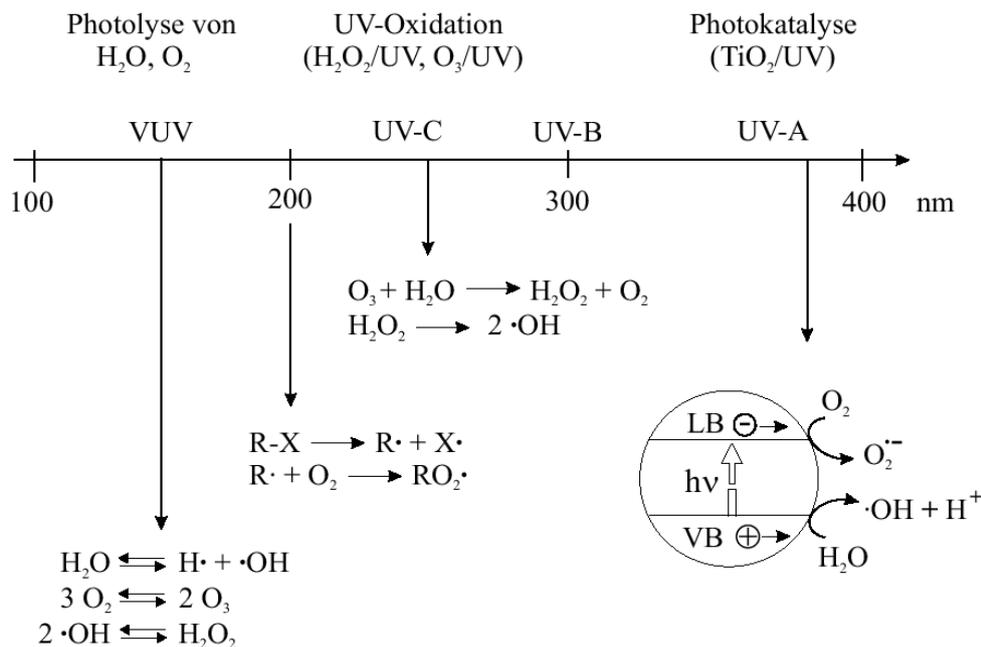


Abbildung 1: Wellenlängenbereiche und zu Grunde liegende Photoreaktionen der AOP mit Licht [74].

Der eigentliche Abbaumechanismus besteht aus komplexen Folgereaktionen und ist stark systemspezifisch. Im Detail sind diese Vorgänge insbesondere für Multikomponentensysteme, wie sie reale Abwassermatrizes üblicherweise darstellen, bisher kaum untersucht und nicht vollständig prognostizierbar. Nachteilig bei diesen Verfahren ist, dass Hydroxylradikale naturgemäß sehr reaktiv sind und unerwünscht mit anderen Bestandteilen der Wassermatrix, so genannten Scavengern, wie z. B. Carbonationen reagieren. Durch diese Konkurrenzreaktionen kann die Effizienz der Abbauvorgänge erheblich verringert werden [4, 90, 91]. Eigene Untersuchungen in Toiletten- und Industrieabwässern haben allerdings gezeigt, dass dieses Problem durch einen etwas höheren Oxidationsmitteleinsatz sehr gut gelöst werden kann [79, 80].

Die direkte Photolyse z. B. mit Vakuum-UV-Lampen spielt in der Wasseraufbereitung aufgrund des zu hohen Energiebedarfs bisher ebenso keine Rolle wie photokatalytische Prozesse mit  $\text{TiO}_2$ , die eine zu geringe Quantenausbeute sowie Schwierigkeiten beim Design eines effektiven und robusten Reaktors aufweisen.

Eine weitere AOP-Variante stellen Oxidationsprozesse mit Fenton's Reagenz dar. Die Erzeugung von OH-Radikalen beruht hier auf der Reaktion von Eisen(II)-Ionen (Katalysator) mit Wasserstoffperoxid. Dieses Verfahren wurde unter anderem bei der Behandlung von Deponiesickerwässern, CKW-belasteten Abwässern, Kühlschmiermittelabwässern und gefärbten Abwässern der Textilindustrie eingesetzt. Wie bei  $\text{TiO}_2$ -Systemen, ist die kompakte Bauweise bei Fenton-Reaktionen nur schwierig zu realisieren. Neben einem mehrstufigen Reaktionsaufbau muss entweder eine Katalysatorrückführung realisiert oder der anfallende Eisen(III)hydroxid-Schlamm aufwändig entsorgt werden. Zusammen mit der zusätzlich notwendigen Einstellung niedriger pH-Werte [92] stellt dies für die kommunale Abwasserbehandlung große Nachteile dar.

Aus diesen Gründen sollen in dem hier beantragten Forschungsvorhaben nur AOP-Verfahren betrachtet werden, die in den heutigen Klärprozess einfach zu integrieren sind und den Anforderungen von Suty et al. [93] entsprechen, dass ein effektiver Schadstoffabbau bei möglichst neutralen Bedingungen ohne zusätzliche Schlammproduktion erfolgen soll. Neben den klassischen AOP-Verfahren ( $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{UV}/\text{O}_3$  sowie  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ ) kann dieses Ziel auch mit der Ozonisierung erreicht werden. Beim Einsatz höherer Ozondosen ist neben der Desinfektion der Abbau von organischen Mikroverunreinigungen möglich. Im Gegensatz zur unspezifischen Reaktion der Hydroxylradikale bei AOP-Verfahren reagiert Ozon spezifisch an Doppelbindungen und aromatischen Ringen der Targetmoleküle. Dabei spielen

insbesondere drei Reaktionsarten eine Rolle: Elektronentransferreaktionen, Übertragung eines Sauerstoffatoms sowie die Addition des O<sub>3</sub>-Moleküls an das Substrat [2, 94].

Aufgrund der bekannten Struktur lassen sich generelle Regeln dazu ableiten, an welcher Stelle die Substanzen am wahrscheinlichsten oxidiert werden. Z. B. lassen sich aktivierte Doppelbindungen sehr gut oxidieren und zunächst wird i. d. R. eine Hydroxy-Funktion in das Molekül eingeführt. Anschließend werden häufig an dieser Stelle die C-C Bindungen geöffnet.

### 2.2.3 Toxikologische Testsysteme zur Bewertung von AOP-Verfahren

In Verbindung mit den chemischen Analysen erlauben die Ergebnisse der toxikologischen Tests nicht nur Aufschlüsse über das Vorhandensein, strukturelle Veränderungen und die Konzentration einer Substanz im Kläranlagenablauf, sondern sie ermöglichen auch die Einschätzung der Risiken für das Ökosystem und folglich auch den Menschen. Neben einer Einschätzung des generellen Risikos kann durch die toxikologische Analyse auch die Art der Wirkung näher beschrieben werden. Obwohl es seit langem bekannt ist, dass Pharmazeutika, Personal Care Produkte und andere Chemikalien mit ansteigenden Konzentrationen in Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern nachgewiesen werden, sind Informationen über deren biologische Wirkungen insbesondere im Zusammenhang mit der Bildung von Oxidationsnebenprodukten während der oxidativen Abwasserbehandlung nur unzureichend vorhanden. In diesem Projekt wurden daher vier verschiedene Testsysteme gewählt, um unterschiedliche Endpunkte toxischer Effekte zu untersuchen. Im Folgenden sind die eingesetzten toxikologischen Testsysteme erläutert:

#### 2.2.3.1 Cytotoxizität

Die generelle zellschädigende Wirkung wurde an Hand des MTT Tests oder des PAN I Tests untersucht. Der MTT Test basiert auf der Umwandlung eines löslichen Tetrazoliumsalses (MTT= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein unlösliches Formazan. Dieser Test erlaubt eine direkte Korrelation zwischen der umgesetzten Menge des Farbstoffes und der Anzahl vitaler Zellen, da nur diese in der Lage sind, Formazan zu bilden. Das Prinzip des PAN I Tests basiert auf der gleichen Grundlage wie der MTT Test. Allerdings erlaubt der PAN I Test die gleichzeitige Bestimmung von vier verschiedenen cytotoxischen Endpunkten an nur einer Zellkultur. Die Methode umfasst den XTT Test, bei dem ebenso wie beim MTT Test, ein Tetrazoliumsals, in diesem Fall das 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide in ein unlösliches Formazan umgewandelt wird. Ein weiterer Test ist der Neutral Rot Test. Nur vitale Zellen sind in der Lage, Neutral Rot aufzunehmen und es in ihren Lysosomen zu binden. D.h., die Menge an gebundenem Neutral Rot ist damit direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Der dritte in dieser Multiparameter Methode durchgeführte Test ist der SRB Test. Dieser Test erlaubt es, die Zellproliferation anhand des Gesamtproteingehaltes nachzuweisen. Auch hier kann wieder eine direkte Korrelation zwischen gebildeten Proteinen und Zellzahl durchgeführt werden. Als weiterer Test wird hier

noch der LDHe Test durchgeführt. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, und gelangt nur durch eine beschädigte Zellmembran in das Medium. Je mehr LDH extrazellulär nachgewiesen wird, desto größer ist die Membranschädigung.

### 2.2.3.2 *Gentoxizität*

Ein weiterer toxikologischer Endpunkt, der in diesem Projekt untersucht wurde ist die Gentoxizität. Die Gentoxizität beschreibt allgemein reversible oder irreversible DNA Schäden. Der Alkaline Comet Assay wurde daher hier eingesetzt um ein mögliches DNA schädigendes Potenzial nachzuweisen. Dieser Test wurde von Ostling und Johansson [95] entwickelt, um Doppelstrangbrüche nachzuweisen, und später von Singh et al. [96] weiterentwickelt, um parallel auch Einzelstrangbrüche nachweisen zu können. Das Prinzip basiert darauf, dass Zellen nach der Exposition in ein Agarosegel eingebettet und lysiert werden und unter alkalischen Bedingungen eine Elektrophorese durchgeführt wird. Durch das Starten eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol. Liegt die DNA unbeschädigt vor, wandert sie als Ganzes Richtung Pluspol. Ist sie allerdings geschädigt und liegt in Bruchstücken vor, wandern diese ihrer Größe entsprechend unterschiedlich weit im Gel, wodurch es zur Bildung des „Comets“ kommt. Je größer die DNA Schädigung, desto größer der Comet.

### 2.2.3.3 *Mutagenität*

Liegt eine irreversible DNA Schädigung vor, kommt es zu Mutationen und somit zu vererbaren Schäden. Um ein mögliches mutagenes Potenzial einer Substanz nachzuweisen, wurde der Ames MPF 98/100 Aqua Test gewählt. Dieser Test wird an den Salmonella typhimurium Stämmen TA98 und TA100, die bereits Mutationen enthalten durchgeführt. Diese Stämme sind nicht in der Lage selbst Histidin zu synthetisieren. Wirkt die zu testende Substanz mutagen, kommt es zu einer Rückmutation, die über einen Farbumschlag im Medium nachgewiesen werden kann, da die Bakterien wieder selbst Histidin produzieren können und so auch in Histidin freiem Medium wachsen.

#### 2.2.3.4 Östrogenität

Der ER Calux wurde durchgeführt, um eine mögliche östrogene Aktivität von Chemikalien und Substanzen nachzuweisen. CALUX steht hierbei für **C**hemical **A**ctivated **L**uciferase gene e**X**pression. Östrogene, wie Estradiol, haben einen Effekt auf die Schilddrüsenfunktion, die Reproduktivität, das Nervensystem und das Herz-Kreislauf-System. Daher können erhöhte Mengen an östrogenähnlichen Hormonen die Gesundheit beeinträchtigen.

Die hier verwendeten T47D Zellen, eine humane Brustkrebszelllinie, sind genetisch so verändert, dass sie konzentrationsabhängig Licht emittieren. Dazu wurde ein Estrogen Responsive Element (ERE) an ein Luciferase Gen gekoppelt. Bindet nun der chemische Reporter an das ERE löst dies die Expression der ERE assoziierten Gene, in diesem Fall der Luciferase, aus. Zum Nachweis werden die Zellen zunächst für 24 h gegen die Proben exponiert. Danach werden die Zellen lysiert und Luciferin wird zugegeben. Wurde von den Zellen Luciferase produziert, reagiert es nun mit dem zugegebenen Luciferin, wobei Energie in Form von Licht abgegeben wird. Die Aktivität der Luciferase kann dann über eine Lumineszenzmessung ermittelt werden und korreliert mit der Menge an östrogenaktiven Substanzen in der Probe.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Experimentelles

##### 3.1.1 Chemikalien zur Durchführung der AOP Versuche

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 angegeben.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien zur Durchführung der AOP Versuche.**

Produkt	Firma
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Amidotrizoesäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Atenolol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bisphenol A	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland)
Butylmethylether	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
Carbamazepin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Diclofenac	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethinylestradiol	Riedel-de Häen (Seelze, Deutschland)
HPLC-Wasser	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
Galaxolid (HHCB)	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland)
Irgarol 1051	Hempel (Pinneberg, Deutschland)
Katalase (Aspergillus niger)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methyl-tert-butylether (MTBE)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Metoprolol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ofloxacin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Sulfamethoxazol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Terbutryn	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland)
Toluol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tonalid (AHTN)	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland)
Triclosan	Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland)
Triphenylphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris-(2-butoxyethyl)-phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris-(1-chloro-2-propyl)-phosphat	Akzo Nobel (Amersfoort, Niederlande)
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

### 3.1.2 Ozonierungsversuche im Labormaßstab am IUTA

Stammlösungen (1 g/L) wurden in HPLC-Wasser, schwer lösliche Substanzen in 50 % Acetonitril (LGC Promochem, Wesel, Deutschland) angesetzt.

Ozongas wurde mit Hilfe eines Ozomats COM AD-01 (Anseros, Tübingen, Deutschland) und techn. Sauerstoff hergestellt. Das Gas wurde direkt durch gekühltes, destilliertes Wasser geleitet. Die Elimination des Restozons erfolgte über einen Platinkatalysator. Die Konzentration des gelösten Ozons im Wasser wurde photometrisch bei 260 nm unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

Reinstwasser und Kläranlagenablauf wurden mit Einzelsubstanzen bzw. Substanzgemischen in Konzentrationsbereichen von 100 µg/L bis 18 mg/L dotiert. Zudem wurde Kläranlagenablauf ohne Aufdotierung untersucht. Zu den jeweiligen Lösungen wurde für die Ozonierung eine entsprechende Menge Ozonwasser gegeben. Nach Ablauf der Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Proben filtriert (Chromafil RC 0,45 µm, Machery-Nagel, Düren, Deutschland) und in HPLC-MS-Vials überführt oder mittels Festphasenextraktion weiter aufbereitet (siehe Kapitel 4.2.1).

### 3.1.3 Ozonierungsversuche im Labormaßstab an der Universität Duisburg-Essen

Alle separaten Lösungen hatten Ausgangskonzentrationen von 0,1 bis 400 mg/L und wurden in HPLC-Wasser bzw. Kläranlagenablauf gelöst und anschließend ozoniert. Es wurde rückstandsfreies Methanol, Toluol, Aceton und Methyl-tert-butylether (MTBE) verwendet. Proben mit unterschiedlichen Molverhältnissen (zwischen 1:1 und 1:10) Substanz:O<sub>3</sub> wurden durch das Mischen von O<sub>3</sub> und Substanzlösungen, in unterschiedlichen Volumenverhältnissen, hergestellt. Die Ozonierung wurde mit Hilfe eines Ozogenerators (Enaly 1000BT-12, Enaly M&E Ltd, Shanghai, China) und techn. Sauerstoff bei 0,5 L/min durchgeführt, was einer dauerhaften Ozoneinleitung von 2-5 mg/L entspricht. Überprüft wurde dies durch eine UV-VIS Spektralphotometrie (Shimadzu, Duisburg, Germany). Die Probenentnahmen (je 20 mL) erfolgten in zeitabhängigen Intervallen über 120 min. Zur Probenvorbereitung wurde nach Ablauf der Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur eine Festphasenextraktion durchgeführt (Kapitel 4.2.2).

### 3.1.4 Ozonierungsversuche im Pilotmaßstab

Experimente im 200 L Maßstab wurden in einer Pilotanlage (OCS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-UV, Wedeco, Herford, Deutschland) am IUTA durchgeführt, die mit einem Ozongenerator OCS-GSO 20 (Wedeco, Herford, Deutschland) und einer Ozonüberwachungseinheit (DH 5, BMT Messtechnik, Berlin, Deutschland) ausgestattet ist. Die Versuchstemperatur wurde mittels eines Kühlers (SK3334,600, Rattle, Herborn, Deutschland) konstant bei 20 °C gehalten. Der Ozongenerator wurde so eingestellt, dass kontinuierlich 80 bis 90 g/m<sup>3</sup> gasförmiges Ozon mit einem Luftvolumenstrom von 0,5 m<sup>3</sup>/h in den Reaktor eingeleitet wurden. Die Konzentrationsbereiche der Analyten wurden aus dem Labormaßstab übernommen. Vor Versuchsbeginn wurde die Anlage mit dem zu untersuchenden Wasser durchgespült. Die Proben konnten vor dem Ozoneinlass zeitabhängig entnommen werden. Vor der Messung mittels HPLC-MS wurden auch diese Proben filtriert.

### 3.1.5 UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Labormaßstab

Untersuchungen zum photooxidativen Abbau mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid fanden an einer 1 L-Laboranlage statt, in die eine Heraeus TNN15/32 254 nm Hg Niederdrucklampe (3 W Strahlungsfluss, Heraeus, Hanau, Deutschland) angebracht war. Um gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten wurden alle Versuche bei 30 °C mittels eines Lauda-Thermostats (Lauda-Königshofen, Deutschland) und einer Schlauchpumpe (Multifix constant M 838, Alfred Schwinherr KG, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland) konstant gehalten. Der Anlagenaufbau ist in Abbildung 2 dargestellt.

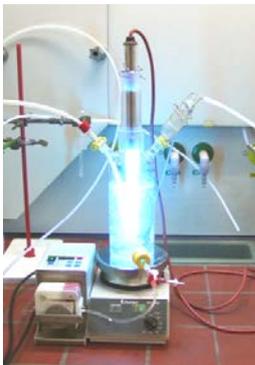


Abbildung 2: Aufbau der Laboranlage.

Standardlösungen in Reinstwasser, dotierter und undotierter Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$  bis  $18 \text{ mg/L}$ ) wurden vor Versuchsbeginn gleichmäßig in der Anlage verteilt. Die Probenahme erfolgte zeitabhängig an einem Auslasshahn hinter dem Reaktor. Bei Versuchen mit Wasserstoffperoxid wurden nach der fünfminütigen Aufheizphase der Lampe  $0,3 \text{ g/L H}_2\text{O}_2$  zugegeben. Für toxikologische Untersuchungen durften keine Restperoxide in den Proben sein. Um dies zu gewährleisten wurden diese Proben mit einigen Tropfen Katalase versetzt. Nach Versuchsende wurden alle Proben filtriert.

### **3.1.6 UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Versuche mit TPP, TBEP und TCPP**

Jede einzelne Organophosphatlösung wurde in 1 L HPLC-Wasser gelöst und hatte eine Ausgangskonzentration von  $1 \text{ mg/L}$  um anschließend mit einem UV-Strahler und der Zugabe von  $1 \text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{L}$  für 120 min bestrahlt zu werden. Es wurden je 100 mL Probe nach 0, 20, 40, 60 und 120 min entnommen und mit  $100 \mu\text{L}$  Katalase versetzt um eine weitere Reaktion des  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit den Substanzen zu unterbinden. Die weiteren Schritte der Probenvorbereitung, mittels SPE, für das GC-MS-Screening sind identisch mit der, der Ozonierungsversuche (s.o.).

### **3.1.7 UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Pilotmaßstab**

Die oben beschriebene Pilotanlage ist so ausgestattet, dass daran auch die UV und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Versuche durchgeführt werden konnten. Zum einen standen ein Hg Niederdruckstrahler (XLR 10, 33 W Strahlungsfluss, 180 und 254 nm, Wedeco, Herford, Deutschland) und zum anderen ein Hg Mitteldruckstrahler (IBL, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung. Der Aufbau der Anlage ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Aufbau der Pilotanlage.**

Die Versuche wurden analog zu den Ozonierungsversuchen durchgeführt. Die Probenahmestelle befand sich vor dem UV-Strahler. Der Leistungsverlauf der Lampe konnte über ein Kontrollfenster während der Versuche nachvollzogen werden. Bei Versuchen mit  $H_2O_2$  erfolgte die Zugabe von 0,3 g/L Wasserstoffperoxid nach zehnminütiger Aufheizphase der Lampe über ein Ventil direkt in den Versuchsreaktor. Die Proben wurden mit Katalase versetzt. Alle Proben wurden vor der Messung mittels HPLC-MS filtriert.

### 3.1.8 UV- und UV/ $H_2O_2$ -Oxidation in der Durchflussanlage

In der Durchflussanlage IBL uviblox<sup>®</sup> WTP 2x4 (IBL, Heidelberg, Deutschland) (Abbildung 4) sind zwei 4 kW Mitteldruckstrahler (IBL, Heidelberg, Deutschland) in Reihe geschaltet. Vor den Reaktoren besteht die Möglichkeit zur Dosierung von Wasserstoffperoxid über eine Dosierpumpe. Nach den Reaktoren ist zudem eine pH- und eine Redox-Sonde integriert. Zur Überwachung der Temperatur sind im Verlauf der Anlage drei Messfühler angeschlossen. Über einen UV-Monitor können diese Messwerte abgelesen werden.



**Abbildung 4: Aufbau der Durchflussanlage.**

Die Durchführung von Batchversuchen erfolgte am IUTA. Das zu behandelnde Wasser wurde aus einem 1 m<sup>3</sup>-IBC-Container entnommen, durch die Reaktoren geleitet und in denselben Container entlassen. Proben wurden zeitabhängig vor den Strahlern entnommen.

Versuche im Durchflussbetrieb wurden vor Ort auf der Kläranlage Bottrop durchgeführt. Das zu behandelnde Wasser konnte direkt aus der Kläranlage durch die Reaktoren der Lampen geleitet werden. Anschließend wurde das behandelte Wasser in den Ablaufkanal der Kläranlage gepumpt. Vor den Reaktoren konnte über eine Dosierpumpe eine 35%-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zugefügt werden. Die Peroxiddosierung variierte bei Stichprobenversuchen zwischen 0,5 und 20 L/h. Während 24-h-Versuchen wurde konstant 1 L/h zudosiert. Sowohl die Durchflussgeschwindigkeit als auch die Leistung der UV-Strahler variierten ebenfalls (3-12 m<sup>3</sup>/h bzw. 1x0,8-2x4 kW).

### **3.2 Analysenmethoden**

#### **3.2.1 Probenvorbereitung Festphasenextraktion (SPE)**

Zur Analyse werden sowohl Direktmessungen, als auch Messungen von aufkonzentrierten Proben mittels Festphasenextraktion durchgeführt. Die SPE der Proben nach Filtration über Glasfaserfilter (Porengröße 1 µm, Pall Life Sciences, Washington, NY, United States) wurden automatisiert mit einem Gilson-System (Valvemate<sup>®</sup> II, Gilson International B.V., Limburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Extraktion der jeweiligen Substanzen wurden die Kartuschen Strata X (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland), Strata XL

(Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und ENV+ (Biotage, Uppsala, Schweden) verwendet. Die SPE-Methoden sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: SPE-Methoden des Gilson-Systems.**

Methoden	Kartusche	Konditionierung, Equilibrierung	Waschen	Elution
Pharmaka	Strata XL (500 mg/6 mL)	5 mL Methanol, 5 mL pH 3 Wasser	5 mL 95% pH 3 Wasser + 5% Methanol	3 x 3 mL Methanol
RKM	ENV+ (500 mg/6 mL)	5 mL 50% Methanol + 50% ACN		3 x 3 mL Methanol
Bisphenol A	Strata XL (500 mg/6 mL)	5 mL Methanol, 5 mL Wasser		5 x 5 mL tert. Butylmethylether
Organo- phosphate	Strata X (200 mg/6 mL)	6 mL Methanol, 6 mL Wasser		10 mL Aceton, 10 mL MTBE
Triclosan	Strata X (200 mg/6 mL)	6 mL Methanol, 6 mL Wasser		1 mL MTBE
Galaxolid, Tonalide	Strata X (200 mg/6 mL)	4 mL Methanol, 10 mL Wasser		15 mL MTBE
Irgarol 1051, Terbutryn	Strata X (200 mg/6 mL)	6 mL Methanol, 6 mL Wasser		6 mL Methanol

Die Proben wurden vor der Festphasenextraktion mit Salzsäure (Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland) auf pH 3 eingestellt und mit internen Standards versetzt. Die Extrakte wurden unter Stickstoff eingengt. Die Pharmaka wurden in 1 mL Wasser:ACN (50:50) + 0.1% Ameisensäure aufgenommen, die RKM in 4 mmol Ammoniumacetat, pH 4. Vor der HPLC-MS Messung wurden die Proben über einen Spritzenfilter in Autosampler-Vials überführt. Bisphenol A wurde nach Einengung unter Stickstoff in 1 mL Methanol aufgenommen, erneut bis zur Trockene eingedampft und mit 100 µL Bis-(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamid) + 1% Trimethylchlorsilan versetzt, durchmischt und 30 Minuten bei 70 °C derivatisiert. Die Extrakte der Organophosphate sowie Galaxolid und Tonalid wurden für mind. zwei Stunden bei -20 °C eingefroren um Wasserrückstände zu vermeiden. Die Extrakte wurden in Büchigläsern mit Hilfe einer Büchi-Syncore Einheit (Büchi, Flawil, Schweiz) auf ein Volumen von 1 mL eingengt (Organophosphate: 60 °C, 40 mbar, 180 rpm; Galaxolid und Tonalid: 50 °C, 60 mbar). Die eingengten Extrakte der Galaxolid und Tonalid Methode wurden

danach direkt in HPLC-Vials überführt. Für die Organophosphate erfolgte im Anschluss ein Lösungsmittelwechsel auf Toluol. Hierzu wurde das eingeeengte Extrakt zweimal mit 10 mL Toluol versetzt und auf 1 mL eingeeengt und in ein GC-Vial überführt. Die Extrakte der Irgarol 1051 und Terbutryn Methode wurden direkt nach der SPE ohne weitere Aufbereitungsschritte in HPLC-Vials überführt.

### 3.2.2 Probenvorbereitung Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Für die Organophosphate sowie Irgarol 1051 und Terbutryn wurden neben der SPE auch Flüssig-Flüssig-Extraktionen zur Probenvorbereitung durchgeführt. Dabei wurden den jeweiligen entnommenen Proben 2 mL Toluol und 100 µL interner Standard zugegeben und sie wurden auf einem Magnetrührer für 20 min bei 500 rpm gerührt. Anschließend wurden die Proben für mind. zwei Stunden bei -20 °C eingefroren um Wasserrückstände in der Toluolphase zu vermeiden. 1 mL der Toluolphase wurde abpipettiert und in GC-Vials überführt.

### 3.2.3 HPLC-MS/MS

Die Quantifizierung der Analyten erfolgte an einem API 3000 (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) und an einer Q Trap 3200 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus. Für jede Substanz wurden dabei zwei charakteristische Massenübergänge detektiert. Die Massenübergänge der Substanzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Massenübergänge der Analyten in HPLC-MS/MS.**

Verbindung	HPLC-MS Messmethode	Retentions- zeit [min]	Q1 Masse [Da]	Q3 Quantifi- zierung [Da]	Q3 Verifi- zierung [Da]
Carbamazepin	API 3000 Pharmka (pos)	11,60	237	194	192
Metoprolol	API 3000 Pharmaka (pos)	7,40	268	116	77
Sulfamethoxazol	API 3000 Pharmaka (pos)	8,70	254	156	92
Sulfamethoxazol	Q Trap 3200	2,27	254	156	92
Diclofenac	API 3000 Pharmaka (neg)	7,93	294	250	214
Amidotrizoesäure	API 3000 RKM (pos)	2,93	615	361	233
Ethinylestradiol	Q Trap 3200	4,80	297	107	77
Ciprofloxacin	Q Trap 3200	2,31	332	314	288
Ofloxacin	Q Trap 3200	2,17	362	318	261
Irgarol 1501	API 3000 Pharmaka (pos)	2,97	254	198	83
Terbutryn	API 3000 Pharmaka (pos)	2,71	242	186	68

An beiden Messsystemen wurde eine Synergi Polar RP 80 A HPLC Säule (150 x 2 mm, 4 µm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) zur chromatographischen Trennung der

Pharmaka eingesetzt. Die RKM wurden über eine Shimadzu Shim-pack XR-ODS (50 x 3 mm, 2,2 µm, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) gegeben. Eluenten waren zum einen Wasser + 0.1% HCOOH und ACN + 0.1% HCOOH, des weiteren Wasser + 0.1% HCOOH und MeOH + 0.1% HCOOH sowie Wasser + 4 mM Ammoniumacetat, pH 4 und Acetonitril + 0.1 % HCOOH.

Am API 3000 wurde die Säule während der Trennung auf 35 °C eingestellt. Pharmaka wurden teils im positiven und teils im negativen Messmodus quantifiziert. Die Flussrate im positiven Modus betrug 0,35 mL/min, als Gaseinstellungen wurden für den Nebulizer 12 V, für das Curtain Gas 10 V, für die Temperatur der Ionenquelle 450 °C und eine Ionisierungsspannung von 5000 V eingestellt. Im negativen Modus wurde eine Flussrate von 0,3 mL/min gewählt. Die Gaseinstellungen und die Temperatur der Ionenquelle entsprachen dem positiven Modus, die Ionisierungsspannung betrug -4500 V. RKM wurden positiv gemessen. Die Gaseinstellungen wurden mit 12 V für den Nebulizer und 6 V für das Curtain Gas angegeben. Die Flussrate, die Temperatur der Ionenquelle und die Ionisierungsspannung stimmen mit der positiven Messmethode der Pharmaka überein.

An der Q Trap wurde die chromatographische Trennung bei 40 °C durchgeführt. Durch Elektrospray Ionisierung (ESI) gelangten die Proben in das Massenspektrometer. Die MS Parameter wurden folgendermaßen eingestellt: Curtain Gas 15 V, Temperatur der Ionenquelle 550 °C, Gas 1 40 psi, Gas 2 80 psi, Ionisierungsspannung 5500 V, Declusteringpotential 50 V, Eintrittspotential 6 V, Zelleneintrittspotential 18 V, Kollisionsenergie 27 eV, Zellenaustrittspotential 4 V. Die Flussrate betrug für die Fluorquinolone 0,3 mL/min, für Sulfamethoxazol 0,4 mL/min.

Die Auswertung erfolgte mittels Analyst 1.5 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) bei den Direktmessungen über eine externe Kalibration und bei aufgearbeiteten Proben über eine interne Kalibration. Die Regressionsanalyse ist linear mit inverser Gewichtung (1/x). Die Nachweisgrenze war mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 3:1 definiert, die Bestimmungsgrenze mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 10:1.

Zusätzlich zur Quantifizierung bekannter Spurenstoffe wurde eine analytische Methode entwickelt, die ein Screening auf bislang unbekannte Spurenstoffe und Transformationsprodukte ermöglicht. Die chromatographische Trennung erfolgte über einen linearen Gradienten. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte über ein Information Dependent Acquisition (IDA) Experiment. Dabei wurde ein Massenbereich von m/z = 50 bis 500 gescannt. Die Ionenfalle war auf eine minimale Peakintensität von 1000 eingestellt. Die

Kollisionsenergie wurde konstant auf 10 V eingestellt. Die Massentoleranz betrug 250 mmu, Isotopen wurden in einem Bereich von 4.9 Da ausgeschlossen. Die Gaseinstellungen wurden aus der Quantifizierungsmethode übernommen. Pro IDA Experiment wurden zwei Massen, die in der Detektion die höchste Intensität erreichten, während der Messung herausgefiltert, und weiter fragmentiert. Dies ermöglichte Rückschlüsse auf die Molekülstruktur der unbekannt Substanzen. Neben der massenspektrometrischen Detektion wurde auch das UV Signal bei 254 nm und 275 nm aufgenommen.

### 3.2.4 GC-MS

Zur GC-MS (Trace GC Ultra gekoppelt mit einem DSQ Massenspektrometer, Thermo-Scientific, Dreieich, Deutschland) Analyse von Bisphenol A wurde eine Restek Rxi – 5Sil-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Restek, Bellefonte, PA, United States) verwendet. Als Trägergas wurde Helium 5.0 (Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt, die Ofentemperatur betrug 100 °C. Der Gaschromatograph wurde auf eine Heizrate von 40 °C/min bis 260 °C und eine nachfolgende Heizrate von 5 °C/min bis 310 °C eingestellt. Die chromatographische Trennung der Organophosphate sowie Triclosan, Galaxolid und Tonalid erfolgte mit einer DB-5MS Säule (J&W Scientific, Folsom, USA, 15 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) bei einer linear ansteigenden Temperatur von 70 °C bis 280 °C über eine Laufzeit von 30 Minuten.

Über ein Programmed Temperature Vaporizer- (PTV)-Kaltaufgabesystem wurden die Proben vollständig in das MS überführt. Das Injektionsvolumen war auf 1 µL eingestellt und als Trägergas wurde Helium (5.0) mit einem Fluss von 1,3 mL min<sup>-1</sup> genutzt. Die Heizrate betrug hierbei 14,5 °C/sec von 100 °C bis 320 °C. Die Temperatur der Ionenquelle war für Bisphenol A auf 200 °C und für die Organophosphate sowie Triclosan, Galaxolid und Tonalid auf 230 °C eingestellt. Die massenspektrometrische Messung erfolgte mit einer Selected Ion Monitoring (SIM) Methode. Für die Quantifizierung wurden die in Tabelle 4 dargestellten Massenspuren verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Xcalibur (Thermo-Scientific, Dreieich, Deutschland) über eine lineare Regression. Die Nachweisgrenze war mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 3:1 definiert, die Bestimmungsgrenze mit einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 10:1.

**Tabelle 4: Massenübergänge der Analyten in GC-MS.**

<b>Verbindung</b>	<b>1. Masse [Da]</b>	<b>3. Masse [Da]</b>
Bisphenol A	357	372
TCPP	277	279
TBEP	199	299
TPP	325	326
Triclosan	288	290
Galaxolid	243	258
Tonalid	243	258

Für die Untersuchung von Einzelsubstanzen oder Stoffgemischen auf Transformationsprodukte wurde im Quadrupol-Massenspektrometer ein Full-Scan-Modus durchgeführt. Dabei wurden Fragmente von  $m/z = 50$  bis 400 detektiert.

### 3.3 Toxizitäts-Tests

#### 3.3.1 Chemikalien und Zellen

Die verwendeten Chemikalien und Zellen zur Durchführung der toxikologischen Untersuchungen sind in nachfolgender Tabelle 5 zu finden.

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Zellen der toxikologischen Untersuchungen.**

Produkt	Firma
CHO-9 Zellen	ECACC; Salisbury, UK
T47D Zellen	BioDetection Systems (BDS); Amsterdam, NL
Blutagarplatten	Oxoid; Wesel, D
17 $\beta$ -Ethinylestradiol	BDS; Amsterdam, NL
2-Aminoanthracen	Xenometrix; Allschwil, Ch
2-Nitrofluoren	Xenometrix; Allschwil, Ch
4-Nitroquinolone-N-Oxid	Xenometrix; Allschwil, Ch
Ames MPF Aqua 98/100 Test Kit (J10-210)	Xenometrix; Allschwil, Ch
Ampicillin	Xenometrix; Allschwil, Ch
Ampuwa (steriles Wasser)	Fresenius Kabi; Bad Homburg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
DMEM F12 mit Phenolrot	Gibco; Karlsruhe, D
DMEM F12 ohne Phenolrot	Gibco; Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Essigsäure	AppliChem; Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco; Karlsruhe, D
Gentamycin	c.c.pro; Oberdorla, D
GlowMix	BDS; Amsterdam, NL
HAM's F12	c.c.pro; Oberdorla, D
Salzsäure (HCl)	Merck; Darmstadt, D
L-Glutamin	c.c.pro; Oberdorla, D
Low melting point (L.M.P.) Agarose	Invitrogen; Paisley, UK
Lyselösung ER Calux	BDS; Amsterdam, NL
MTT	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
MMAIII (Monomethylarsen III)	Argus Chemicals; Vernio, I
Natriumchlorid (NaCl)	Merck; Darmstadt, D

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
N-Laurylsarcosine Sodium Salt	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Non-essential amino acids (NEAA)	c.c.pro; Oberdorla, D
PAN I Cytotoxicity Kit (PAN I 96.1200)	Xenometrix; Allschwil, Ch
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco; Karlsruhe, D
Referenzwasser	BDS; Amsterdam, NL
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
S9 Mix	Xenometrix; Allschwil, Ch
Stripped FKS	BDS; Amsterdam, NL
SYBR-Green®	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Triton-X	Merck; Darmstadt, D
Trizma	Sigma-Aldrich; Steinheim, D

### 3.3.2 Ansetzen der Zellkultur

CHO-9 Zellen wurden in HAM's F12 Medium mit 10 % FKS, 0,5 % Gentamycin und 0,5 % L-Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Einsäen der verschiedenen Zellkonzentrationen für die einzelnen Versuche erfolgte, indem zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Sekunden mit einer 0,05 % Trypsin-EDTA Lösung behandelt wurden. Nach der Entfernung des Trypsins wurden die Zellen für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert bevor sie in Medium resuspendiert wurden, und die entsprechende Zellzahl eingestellt wurde.

T47D Zellen wurden in DMEM F12 mit Phenolrot und 7,5 % FKS, 3 mL Gentamycin und 5 mL Non-essential aminoacids ebenfalls bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Versuchsdurchführung nach dem Einsäen der 96-Well Platten wurde spezielles Assay-Medium bestehend aus DMEM F12 ohne Phenolrot, 25 mL stripped FKS und 5 mL Non-essential aminoacids eingesetzt. Für die Exposition der 17β-Ethinylestradiol Standardreihe wurde das Assay-Medium dann im Verhältnis 1:10 mit sterilem Wasser gemischt (Assay Medium-I). Die Exposition der Proben erfolgte nachdem das Assay-Medium im Verhältnis von 1:100 mit DMSO gemischt wurde (Assay Medium-II), um die gleichen Expositionsbedingungen für die Standards und die Proben zu bekommen.

### 3.3.3 Probenvorbereitung

Vor Versuchsbeginn wurden die Proben des Kläranlagenablaufes über einen Filter sterilfiltriert (0,2 µm MiniSart Filter, Sartorius StedimBiotech).

### 3.3.4 Cytotoxizität

#### 3.3.4.1 MTT Test

50.000 CHO-9 Zellen wurden in 200 µL HAM's F12 je Well einer 96-Well Platte eingesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Exposition wurde am nächsten Tag das alte Medium entfernt und durch 180 µL frisches Medium sowie 20 µL der Probe oder der Positivkontrolle (50 µM MMAIII) ersetzt (je 3 Wells pro Probe) und die Zellen für 24-h exponiert. Nach der Exposition wurde das Medium entfernt, 100 µL frisches Medium sowie 10 µL Färbelösung (5 mg MTT Pulver in 1 mL PBS gelöst und gefiltert) zugegeben und die Zellen für weitere 2 h inkubiert. Danach wurde das Medium erneut entfernt und 100 µL Lyselösung (99,4 mL DMSO, 0,6 mL Essigsäure und 10 g SDS) pro Well zugegeben, die Platte 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 5 min bei 250 rpm geschüttelt. Die Absorbanz wurde dann mit Hilfe eines Photometers (Tecan GENios) bei 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die dargestellten Werte zeigen den Mittelwert einer 3 fach-Bestimmung sowie die Standardabweichung.

#### 3.3.4.2 MultiTox Test (PAN I: LDHe – XTT – NR – SRB)

Der Test wurde laut Angaben des Herstellers (Xenometrix, Ch) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit jeweils 20.000 CHO-9 Zellen/200 µL Medium pro Well und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium entnommen und 180 µL frisches Medium sowie 20 µL der Proben sowie die Positivkontrolle (1 % Triton-X) zugegeben und die Platten für 24 h inkubiert. Jede Probe wurde in drei Wells getestet. Nach der Exposition wurde als erstes der LDHe Test vorbereitet. Dazu wurden 50 µL Überstand in eine neue 96-Well Platte überführt, und die LDHe Lösungen laut Protokoll zugegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte dann bei 340 nm, kinetisch alle 5 min über einen Zeitraum von insgesamt 25 min. Für die Durchführung des XTT Tests wurden die XTT Lösungen in die Wells der Originalplatte gegeben und anschließend die Absorption bei 480 nm gemessen. Als nächstes folgte der Neutral Rot Test. Dazu wurden die entsprechenden Lösungen in die Wells pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Der letzte Test des Kits ist der Sulforhodamin B (SRB) Test. Hierfür

wurden die Lösungen in die Wells gegeben und anschließend die Absorption bei 540 nm gemessen. In den Diagrammen werden der Mittelwert vitaler Zellen, sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.3.4.3 *Ergebnisdarstellung der Cytotoxizitätstests*

Die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests werden anhand der DIN EN ISO 10993-5 eingestuft, welche den Grad der Cytotoxizität festlegt (Tabelle 6) [97].

**Tabelle 6: Grad der Cytotoxizität laut DIN EN ISO 10993-5.**

<b>Grad der Schädigung</b>	<b>Vitalität [%]</b>	<b>Cytotoxizität</b>
0	81 – 100 %	nicht cytotoxisch
1	71 – 80 %	schwach cytotoxisch
2	61 – 70 %	mäßig cytotoxisch
3	0 – 60 %	stark cytotoxisch

### 3.3.4.4 *Nachweis von Peroxiden*

Cytotoxische Proben wurden zusätzlich noch auf das Vorhandensein von Peroxiden getestet, um falsch-positive Ergebnisse durch Restperoxide auszuschließen. Der Gehalt an Peroxiden wurde mit Quantofix® Peroxid-Teststäbchen nachgewiesen, die einen semiquantitativen Nachweis erlauben.

### 3.3.5 Gentoxizität (Alkaline Comet Assay)

Die zur Durchführung des Alkaline Comet Assay benötigten Lösungen sind in Tabelle 7 angegeben.

**Tabelle 7: Benötigte Lösungen zur Durchführung des Alkaline Comet Assay.**

Lösung	Zusammensetzung
Tris-Lösung (1 M)	157,6 g Trizma in 1 L Ampuwa gelöst
NaOH Lösung (2 M)	80 g NaOH in 1 L Ampuwa gelöst
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA in 1 L Ampuwa gelöst und mit NaOH auf pH 8 eingestellt
Lyselösung I	10 mL Tris-Lösung (1 M), 146,1 g NaCl, 100 mL EDTA (1 M) und 10 g N-Laurylsarcosine Sodium Salt in einen Messzylinder geben und mit Ampuwa auf 1 L auffüllen und auf 100 °C erhitzen
Lyselösung II	100 mL DMSO und 10 mL Triton-X mischen und lichtgeschützt lagern
Neutralisationslösung	200 mL Tris-Lösung (1 M) in einen Messzylinder geben und mit Ampuwa auf ca. 500 mL auffüllen. Die Lösung mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.
50X TAE Puffer	242 g Trizma, 57,1 mL Eisessig und 100 mL EDTA (0,5 M) mit Ampuwa auf 1 L auffüllen.
1X TAE Puffer	10 mL 50x TAE Puffer mit 490 mL Ampuwa mischen
L.M.P. Agarose (0,75 %)	0,75 g Low Melting Point Agarose in 100 mL PBS gelöst
Elektrophoreselösung	75 mL NaOH (2 M), 1 mL EDTA (0,5 M) und 0,79 g Trizma mit Ampuwa auf ca. 500 mL auffüllen und mit HCl auf pH 12,7 einstellen
SYBR-Green® Lösung	5 µL SYBR-Green® in 50 mL 1x TAE Puffer gelöst

Der Alkaline Comet Assay wurde durchgeführt wie bereits in den 80er Jahren von Ostling und Johansen [95] beschrieben und später von Singh et al. [96] modifiziert. Nach dem Trypsinieren und Resuspendieren wurden die CHO-9 Zellen mit einer Zellzahl von 100.000 CHO-9/2 mL je Well einer 24-Well Platte (Greiner Bio One: Art. Nr.: 662160) eingesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann die Exposition der Zellen im Verhältnis 1:10 der Probe ins Medium durchgeführt. Das Medium wurde dazu aus den Wells entfernt, und frisches Medium zugeben (1,8 mL/Well). Dann wurden 200 µL Probe zugeben und die Platten dann für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden 2 mL Medium und für die Positivkontrolle wurden 1,98 mL

frisches Medium zugegeben. Zur Vorbereitung der Agarosegele wurde ein Chamber Slide (8 Chamber; BD Bioscience Europe; Erembodegem, Belgien) auf die hydrophile Seite des Gelbond® Films (Lonza; Rockland, USA) geklebt. Jede Kammer wurde dann mit 50 µL L.M.P. Agarose gefüllt und zum Aushärten der Agarose über Nacht bei 4 °C gelagert. 30 min vor Ablauf der Expositionsdauer wurde in das Well der Positivkontrolle 20 µL ENU (10 mg/mL) gegeben. Nach Ende der Exposition wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach für 10 Sekunden mit Trypsin behandelt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 500 µL PBS resuspendiert und die Zellzahl auf 400.000 Zellen/mL eingestellt. 20 µL Zellsuspension wurden dann mit 45 µL L.M.P. Agarose gemischt und in die entsprechende Kammer auf dem Gelbond®-Film gegeben. Nach dem Aushärten der Agarose wurde die Kammer abgenommen, und die Filme über Nacht in die auf 4 °C gekühlte Lyselösung (44,5 mL Lyselösung I und 5,5 mL Lyselösung II) gelegt. Für die Elektrophorese wurde zunächst die Elektrophoreselösung hergestellt und auf 4 °C gekühlt. Die Filme wurden dann in die mit gekühlter Elektrophoreselösung gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und für 20 min inkubiert bevor die Stromstärke für 30 min auf 300 mA eingestellt wurde. Danach wurden die Gele für 30 min in Neutralisationslösung überführt und für weitere 2 h in Ethanol absolut inkubiert. Die Gele wurden dann in eine Box gelegt und über Nacht im Kühlschrank getrocknet.

Zur Auswertung wurde je ein Film mit 1 mL SYBR®-Green Lösung für 18 min gefärbt und danach mit dem 40x Objektiv und der Comet Assay 4 Software (Perceptive Instruments, UK) an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wozu je Gel 50 Zellen ausgewertet wurden. Die Statistik erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software. Alle Proben wurden 3-fach getestet. Die Mittelwerte des Olive Tail Moment (OTM) sowie der Standardfehler sind in den Diagrammen im Ergebnisteil dargestellt. Der Mann-Whitney Test wurde durchgeführt um die Signifikanz der DNA Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle zu berechnen (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Statistische Angaben des Mann-Whitney Testes.**

P value	> 0.05	0.01 – 0.05	0.01 – 0.001	< 0.001
P value summary		*	**	***
Signifikanz	nicht signifikant	signifikant	sehr signifikant	extrem signifikant

### 3.3.6 Mutagenität (Ames MPF 98/100 Aqua Test)

Der Ames Test wurde im Microwell Platten Format an den Salmonella typhimurium Stämmen TA98 und TA100 durchgeführt. Dafür wurden zwei Erlenmeyerkolben mit jeweils 10 mL Growth Medium und 10 µL Ampicillin gefüllt und ein zusätzlicher Kolben nur mit 2 mL Growth Medium als Negativkontrolle. Die Röhren mit den Bakterienkulturen wurden aufgetaut und sofort nach dem Auftauen wurden 50 µL der Bakteriensuspension in die entsprechenden Kolben gefüllt und für 16 h unter Schütteln im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Dafür wurden je 900 µL Growth Medium und 100 µL Bakteriensuspension in vier Küvetten gefüllt und die optische Dichte bestimmt. Danach wurde der Versuch nach der von Xenometrix bereitgestellten Vorlage durchgeführt. Die Proben wurden dabei jeweils im 3-fach Ansatz in einer 24-Well Platte mit und ohne S9 getestet. Für die Exposition wurden die entsprechenden Substanzen wie in Tabelle 9 dargestellt in die entsprechenden Wells pipettiert.

**Tabelle 9: Pipettierschema der Exposition der Bakterienstämme.**

	TA 98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
10x Expositionsmedium	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Probe	185 µL	185 µL	185 µL	185 µL
Wasser (steril)	15 µL		15 µL	
Bakterien	25 µL	25 µL	25 µL (1:2)	25 µL (1:2)
S9 Mix		15 µL		15 µL

Nach 90 min Inkubation bei 37 °C wurden in jedes Well 2,8 mL Indikatormedium gegeben. Aus jedem Well wurden dann 50 µL Überstand in 48 Wells einer 384-Well Platte überführt und die Platten für weitere 2 Tage in einer verschließbaren Tüte bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die positiven Wells je Probe gezählt, und die Ergebnisse anhand einer von Xenometrix bereitgestellten Excel Datei ausgewertet.

### 3.3.7 Östrogenität (ER Calux)

Für die Durchführung des ER Calux wurden zunächst die Zellen in eine 96-Well-Platte (nur NalgeNunc international, 167008) mit jeweils 10.000 T47D-Zellen/100 µL Assay Medium je Well eingesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann ein Mediumwechsel und die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert. Für die Exposition der Zellen gegen die 17β-Ethinylestradiol Standardreihe wurden 1 µL der entsprechende Konzentration 17β-Ethinylestradiol mit 1 mL Assay-Medium-I gemischt. Zur Exposition wurden dann je 100 µL dieser Lösungen in die entsprechenden Wells gegeben. Das gleiche wurde mit DMSO und dem Referenzwasser durchgeführt. Danach wurde das alte Medium abgenommen. In die Wells für die Standardreihe, das DMSO und die Referenzprobe wurden je 100 µL der zuvor angesetzten Lösungen gegeben. Die Wells für die Proben wurden mit 90 µL Assay-Medium-II und 10 µL Probe befüllt und die Platten für weitere 24 h inkubiert. Für die Lumineszenzmessung wurde das Expositionsmedium entfernt und 100 µL frisches Medium sowie 10 µL Lyselösung zugegeben und die Platte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt nach dieser Inkubationszeit wurden 30 µL des Überstandes in eine weiße 96-Well-Platte (Greiner Bio One; Art.-Nr.: 655075) überführt und 30 µL Glowmix zugegeben. Sofort danach wurde die Lumineszenz gemessen. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte dann mittels einer von BioDetection-Systems bereitgestellten Microsoft Excel™ Datei.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswahl und Priorisierung repräsentativer Markersubstanzen (AP 3.3.1)

Relevante Spurenstoffe aus den Bereichen der Arzneimittelwirkstoffe, Industriechemikalien und Personal Care Produkte konnten in Zusammenarbeit mit dem projektbegleitenden Ausschuss ausgewählt werden. Tabelle 10 gibt einen Überblick über alle ausgewählten Substanzen, die Konzentrationsbereiche in Abwässern kommunaler Kläranlagen und einen Überblick über bereits vorhandene Literatur zum Thema Transformationsprodukte.

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Konzentrationsbereiche im Ablauf von kommunalen Kläranlagen und Vorkommen der Substanzen in Oberflächengewässern [33, 66-68, 98-171].**

Substanz	Konzentrationsbereiche im Ablauf kommunaler Kläranlagen [ $\mu\text{g/L}$ ]	Literatur über bereits bekannte Transformationsprodukte
Amidotrizoesäure	0,1 - 15	[153, 170]
Bisphenol A (BPA)	0,1 - 0,3	[98-108]
Carbamazepin	0,1 - 7	[66, 67, 109-116]
Ciprofloxacin	0,1 - 5	[117-129]
Cyclophosphamid	0,005 - 0,1	[130-134]
Diclofenac	0,1 - 30	[135-145]
Galaxolid (HHCB)	0,1 - 1	[146]
Ibuprofen	0,1 - 25	[147, 148]
Metoprolol	0,2 - 3,8	[149-152]
Organophosphate (z. B. TCPP)	0,1 - 5	[134, 166]
Röntgenkontrastmittel	0,5 - 15	[153-157]
Roxithromycin	0,1 - 1	[167]
Steroid Hormone	0,001 - 0,1	[68, 98-105, 108, 168]
Sulfamethoxazol	0,1 - 2	[115, 160-165]
Terbutryn	0,1 - 0,35	[158]
Tonalid (AHTN)	0,1 - 0,2	[146]
Triclosan	0,1 - 0,5	[33, 159, 171]

Begleitende wissenschaftliche Untersuchungen zu Oxidationsprodukten (AP 3.3.2) sind über den gesamten Projektzeitraum durchgeführt worden. Zu allen Substanzen ist eine Literaturrecherche zu bereits postulierten Oxidationsnebenprodukten durchgeführt worden.

Anhand ausgewählter Substanzen sind Oxidationsversuche durchgeführt worden. Die aus der Literatur bekannten Transformationsprodukte konnten zum Teil bestätigt werden, zum Teil konnten aber auch Strukturvorschläge für neu entdeckte Oxidationsnebenprodukte gegeben werden.

#### 4.2 **Adaptierung der toxikologischen Methoden an die Matrix Kläranlagenablauf (AP 3.3.4)**

Da die hier angewandten toxikologischen Methoden zum Teil nicht für die Testung von wässrigen Proben ausgelegt sind (MTT Test, ER Calux und Alkaline Comet Assay), mussten diese zunächst an die Wassermatrix angepasst werden. Der Ames MPF™ 98/100 Aqua hingegen, ist für die Untersuchung wässriger Proben entwickelt worden und musste daher nicht angepasst werden.

Durch das Testen einer Verdünnungsreihe konnte ermittelt werden, dass eine Wasserkonzentration von 10 % im Medium zu keinerlei negativen Einflüssen der Zellen führt. Eine Exposition der Proben im Verhältnis von 1:10 ins Medium ist somit möglich.

**Tabelle 11: Effekte von 10 % Reinstwasser im Expositionsmedium.**

	<b>MTT Test</b> <b>[Grad der Cytotoxizität]</b>		<b>Alkaline Comet Assay</b> <b>[Signifikanz der DNA Schädigung]</b>
<b>Verdünnung H<sub>2</sub>O</b>	CHO	T47D	
<b>Neg. Kontrolle</b>	0	0	nicht signifikant
<b>1:10</b>	0	0	nicht signifikant
<b>Pos. Kontrolle</b>	3	3	hoch signifikant

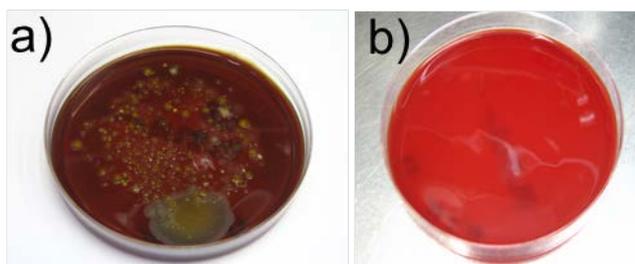
Einige der Proben wurden sowohl im Originalzustand als auch aufkonzentriert getestet. Da nach einer Aufkonzentrierung die Proben im stark toxischen Methanol vorliegen, musste auch hier untersucht werden, ab welcher Methanolkonzentration keine toxischen Effekte mehr auftreten. Die Tests ergaben, dass eine Verdünnung der Probe von 1:10 in Reinstwasser vor der Exposition ausreichend ist, um toxische Effekte zu vermeiden (Tabelle 12). Die Methanolkonzentration während der Exposition beträgt dann 1 %.

**Tabelle 12: Toxizität verschiedener Methanolkonzentrationen im MTT Test und Alkaline Comet Assay.**

	<b>MTT Test</b> [Grad der Cytotoxizität]		<b>Alkaline Comet Assay</b> [Signifikanz der DNA Schädigung]
<b>c [Methanol]</b>	CHO	T47D	
<b>Neg. Kontrolle</b>	0	0	nicht signifikant
<b>1 %</b>	0	0	nicht signifikant
<b>10 %</b>	3	3	hoch signifikant
<b>Pos. Kontrolle</b>	3	3	hoch Signifikant

Des Weiteren kann es durch die Zugabe von Kläranlagenablauf in Zellkulturmedien durch enthaltene Mikroorganismen zu Kontaminationen kommen. Um dies zu vermeiden, wurde ein Teil des Kläranlagenablaufes filtriert während der andere Teil unbehandelt blieb. Beide Teile wurden dann auf Blutagarplatten ausgestrichen, und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Wie in Abbildung 5a zu erkennen ist, weisen die Proben des Kläranlagenablaufes eine starke mikrobielle Belastung auf. Eine sterile Filtration der Proben vor der Exposition dagegen ist ausreichend, um die Mikroorganismen aus dem Kläranlagenablauf zu entfernen, und eine Kontamination der Zellkultur zu vermeiden (Abbildung 5b).



**Abbildung 5: Blutagarplatten mit Bakterienkolonien. Nach Ausstrich einer unbehandelten Kläranlagenablaufprobe (a) und eine Platte ohne Kolonien nach Ausstrich einer steril gefilterten Kläranlagenablaufprobe (b) nach 24 h Inkubation bei 37 °C.**

Die Fraktionierung der Proben hat keinen Einfluss auf deren Toxizität. Die erste Analyse von UV-behandelten Proben allerdings zeigte, dass der Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erhöhten toxischen Effekten führte. Die nach der Oxidation durchgeführte Zugabe von Katalase und die damit verbundene Reduktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte keinerlei Effekte mehr (Abbildung 6). Daher kann dieses System für weitere Versuche eingesetzt werden.

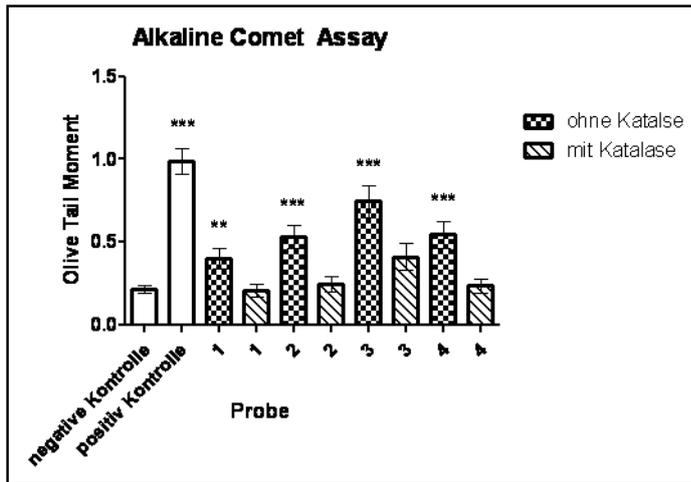


Abbildung 6: Gentoxizitätsuntersuchungen von UV-behandelten Proben. Statistische Auswertung durch Mann Whitney Test: \*\*signifikant; \*\*\*hoch signifikant.

#### 4.3 Chemische und toxikologische Untersuchungen der einzelnen Oxidationsversuche

Im folgenden Kapitel sind die wichtigsten Ergebnisse der Arbeitspakete 3.3.5 bis 3.3.8 zusammengefasst und substanzbezogen dargestellt. Eine Darstellung aller Detailergebnisse ist im Rahmen des Abschlussberichtes zu umfangreich. Diese können den aus dem Forschungsvorhaben entstandenen Publikationen (Kapitel 9) und der Datenbank (Kapitel 4.5) entnommen werden.

Arbeitspaket 3.3.5 umfasst „Modellversuche zur Identifizierung von potentiell problematischen Oxidationsnebenprodukten und priorisierten Markersubstanzen“. Dazu sind Versuche mit Standards in Reinstwasser durchgeführt worden. In Arbeitspaket 3.3.6 (Laborversuche mit realen Abläufen kommunaler Kläranlagen im Batch-Betrieb) ist das Reinstwasser durch die Matrix Kläranlagenablauf ersetzt worden. Die Versuche sind mit realen und dotierten Kläranlagenabläufen durchgeführt worden. Die „Technikumsversuche an einer Kläranlage“ (AP 3.3.7) sind auf der Kläranlage Bottrop durchgeführt worden. Dazu ist vor Ort eine für dieses Projekt angeschaffte Durchflussanlage zur UV-Oxidation installiert worden. Die Ergebnisse sind substanzbezogen innerhalb des Kapitels 4.3 zu finden, die Beschreibung der Installation und die Ergebnisse der Teilstrombehandlung im Durchfluss in Kapitel 4.4.

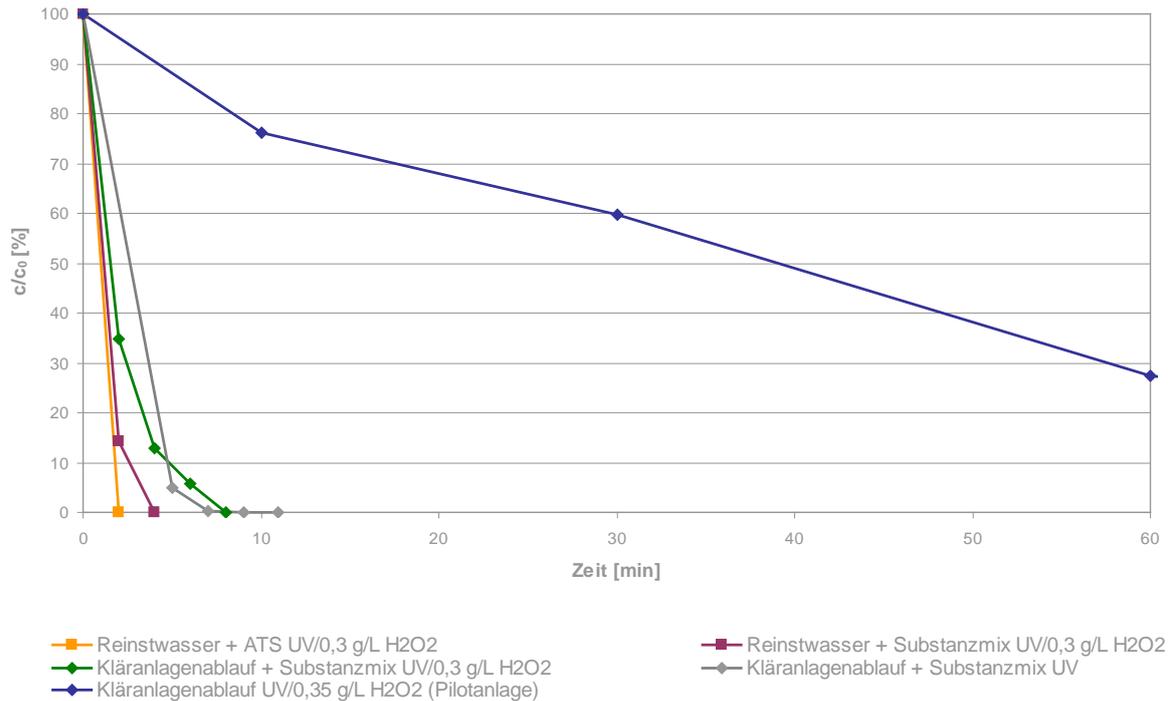
Die Ergebnisse von Arbeitspaket 3.3.8 (Untersuchungen zur Toxizität von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen, sowie anfallender Extrakte der Ablaufproben) sind ebenfalls substanzbezogen angegeben.

#### **4.3.1 Amidotrizoesäure**

##### *4.3.1.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen*

Der Abbau von Amidotrizoesäure mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation wurde sowohl im Labor- und Pilotmaßstab als auch im Batchbetrieb der Durchflussanlage untersucht.

In Abbildung 7 sind die Abbaukurven des Röntgenkontrastmittels dargestellt. Im Labormaßstab konnte eine vollständige Elimination aus Reinstwasser und dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) erzielt werden. Der Substanzabbau wurde in einer Reaktionszeit von 2-12 min erzielt. Die Abbauraten von Amidotrizoesäure aus mit einem Substanzmix (jeweils  $c = 0,1 \text{ mg/L}$  Amidotrizoesäure, Carbamazepin, Diclofenac, Metoprolol und Sulfamethoxazol) versetzten Reinstwasser ist mit  $0,7 \text{ min/L}$  geringer als im mit einem Substanzmix dotiertem Kläranlagenablauf ( $1,5 \text{ min/L}$ ). Die vollständige Elimination aus Kläranlagenabläufen wurde ebenfalls mit der Durchflussanlage erreicht. Die Substanzelelimination im Batchbetrieb der Durchflussanlage erfolgte noch während der Anlaufzeit der beiden 4 kW-Strahler, sodass eine Berechnung der Abbauraten nicht möglich war. Im Unterauftrag durchgeführte Untersuchungen des AOI konnten aufgrund einer zu schlechten Nachweisempfindlichkeit nicht ausgewertet werden. Aus diesem Grund kann keine Aussage zur Zerstörung des Triiodbenzolgrundgerüsts gegeben werden.



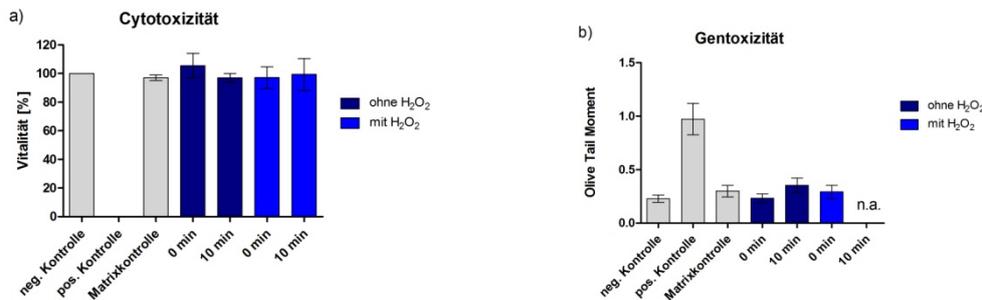
**Abbildung 7: Abbaukurven von Amidotrizoesäure aus dotiertem Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab.**

In den bei diesen Versuchen vorhandenen Ausgangskonzentrationen an Amidotrizoesäure konnten keine Transformationsprodukte detektiert werden. Da allerdings in der Literatur bereits einige Transformationsprodukte beschrieben wurden, erfolgten keine weiteren chemischen Untersuchungen zu dieser Substanz [153]. Zudem wurde bereits gezeigt, dass in oxidativer Behandlung von synthetischen Abwässern der AOX reduziert werden konnte [172].

#### 4.3.1.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die hier untersuchten Reinstwasserproben hatten eine Endkonzentration von 10 µg/L Amidotrizoesäure bei der Exposition. Die Auswertung des MTT Tests zum Nachweis der Cytotoxizität ergab weder vor noch nach der UV Behandlung eine Verringerung der Vitalität der CHO Zellen. Auch sind keine Unterschiede bei den Proben mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erkennen (Abbildung 8a). Demnach sind alle in den Diagrammen dargestellten Proben als nicht cytotoxisch einzustufen. Die Ergebnisse des Comet Assay zeigen, dass nur bei der 10 min UV-oxidierten Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine starke DNA Schädigung vorliegt und eine

Auswertung nicht mehr möglich war. Alle anderen Proben waren negativ (Abbildung 8b). Der Test auf Peroxide fiel bei dieser Probe negativ aus, was auf die Bildung toxischer Nebenprodukte hindeutet. Zwei Studien konnten bereits zeigen, dass Amidotrizoesäure in Nierenzellen toxisch wirkt [173, 174]. Je nach Testsystem und Expositionsdauer lösen Konzentrationen zwischen 6,1 g/L (Verringerung der metabolischen Aktivität) [174] und 9,25 g/L im LDH Test [173] toxische Effekte aus.



**Abbildung 8: Cytotoxizität und Genotoxizität von Amidotrizoesäure bei der UV-Oxidation.**  
a) Cytotoxische Effekte konnten weder vor noch nach der Behandlung nachgewiesen werden.  
b) Die Proben ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowie die Probe vor der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wiesen keine genotoxischen Eigenschaften auf. Ein Nachweis der Genotoxizität für die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und für 10 min behandelte Probe war auf Grund einer zu starken Schädigung nicht mehr möglich. n.a. = nicht auswertbar.

### 4.3.2 Atenolol

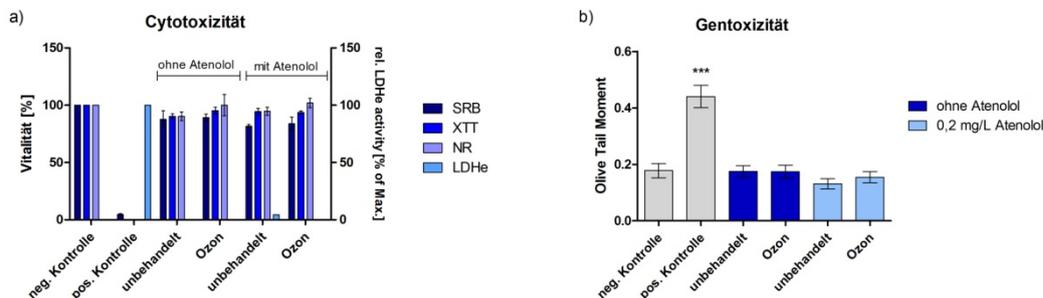
#### 4.3.2.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Durch die durchgeführten Analysen konnten keine Transformationsprodukte ermittelt werden. In der Literatur wurde für die Elektro-Oxidation ein Abbauprodukt beschrieben [175]. Der Abbau von Atenolol mittels Ozonierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Auch im großtechnischen Maßstab konnte Atenolol an der Pilotanlage auf der Kläranlage Regensdorf im Durchschnitt um 70 % eliminiert werden [176].

#### 4.3.2.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse für Atenolol zeigen, dass weder vor noch nach der Ozonierung mit 2 mg O<sub>3</sub>/L cytotoxische (Abbildung 9a) Effekte auftreten da die Vitalität bei allen Proben über 81 % liegt.

Die Ergebnisse des Alkaline Comet Assay weisen auch keine Erhöhung des Olive Tail Moments, d. h. dem Grad der DNA Schädigung auf. Auch ist kein Unterschied zwischen den Proben mit (0,2 mg/L) und ohne Atenolol zu erkennen (Abbildung 9b). Diese Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse anderer Studien, wie nachfolgend erläutert, wieder. Toxische Effekte sind dort erst ab Konzentrationen von mehreren mg/L zu erkennen. Im *C. dubia* Test wurde ein EC<sub>50</sub> Wert (mittlere effektive Konzentration) von 0,03 g/L ermittelt [177], hingegen ergab der MTT Test an sechs verschiedenen Zelllinien (Hornhautepithelzellen und Netzhautpigmentzellen) einen durchschnittlichen IC<sub>50</sub> (mittlere inhibitorische Konzentration eines Wirkstoffes) Wert von 6,1 g/L [178]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine chronische Aufnahme von 50 mg/d Atenolol keine gentoxischen Effekte zur Folge hat [179].



**Abbildung 9: Cyto- und Genotoxizitätsergebnisse von ozonisierten Atenolol. a) Keine Cytotoxizität von 0,2 mg/L Atenolol in Reinstwasser vor und nach der Ozonbehandlung. b) Keine erhöhte DNA Schädigung vor und nach der Ozonierung von Atenolol.**

### 4.3.3 Bisphenol A

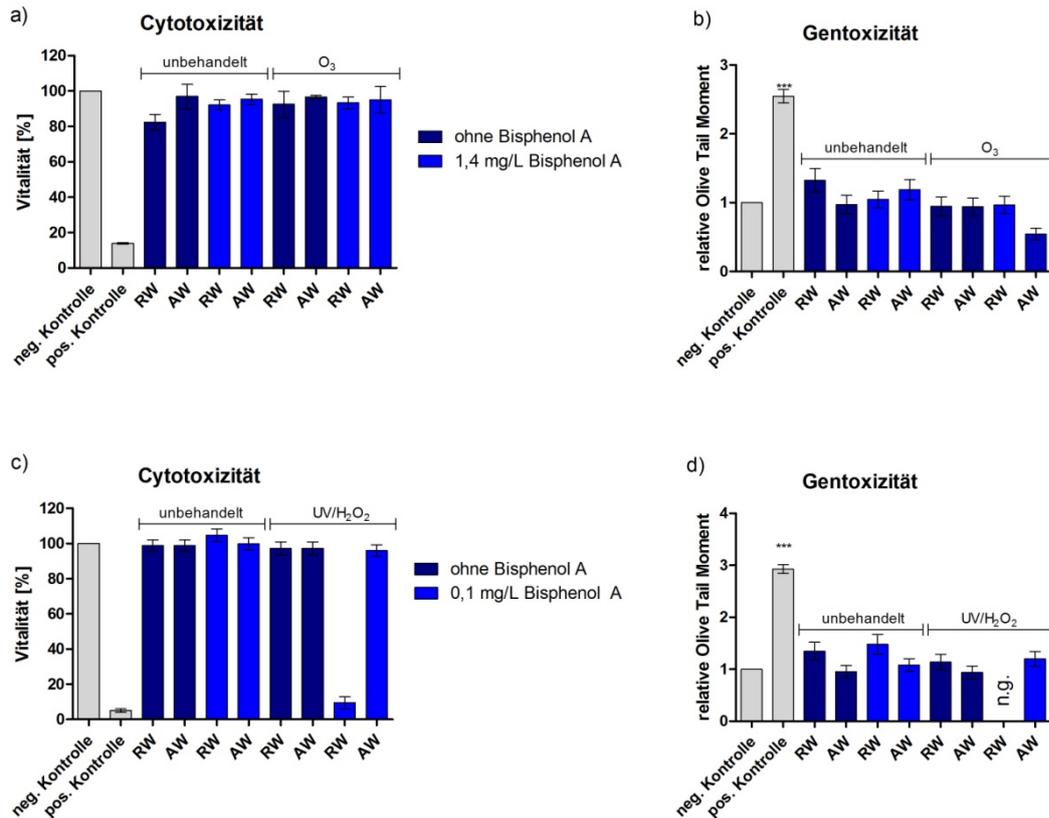
#### 4.3.3.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Durch die durchgeführten Analysen konnten keine Transformationsprodukte ermittelt werden. Bei der Literaturrecherche konnten jedoch 48 mögliche Transformationsprodukte identifiziert werden [98-108]. Der Abbau von Bisphenol A mittels Ozonierung und UV-Oxidation konnte erfolgreich durchgeführt werden.

#### 4.3.3.2 *Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen*

Die in der Literatur beschriebene Toxizität von Bisphenol A wurde meist in Bezug auf endokrine Effekte untersucht. Die  $EC_{50}$  Werte variieren dabei zwischen 10  $\mu\text{g/L}$  und 253  $\mu\text{g/L}$  je nach Testsystem und Expositionsdauer [180, 181]. Golub et al. führten eine Literaturrecherche zur Toxizität von Bisphenol A durch und folgerten, dass Bisphenol A hauptsächlich die Lebensfähigkeit der Nachkommen, die geschlechtliche Ausdifferenzierung, die immune Hypersensitivität sowie die geschlechtsspezifische Morphologie beeinflusst. Demnach ist also in erster Linie das endokrine System betroffen [182]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Ozonierung eines Abwassers aus einer Gerberei zur Bildung von Oxidationsnebenprodukten führte, die das endokrine System beeinträchtigten [183].

Bisphenol A wurde sowohl in Reinstwasser als auch in Kläranlagenablauf mit Konzentrationen von 1,4 mg/L bei der Ozonierung und 0,1 mg/L bei der UV Oxidation getestet. Die Behandlungsdauer betrug für beide Methoden jeweils 60 min. Eine Ozonierung mit 5 mg/L Ozon resultierte nicht in der Bildung cytotoxischer (Abbildung 10a) oder gentoxischer (Abbildung 10b) Nebenprodukte. Auch sind keine Unterschiede zwischen dem Test mit Kläranlagenablauf und mit Reinstwasser zu erkennen. Um die Einflüsse von zwei erweiterten Oxidationsverfahren zu untersuchen, wurden die gleichen Proben noch mit UV behandelt. Hier ist zu erkennen, wie auch schon bei der Ozonierung, dass weder vor noch nach der UV Behandlung des Kläranlagenablaufes cytotoxische (Abbildung 10c) oder gentoxische (Abbildung 10d) Nebenprodukte entstehen. Allerdings führte die UV Oxidation des Reinstwassers mit 0,1 mg/L Bisphenol A zur Bildung stark cytotoxischer Nebenprodukte (Abb. 7c), da der Peroxidnachweis auch hier negativ war. Der Nachweis cytotoxischer Nebenprodukte nach der UV Oxidation des Reinstwassers kann auf die Wassermatrix zurückzuführen sein. Die Abläufe von Kläranlagen haben eine viel komplexere Matrix an z.B. organischen Substanzen, als das Reinstwasser, dem nur Bisphenol A zugesetzt wurde. Daher ist es möglich, dass die UV Oxidation des Reinstwasser zur Bildung toxischer Nebenprodukte führte, da hier Bisphenol A direkt oxidiert werden konnte. In der Probe Kläranlagenablaufes hingegen, kann es zu Konkurrenzreaktionen kommen, und somit zu einer Bildung anderer Nebenprodukte, die nicht toxisch sind.



**Abbildung 10: Toxizität von Bisphenol A vor und nach der Ozonierung und UV Oxidation. a) Der Nachweis auf ein cytotoxisches Potenzial fiel für alle vor und nach der Ozonierung untersuchten Proben negativ aus. b) Auch konnte für keine dieser Proben eine Gentoxizität nachgewiesen werden. c) Außer für die Reinstwasserprobe nach 60 min UV Behandlung konnten für keine weitere Probe cytotoxische Effekte nachgewiesen werden. d) Außer der cytotoxischen Probe, die nicht auf gentoxische Effekte untersucht wurde, waren alle Proben im Alkaline Comet Assay negativ.**

Zusätzlich zu den Cytotoxizitäts- und Gentoxizitätsuntersuchungen wurde der ER Calux mit den UV behandelten Reinstwasserproben durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass vor der Ozonierung eine östrogene Aktivität nachweisbar ist. Die oxidierten Proben hingegen zeigen schon nach einer Behandlungsdauer von 10 min keine Östrogenität mehr (Tabelle 13). Die hier dargestellten Ergebnisse sind bereits in einer eingereichten Publikation zusammengefasst [184].

**Tabelle 13: Östrogenität (pM ER Calux EEQ) von 0,1 mg/L Bisphenol A in Reinstwasser vor und nach der Ozonierung. n.n. = keine Östrogenität nachgewiesen.**

Dauer UV Oxidation	ER Calux EEQ [pM]
0 min	2,7
10 min	n.n.
60 min	n.n.

#### 4.3.4 Carbamazepin

##### 4.3.4.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

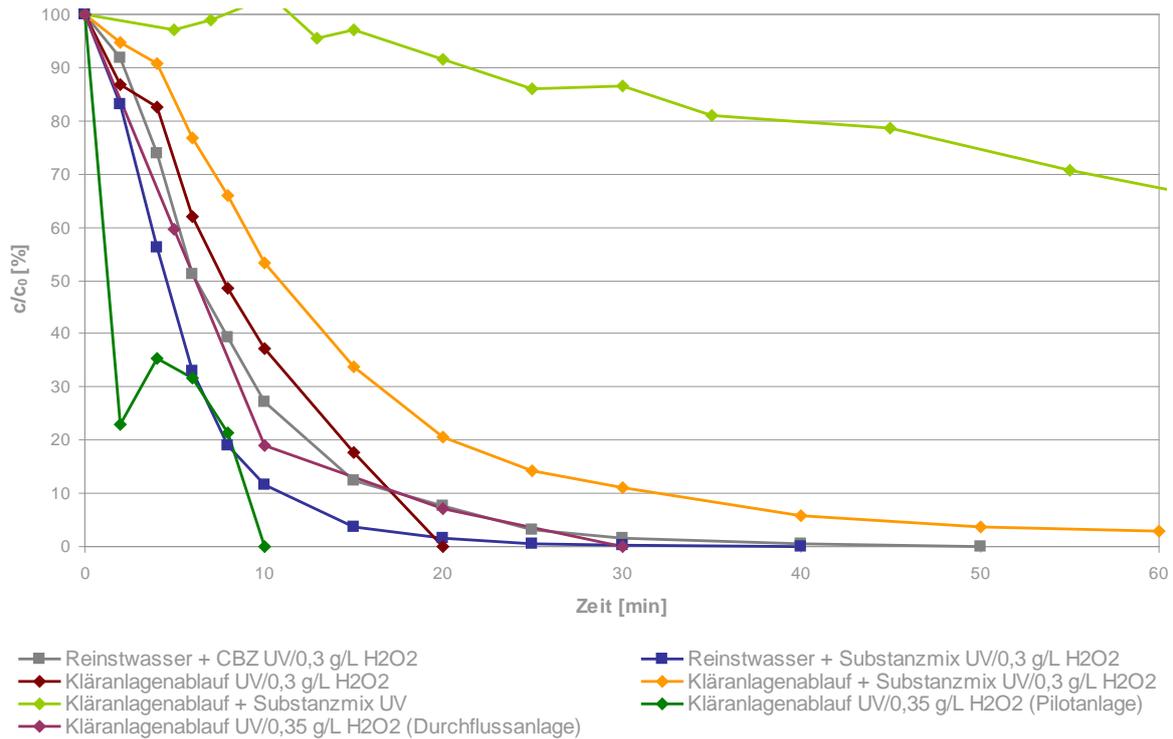
Die Substanzelimination von Carbamazepin wurde in Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) untersucht.

In Abbildung 11 sind Abbaukurven von Carbamazepin dargestellt. Durch eine geringe Lampenleistung konnte im Labormaßstab kein vollständiger Abbau durch UV-Oxidation erzielt werden. Die Eliminationsrate betrug je nach Matrix 20 - 97 %. In Reinstwasser ist die Abbaurate wie erwartet am schnellsten (8,6 min/L). Durch eine höhere Matrixkonzentration im Kläranlagenablauf bzw. im dotiertem Kläranlagenablauf konnte Carbamazepin erst nach 120 min/L bzw. 131 min/L eliminiert werden.

Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verbesserte die Elimination. Im dotiertem Kläranlagenablauf betrug die Abbaurate der UV-Oxidation 97,6 min/L. Durch die zusätzliche Hydroxylradikalquelle konnte Carbamazepin in 10,6 min/L aus dotiertem Kläranlagenablauf entfernt werden.

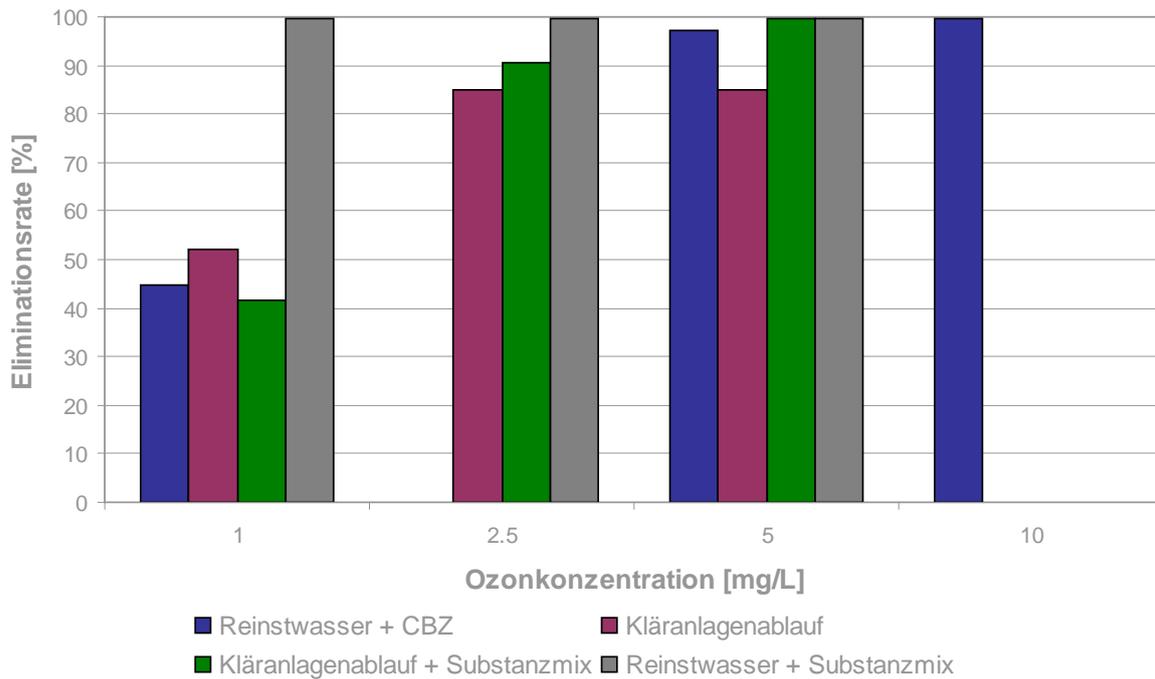
Ein vollständiger Abbau wurde in Reinstwasser und in Kläranlagenablauf mit einer Behandlungsdauer von 20 - 50 min erzielt.

Durch eine höhere Lampenleistungen und eine höhere Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte eine Elimination aus Kläranlagenablauf innerhalb von 10 min im Pilotmaßstab und 30 min im Batchbetrieb der Durchflussanlage erzielt werden. Die Abbaurate sank von 5,9 min/L im Labormaßstab auf 0,02 min/L im Pilotmaßstab und 0,005 min/L mit der Durchflussanlage.



**Abbildung 11: Abbaukurven von Carbamazepin in Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab sowie mit der Durchflussanlage.**

Die Elimination von Carbamazepin aus Reinstwasser ( $c_0 = 0,05 \text{ mmol/L}$ ) durch Ozonung wurde ebenfalls untersucht. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Mit steigender Ozonkonzentration steigt die Eliminationsrate aus Reinstwasser. Bereits mit  $5 \text{ mg O}_3/\text{L}$  konnte 90 % der Ausgangskonzentration abgebaut werden. Ein vollständiger Substanzabbau konnte mit  $10 \text{ mg O}_3/\text{L}$  erzielt werden. Durch eine niedrigere Ausgangskonzentration im Substanzmix ( $c_0 = 100 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) konnte eine vollständige Elimination aus Reinstwasser bereits mit  $1 \text{ mg/L}$  Ozon erreicht werden. Die Abbauleistung wurde durch einen höheren Matrixanteil im Kläranlagenablauf verringert.



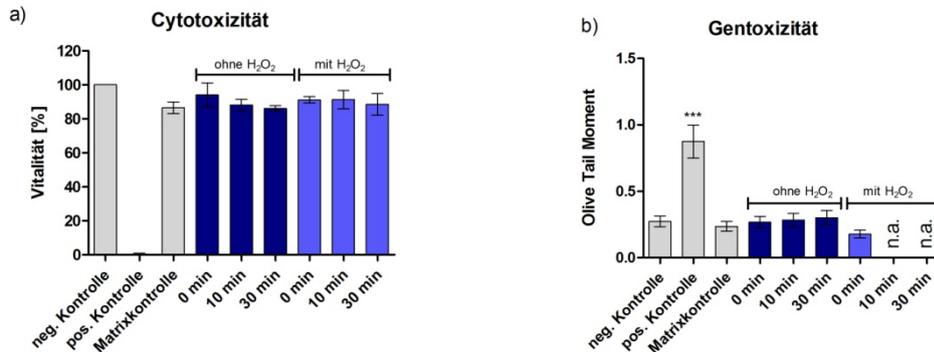
**Abbildung 12: Eliminationsraten von Carbamazepin aus dotiertem Reinstwasser ( $c_0 = 0,05$  mmol/L als Einzelsubstanz bzw.  $c_0 = 100$   $\mu\text{g/L}$  im Substanzmix), Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 0,05$  mmol/L) mittels verschiedener Ozonkonzentrationen.**

Transformationsprodukte, die bei einer UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation von Carbamazepin entstehen können, sind in der Literatur bereits beschrieben [67, 109]. Die Entstehung dieser oder neuer Produkte konnte in den vorhandenen Ausgangskonzentrationen nicht untersucht werden.

#### 4.3.4.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Carbamazepin in Reinstwasser (10  $\mu\text{g/L}$ ) wurde auf cytotoxische und gentoxische Effekte vor (0 min) und nach der UV-Behandlung (10 min und 30 min) sowohl mit als auch ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untersucht. Da für alle Proben die Anzahl lebender Zellen über 85 % liegt keine Cytotoxizität vor (Abbildung 13a). Alle ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben weisen keine Gentoxizität auf. Das gleiche gilt für die unbehandelte Probe (0 min) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei den Zellen, die allerdings gegen die für 10 min und 30 min behandelten Proben exponiert wurden, war die DNA zu stark geschädigt, so dass eine Auswertung nicht mehr möglich war (Abbildung 13b). Da der

Nachweis auf das Vorhandensein von Peroxiden in den nicht auswertbaren Proben negativ ausfiel, können die Effekte auf gebildete Nebenprodukte zurückgeführt werden, welche nur in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet werden.



**Abbildung 13:** a) Keine Cytotoxizität der Proben mit 10 µg/L Carbamazepin, weder vor noch nach der UV-Oxidation mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. b) Die ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben haben kein gentoxisches Potenzial, wohingegen, die Proben mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 10 min und 30 min UV-Behandlung gentoxisch wirken. n.a. = nicht auswertbar.

Cytotoxische Effekte von Carbamazepin sind in einigen Studien beschrieben worden. Der EC<sub>50</sub> liegt dabei sowohl in akuten Tests, sowie in Tests mit *Daphnia magna* bei ca. 13 mg/L [185, 186]. Parolini et al. zeigen steigende cytotoxische Effekte mit steigenden Konzentrationen von Carbamazepin (0,001 – 10 mg/L) in verschiedenen Zellarten [187] und Triebskorn et al. ermittelten einen LOEC (lowest observed effect concentration) von 20 µg/L in verschiedenen Organen [188].

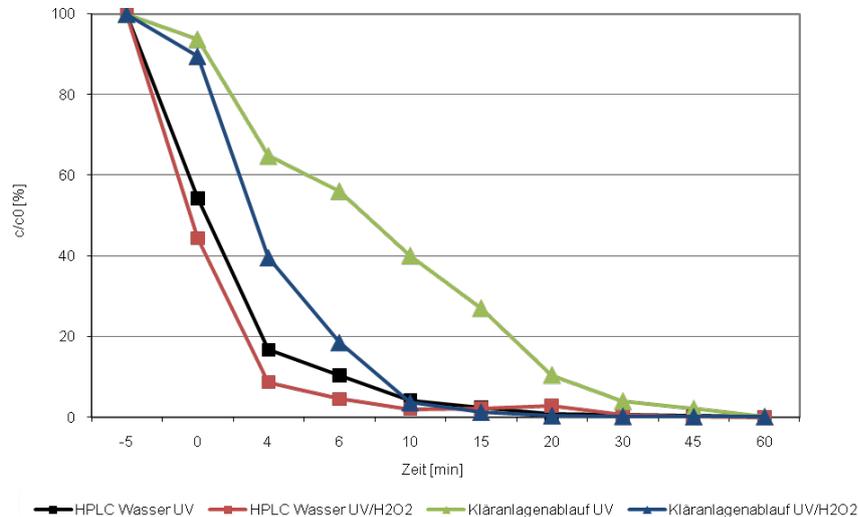
### 4.3.5 Ciprofloxacin

#### 4.3.5.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Ozonierung, UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation wurden im Labormaßstab getestet, um die Abbaueffizienz von Ciprofloxacin zu bewerten. Zum Einen wurde Kläranlagenablauf untersucht, zum Anderen Reinstwasser sowie dotierter Kläranlagenablauf (c<sub>0</sub> = 16,5 mg/L).

Für die Ozonierung mit 10 mg/L wurde in allen Versuchen ein Substanzabbau von 80 ± 4 % erreicht. Mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation konnte im Labormaßstab sowohl für dotiertes Reinstwasser als auch für Kläranlagenablauf und dotierten Kläranlagenablauf ein vollständiger Abbau bei einer Behandlungsdauer von 15-45 Minuten bei einer

Lampenleistung von 15 W erreicht werden (Abbildung 14). Wenige zusätzliche Wasserinhaltsstoffe und eine Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkten einen beschleunigten Abbau des Ciprofloxacin.



**Abbildung 14: Laborversuche zum Abbau von Ciprofloxacin mittels UV und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus dotierten HPLC Wasser und Kläranlagenablauf, c<sub>0</sub> = 16 µg/L.**

Die Elimination der antibakteriellen Aktivität gegenüber *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus coagulans* ging bei allen Versuchen mit dem Substanzabbau einher. Dies zeigt, dass keine großen Mengen an stabilen, antibakteriell aktiven Transformationsprodukte im Versuchsverlauf gebildet wurden.

Insgesamt konnten 22 Transformationsprodukte in den untersuchten AOPs gemessen werden. Von diesen waren einige bereits bekannt [117, 118, 124-126, 189, 190]. Andere Transformationsprodukte wurden im Rahmen dieser Studie erstmals nachgewiesen ([M] = 139, 235, 279, 337 und 377).

Für die Übertragung auf den Pilotmaßstab ist davon auszugehen, dass eine höhere Lampenleistung den Substanzabbau beschleunigt, wie dies auch für das strukturell ähnliche Antibakterium Ofloxacin gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.3.11).

Bei den Fluorchinolonen ist es aufgrund ihres strukturellen Aufbaus und vorhergehender Studien möglich, dass sie über ein hohes mutagenes und genotoxisches Potenzial verfügen können [191].

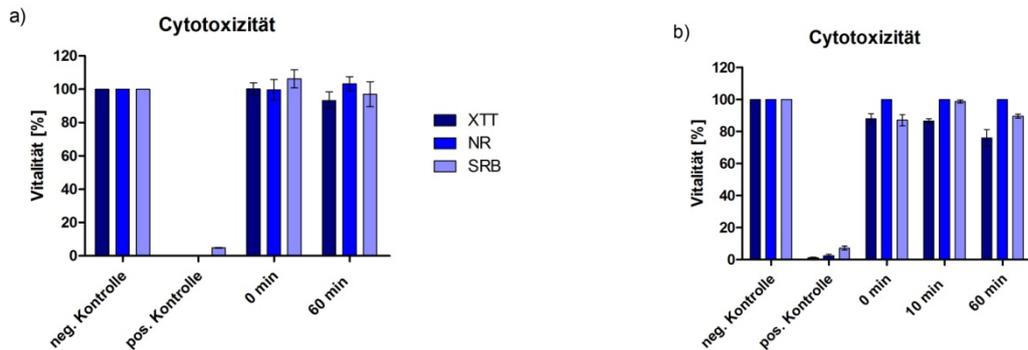
#### 4.3.5.2 *Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen*

Die Untersuchungen zur Toxizität von Ciprofloxacin vor und nach der oxidativen Behandlung sind von großem Interesse, da zuvor bereits toxische Effekte für Ciprofloxacin nachgewiesen werden konnten. Gürbay et al. konnten an HeLa Zellen eine durch Ciprofloxacin induzierte Apoptose bei einer Konzentration von 100 mg/L und einer Exposition von 24 h nachweisen. Cytotoxische Effekte konnten ab einer Konzentration von 20 mg/L detektiert werden [192]. Bakteriologische Tests ergaben eine einsetzende Gentoxizität ab einer Konzentration von 0,2 µg/L [193]. Der *V. fischeri* Biolumineszenztest hingegen ergab einen EC<sub>50</sub> Wert von > 5,9 mg/L [194].

Die Toxizität von Ciprofloxacin wurde hier in Reinstwasser und in Kläranlagenablauf sowie jeweils vor und nach der Ozonierung und der UV Oxidation untersucht. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in einer Veröffentlichung zusammengefasst und zur Publikation eingereicht [184, 195].

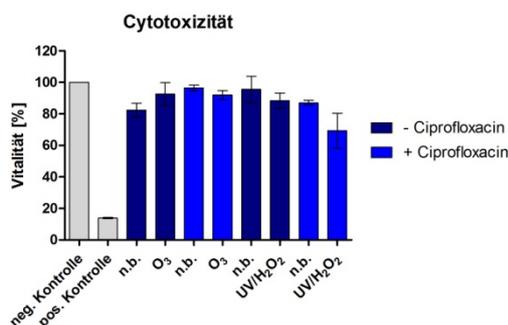
Für die Ozonierung wurden Proben mit 1,4 mg/L Ciprofloxacin eingesetzt und für die UV Oxidation Proben mit 1,7 mg/L Ciprofloxacin. Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde hier der PAN I MultiTox Test durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass keine der Proben des Kläranlagenablaufes weder vor noch nach der Behandlung cytotoxische Effekte auslöst (Abbildung 15a und b). Auch sind keine Unterschiede zwischen der Ozonierung (Abbildung 15a) sowie der UV Oxidation (Abbildung 15b) zu erkennen.



**Abbildung 15: Cytotoxizität von Ciprofloxacin in Kläranlagenablauf. a) Keine cytotoxischen Effekte von 1,4 mg/L Ciprofloxacin vor und nach der Ozonierung. b) Keine Cytotoxizität von 1,7 mg/L Ciprofloxacin vor und nach der UV Oxidation.**

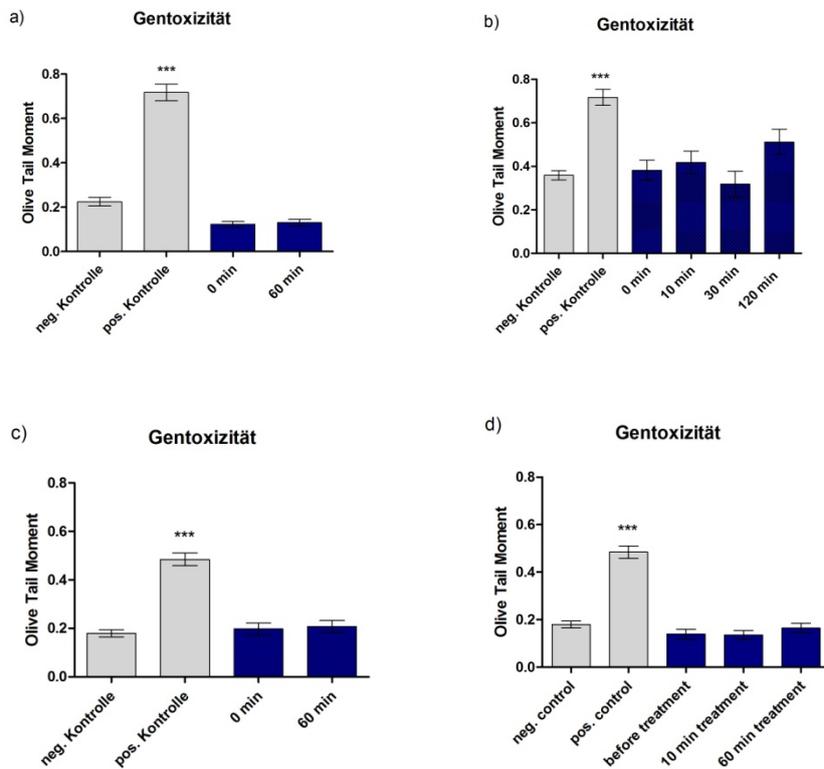
Die gleichen Konzentrationen und Oxidationsmethoden wurden ebenfalls für Reinstwasser an Hand des MTT Tests untersucht. Auch hier sind bei keiner Probe, weder vor noch nach der oxidativen Behandlung cytotoxische Effekte aufgetreten (Abbildung 16). Bei der mit UV behandelten und Ciprofloxacin enthaltenden Probe verringert sich die Vitalität zwar auf 69 %, allerdings ist die Standardabweichung sehr hoch, so dass hier keine relevante Schädigung vorliegt.



**Abbildung 16: Reinstwasser mit ( $c_0$  Ozonierung = 1,4 mg/L,  $c_0$  UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 0,1 mg/L) und ohne Ciprofloxacin. Keine cytotoxischen Effekte vor und nach der Ozonierung oder UV Oxidation.**

Die Ergebnisse des Alkaline Comet Assay von ozonierten und UV oxidierten Proben mit 1,4 mg/L (O<sub>3</sub>) und 1,7 mg/L (UV) Ciprofloxacin weisen ebenfalls keine Beeinträchtigung der CHO Zellen auf. Weder vor noch nach der Ozonierung (Abbildung 17a) oder der UV Oxidation (Abbildung 17b) des Reinstwassers ist eine signifikante Erhöhung des Olive Tail Moment zu erkennen. Im Vergleich dazu wurden zusätzlich auch Reinstwasserproben mit

den gleichen Konzentrationen und Oxidationsmethoden untersucht. Auch hier sind bei keiner der Proben DNA schädigenden Eigenschaften detektiert worden.



**Abbildung 17: Gentoxizität von Cirprofloxacin in Reinstwasser (RW) oder Kläranlagenablauf (AW) vor und nach der Ozonierung (1,4 mg/L Cirprofloxacin) oder UV Oxidation (0,1 mg/L Cirprofloxacin). a) Ozonierung in RW. b) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation in RW. c) Ozonierung von AW. d) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation von AW.**

Auch war ebenfalls kein Unterschied zwischen Ozonierung (Abbildung 17c) und UV Oxidation (Abbildung 17d) zu erkennen. Demnach sind die identifizierten Oxidationsnebenprodukte nicht toxisch.

Einige der oben gezeigten Proben wurden neben den beiden bereits beschriebenen Tests auch noch mit dem Ames Test auf mutagene Wirkungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass keine der Proben mutagene Effekte auslöst (Tabelle 14), obwohl dies schon in der Literatur beschrieben wurde. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse kann der Einsatz verschiedener Testsysteme und Konzentrationen sein. Die in der Literatur getesteten Konzentrationen liegen dabei meist um ein Vielfaches höher als die hier eingesetzten Konzentrationen. Hartmann et al. berichten, dass die untersuchten Krankenhausabwässer, die Cirprofloxacin enthielten, in V79 Zellen zu Chromosomenabberationen führen. Allerdings waren die gleichen Proben im Ames und im UmuC Test negativ (mit einem LEOC (Lowest

Observed Effect Concentration) von 5,2 µg/L im UmuC Test) [196]. Studien anderer Gruppen zu Fluorchinolonen im allgemeinen und speziell Ciprofloxacin zeigten allerdings auch, dass diese Gruppe der Antibiotika keine mutagenen Wirkungen im Ames Test an den Salmonella typhimurium Stämmen TA98 und TA100 besitzen. Auch wurde bereits durch Prival et al. gezeigt, dass Substanzen, die beim Einsatz des TA1535 S. typhimurium Stammes (UmuC) eine mutagene Wirkung zeigen im Ames Test mit dem Stamm TA100 nicht unbedingt auch mutagen sein müssen [197].

**Tabelle 14: Ergebnisse des Ames Tests mit 1,4 µg/L Ciprofloxacin in Reinstwasser vor und nach der UV Oxidation. Dargestellt ist der Mittelwert der positiven Wells.**

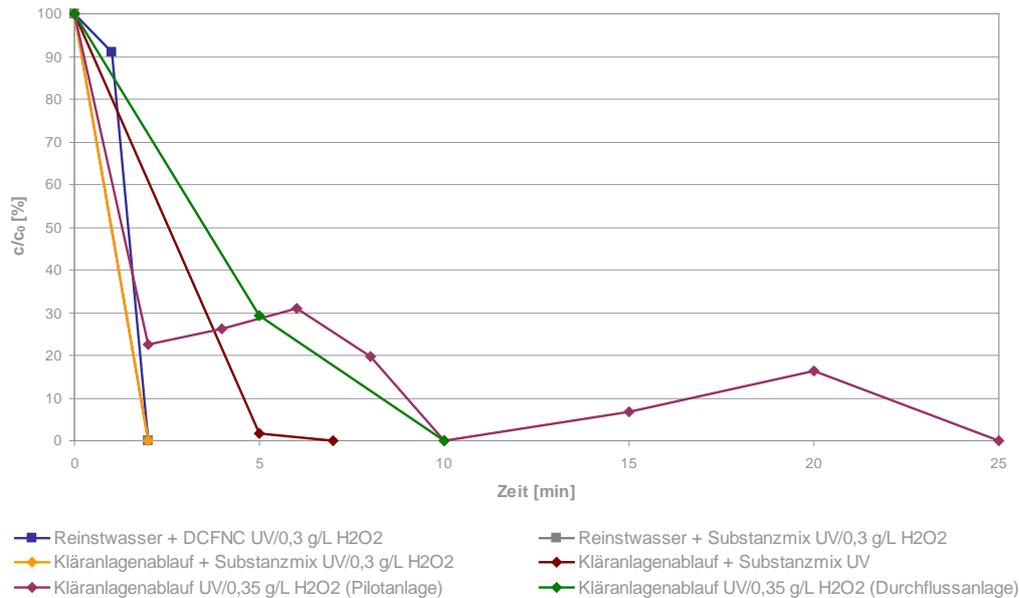
	<b>Bakterienstamm</b>			
	TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 -S9	TA100 +S9
<b>Neg. Kontrolle</b>	1	1	2,33	1,83
<b>0 min</b>	0	0	0	0
<b>10 min</b>	0	0	0	0
<b>30 min</b>	1,33	1	0	0,33
<b>120 min</b>	0,67	0,67	2,67	0,67
<b>Pos. Kontrolle</b>	29,33	48	29,67	18,67

#### 4.3.6 Diclofenac

##### 4.3.6.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Der Abbau von Diclofenac wurde sowohl in Reinstwasser als auch in Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) untersucht. In Abbildung 18 sind Abbaukurven von Diclofenac dargestellt. Die Substanz erwies sich als leicht abbaubar und konnte sowohl im Labor- und Pilotmaßstab als auch mit der Durchflussanlage vollständig eliminiert werden. Im Labormaßstab wurde Diclofenac mit UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation innerhalb 2 - 7 min abgebaut werden.

Durch höhere Lampenleistungen verkürzte sich die Abbaurate aus Kläranlagenablauf mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Pilotmaßstab auf 0,03 min/L und in der Durchflussanlage auf 0,003 min/L.

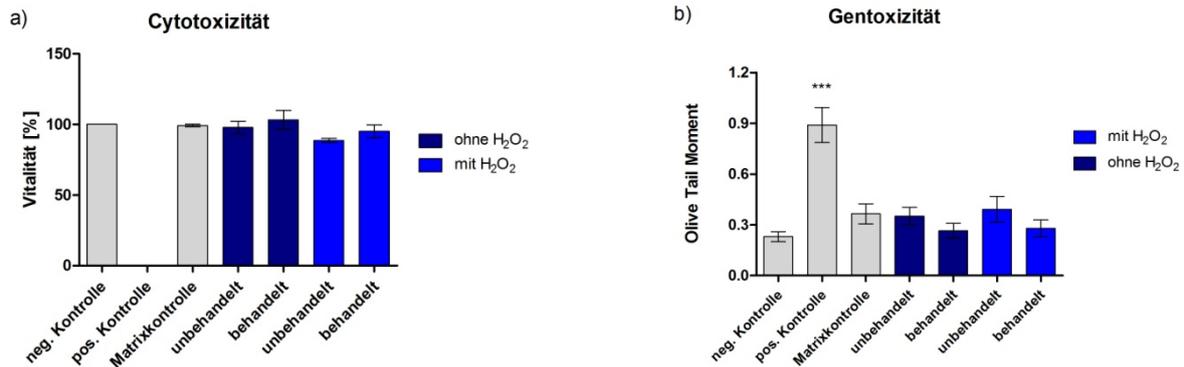


**Abbildung 18: Abbaukurven von Diclofenac in dotiertem Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Labor- und Pilotmaßstab sowie mit der Durchflussanlage.**

Transformationsprodukte konnten in den vorhandenen Ausgangskonzentrationen nicht gefunden werden. Weiterführende Untersuchungen zu Diclofenac wurden in der Literatur und im Vorfeld dieses Forschungsvorhabens auch schon durch IUTA und die Arbeitsgruppe T.C. Schmidt der UDE publiziert [144, 145, 151].

#### 4.3.6.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die auf Cytotoxizität und Genotoxizität untersuchten Reinstwasserproben mit 10 µg/L Diclofenac zeigten in beiden Testsystemen (MTT Test und Comet Assay) keine Effekte. Weder konnte eine Verringerung der Vitalität (Abbildung 19a) noch eine signifikante Erhöhung des Olive Tail Moment nachgewiesen werden (Abbildung 19b). Es konnte auch kein Unterschied zwischen UV behandelten und nicht behandelten sowie den UV behandelten Proben mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die Behandlungsdauer mit UV Bestrahlung betrug bei diesen hier dargestellten Proben 5 min, d. h. vom Zeitpunkt zu dem die UV Lampe eingeschaltet wurde, bis zum Erreichen der maximalen Leistung. Über diesen Zeitpunkt hinaus wurden keine weiteren Proben toxikologisch untersucht.



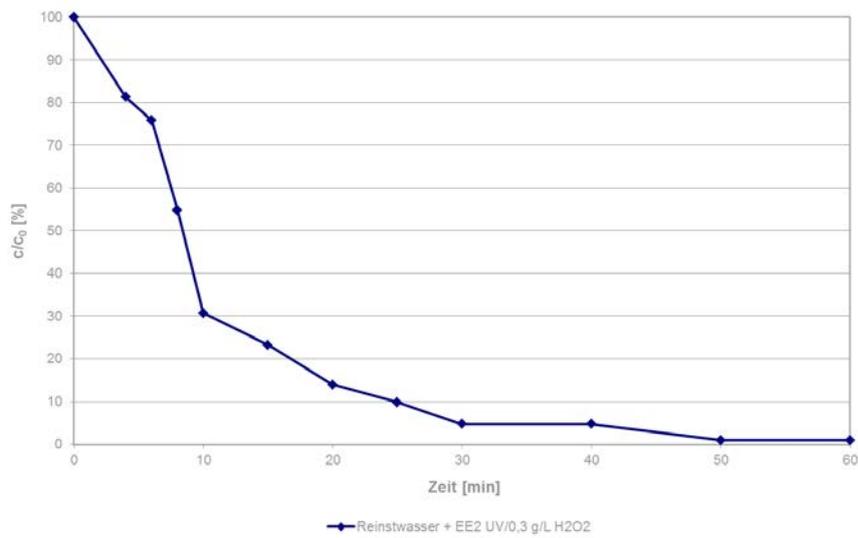
**Abbildung 19: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von 10 µg/L Diclofenac in Reinstwasser vor und nach der UV Oxidation mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In keinem der Tests konnten toxische Effekte nachgewiesen werden.**

Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationen, bei denen toxische Effekte zu erkennen sind abhängig von der eingesetzten Testmethode. EC<sub>50</sub> Werte für *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* und dem Mikrotox Test mit *Vibrio fischeri* liegen bei 224,3 µg/L, 22,7 µg/L und 11,5 µg/L [185, 186], zeigen demnach große Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. Triebkorn et al. und Hallare et al. konnten in ihren Tests LOEC von 1 µg/L [188, 198]. Rizzo et al. konnten zudem zeigen, dass die Toxizität während der Oxidation von Diclofenac mit TiO<sub>2</sub> und Photokatalyse variiert, was auf die Bildung von Nebenprodukten zurückgeführt wird [199].

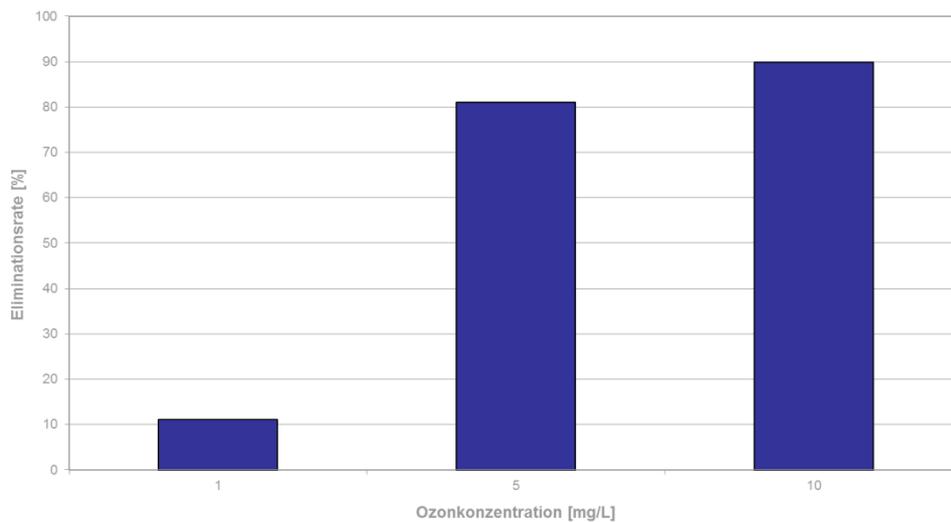
#### 4.3.7 Ethinylestradiol

##### 4.3.7.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Ethinylestradiol konnte mittels UV-Oxidation innerhalb einer Stunde nicht vollständig aus Reinstwasser eliminiert werden. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid ( $c = 0,33 \text{ g/L}$ ) konnte eine vollständige Elimination innerhalb von 30 Minuten erreicht werden (Abbildung 20). Die Ozonung mit verschiedenen Ozonkonzentrationen zeigte eine maximale Elimination der Ursprungssubstanz von ca. 90 % bei einer Ozonkonzentration von 10 mg/L (Abbildung 21).



**Abbildung 20: Abbau von Ethinylestradiol ( $c_0 = 0,05$  mmol/L) aus Reinstwasser mittels UV-Oxidation unter Zugabe von  $H_2O_2$  ( $c = 0,3$  g/L).**



**Abbildung 21: Eliminationsraten von Ethinylestradiol ( $c_0 = 0,05$  mmol/L) in Reinstwasser unter Zugabe verschiedener Ozonkonzentrationen.**

11 mögliche Transformationsprodukte wurden bereits von Huber et. al. und Vieira et. al. beschrieben [68, 168].

#### 4.3.7.2 *Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen*

Auf Grund der bekannten Östrogenität von Ethinylestradiol (EE2) wurden hier der MTT Test mit T47D Zellen sowie der ER Calux durchgeführt. Der MTT Test ergab für keine der getesteten Proben cytotoxische Effekte. Somit kann ein falsch negatives Ergebnis des ER Calux ausgeschlossen werden. Bei den UV behandelten Proben mit 15 mg/L EE2 konnte gezeigt werden, dass EE2 eine östrogene Wirkung aufweist, die jedoch mit zunehmender Behandlungsdauer abnimmt. Die Ozonierung resultierte ebenfalls in einer Reduzierung der östrogenen Aktivität. Allerdings konnte bei beiden Oxidationsverfahren keine komplette Elimination der Östrogenität erreicht werden, so dass eine längere Behandlungszeit oder eine größere Menge an Oxidantien benötigt wird.

**Tabelle 15: Ergebnisse der Cytotoxizitäts- und Östrogenitätsmessung von 0,015 g/L Ethinylestradiol in Reinstwasser vor und nach der Ozonierung oder UV Oxidation.**

Probe	Grad der Cytotoxizität	Östrogenität (ER Calux EEQ) [pM/Well]
Neg. Kontrolle	0	-
Pos. Kontrolle	3	-
Kein UV	0	1,8
10 min UV	0	1,4
60 min UV	0	0,9
Kein Ozon	0	1,6
1 mg/L Ozon	0	1,6
5 mg/L Ozon	0	1,3
10 mg/L Ozon	0	1,1

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen bereits andere publizierte Ergebnisse im Hinblick auf eine Reduzierung der Östrogenität in Kläranlagenabläufen nach einer oxidativen Behandlung [200]. Bisherige Studien konnten außerdem keine mutagenen Effekte bis zu einer Konzentration von 80 µg/L im Chromosomen Aberrations Test an humanen Lymphozyten sowie an Knochenmarkszellen der Maus [201], oder im Ames Test bis zu einer Konzentration von 10 mg/Platte nachweisen [202]. Siddique et al. hingegen konnten genotoxische Effekte von Ethinylestradiol nach einer metabolischen Aktivierung durch S9 sowie der Zugabe von NADP ab einer Konzentration von 5 µM detektieren [203]. Weitere Studien haben sich mit den endokrinen Effekten beschäftigt. Es konnte dabei gezeigt werden,

dass ab einer Konzentration von 0,36 mg/L mit einem EC<sub>50</sub> von 1,5 mg/L Ethinylestradiol die Fortpflanzung beeinträchtigt wird [204] und eine 3-wöchige Exposition von Medaka gegenüber 60 ng/L Ethinylestradiol zu einer Verringerung der Fruchtbarkeit führen [205]. Salierno et al, konnten zusätzlich zeigen, dass 40 ng/L in Fischen zu Veränderungen des Verhaltens, des hormonellen Systems sowie bei den Geschlechtsmerkmalen führen [206].

#### 4.3.8 Galaxolid (HHCB)

##### 4.3.8.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Bei den Ozonierungsexperimenten mit HHCB konnten stabile Oxidationsprodukte von HHCB gefunden werden. In Abbildung 22 wird das Chromatogramm einer unbehandelten und einer ozonierten HHCB Probe gezeigt. Das Chromatogramm der ozonierten HHCB Probe zeigt im Bereich der Retentionszeit von 21 bis 24 Minuten Peaks von stabilen Oxidationsprodukten. Das Hauptoxidationsprodukt bei der Retentionszeit 22,72 Minuten konnte durch den Vergleich mit einem Standard und der Übereinstimmung von Retentionszeit und Massenspektrum eindeutig als HHCB-Lacton identifiziert werden (Strukturformeln siehe Tabelle 16). HHCB-Lacton wurde bereits in der aquatischen Umwelt nachgewiesen. Während der Abwasserbehandlung wird HHCB-Lacton auch im Belebtschlamm durch Biotransformationsprozesse aus HHCB gebildet [17, 20].

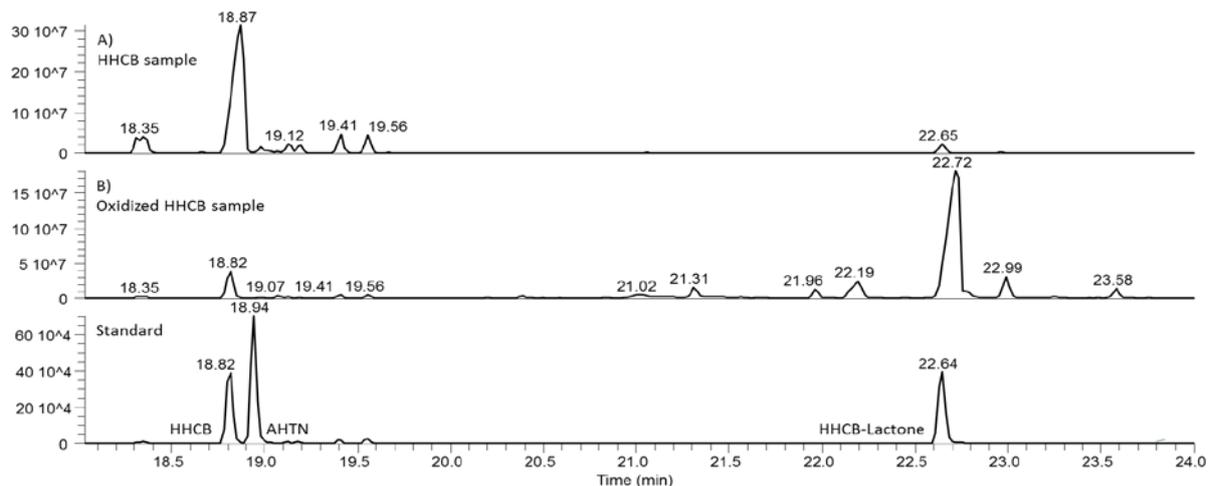
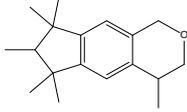
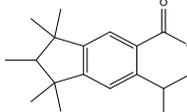
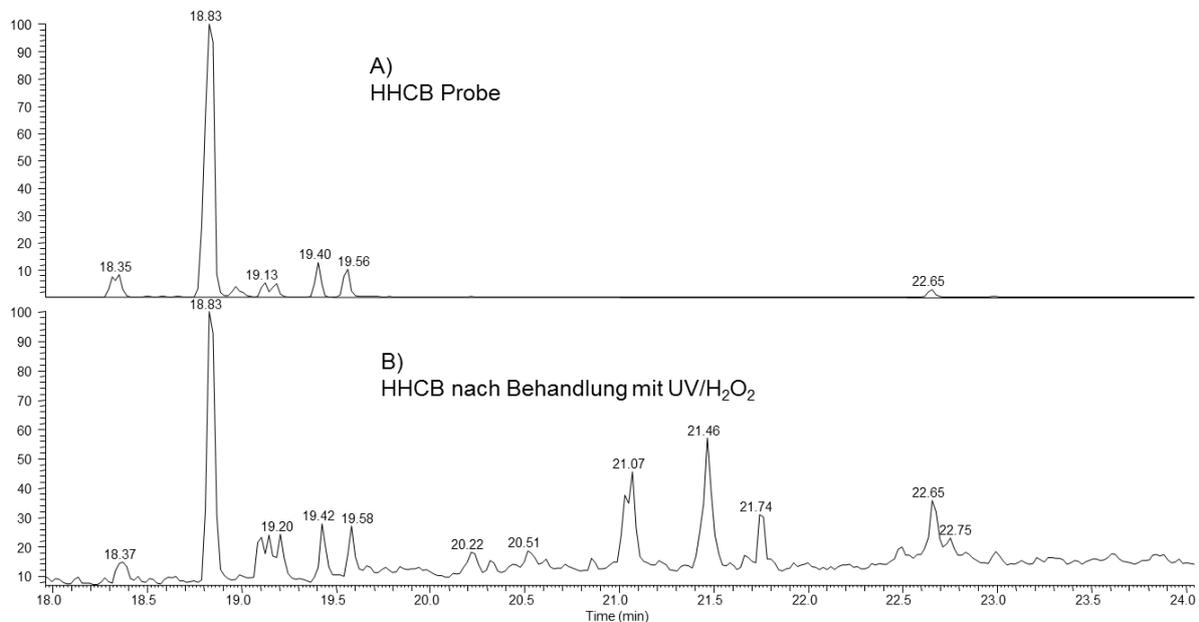


Abbildung 22: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) ozonierten HHCB Probe.

**Tabelle 16: Strukturformeln von HHCB und dem Oxidationsnebenprodukt HHCB-Lacton.**

Name	Akronym	Struktur
Galaxolide	HHCB	
HHCB-Lacton		

Bei der photooxidativen Behandlung von HHCB mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildeten sich ebenfalls stabile Oxidationsprodukte. In Abbildung 23 sind die Chromatogramme von HHCB vor und nach UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung gegenübergestellt.

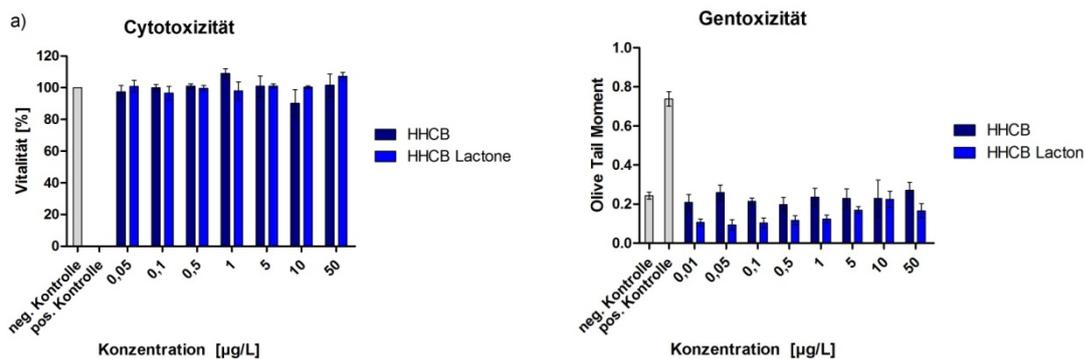


**Abbildung 23: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) mit UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten HHCB Probe.**

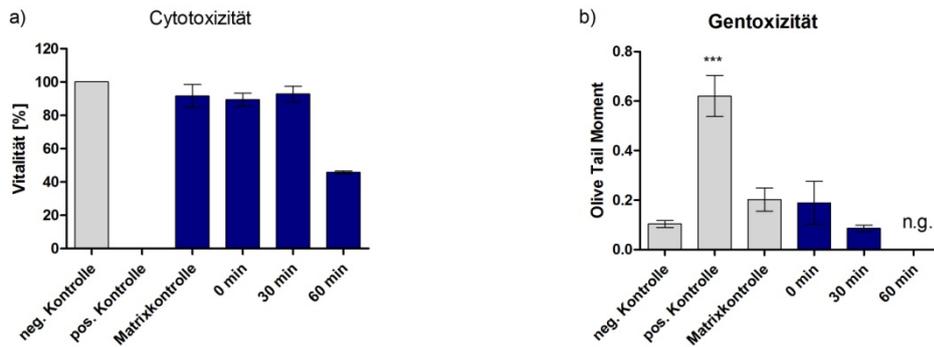
Zur eindeutige Identifizierung der unbekannt Oxidationsprodukte von HHCB müssten weiterführende strukturaufklärende Analysen, wie zum Beispiel hochauflösende Massenspektrometrie oder NMR Spektrometrie, durchgeführt werden. Aus Zeitgründen und der im nachfolgenden Kapitel dargestellten überwiegend negativen toxikologischen Ergebnisse wurde auf diese sehr aufwändigen Untersuchungen verzichtet.

#### 4.3.8.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse des Cytotoxizitätstests einer Konzentrationsreihe von HHCB und HHCB Lacton ergaben keinen Verlust der Vitalität, so dass alle Konzentrationen auf eine mögliche DNA Schädigung untersucht werden konnte (Abbildung 24a). Der Alkaline Comet Assay für nicht cytotoxische Konzentrationen bis zu 50 µg/L wies keine signifikante Erhöhung des Olive Tail Moment im Vergleich zur negativ Kontrolle auf (Abbildung 24b). Für beide Substanzen wurde zusätzlich noch der ER Calux durchgeführt, da eine östrogene Aktivität von HHCB bereits in der Literatur beschrieben wurde. Allerdings lagen die ER Calux EEQ Werte der hier getesteten Konzentrationen (0,01 – 50 µg/L) unter dem Wert der mitgeführten Negativkontrolle. Im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Konzentrationen, die östrogene Effekte auslösen, sind die hier eingesetzten Konzentrationen geringer. Die ersten in der Literatur beschriebenen Effekte treten ab einer Konzentration von 2,58 mg/L auf [207]. Schreurs et al. konnten auch zeigen, dass HHCB je nach Zelltyp agonistisch oder antagonistisch auf die Östrogenrezeptoren wirkt [208].



**Abbildung 24: Keine cytotoxischen (a) und gentoxischen Effekte (b) von HHCB und HHCB Lacton im MTT Test und Alkaline Comet Assay bis zu einer Konzentration von 50 µg/L.**



**Abbildung 25: a) Stark cytotoxische Effekte der 60 min UV-behandelten Probe, keine Effekte der unbehandelten und der für 30 min behandelten Probe. b) Keine gentoxischen Effekte vor der Behandlung und nach 30 min. n.g. = nicht getestet.**

Des Weiteren sind Proben mit 0,1 mg/L in Reinstwasser vor und nach der UV Oxidation (15 W) untersucht worden. Hier ist zu erkennen, dass weder die Matrixkontrolle, noch die unbehandelte und die für 30 min behandelte Probe cytotoxisch Effekte aufweisen, allerdings ist eine Verringerung der Vitalität um 50 % bei der für 60 min mit UV behandelten Probe zu erkennen (Abbildung 25a). Diese Probe wird somit als stark cytotoxisch eingestuft, da der Test auf Restperoxide negativ ausfiel, und die Effekte nicht daher kommen können, sondern von gebildeten Nebenprodukten stammen. Der Alkaline Comet Assay wurde dann mit den nicht cytotoxischen Proben durchgeführt (Matrixkontrolle, 0 min und 30 min), und auch hier waren keine Effekte zu erkennen (Abbildung 25b), somit liegt kein gentoxisches Potenzial vor. Api et al. beschrieben, dass HHCB in verschiedenen Tests zum Nachweis der Gentoxizität (*S. typhimurium*/E.coli plate incorporation assay, UDS test, in vivo mouse micronucleus assay) keine Schädigung hervorruft [209]. Allerdings liegen die in diesen Studien eingesetzten Konzentrationen weit über den im Wasser üblicherweise detektieren Mengen.

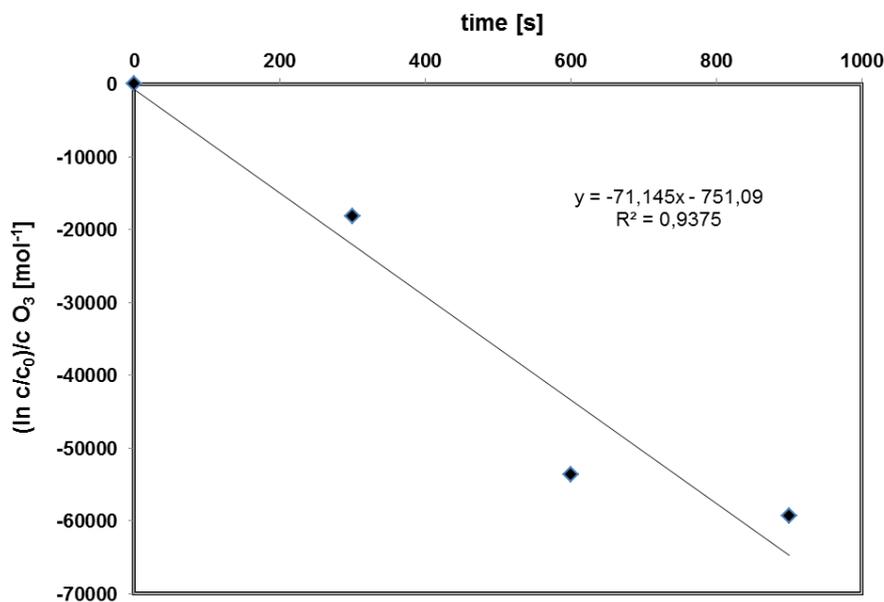
#### 4.3.9 Irgarol 1051

##### 4.3.9.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Die Elimination von Irgarol 1051 wurde sowohl für die Verwendung von Ozon als Oxidationsmittel als auch für die UV-Oxidation mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid untersucht.

Versuche zur Elimination von Irgarol 1051 mit Ozon wurden im Labormaßstab durchgeführt. Bei Zugabe von unterschiedlichen Ozonkonzentrationen zu Irgarol 1051 in Reinstwasser konnten verschiedene Oxidationsprodukte detektiert werden, jedoch war eine eindeutige Identifizierung durch die mangelnde Massenauflösung der eingesetzten GC-MS und HPLC-MS/MS Systeme nicht möglich. Es war jedoch möglich, anhand der gewonnenen Proben im anschließenden Schritt die gebildeten Oxidationsprodukte toxikologisch im Vergleich zu der Ausgangssubstanz zu bewerten.

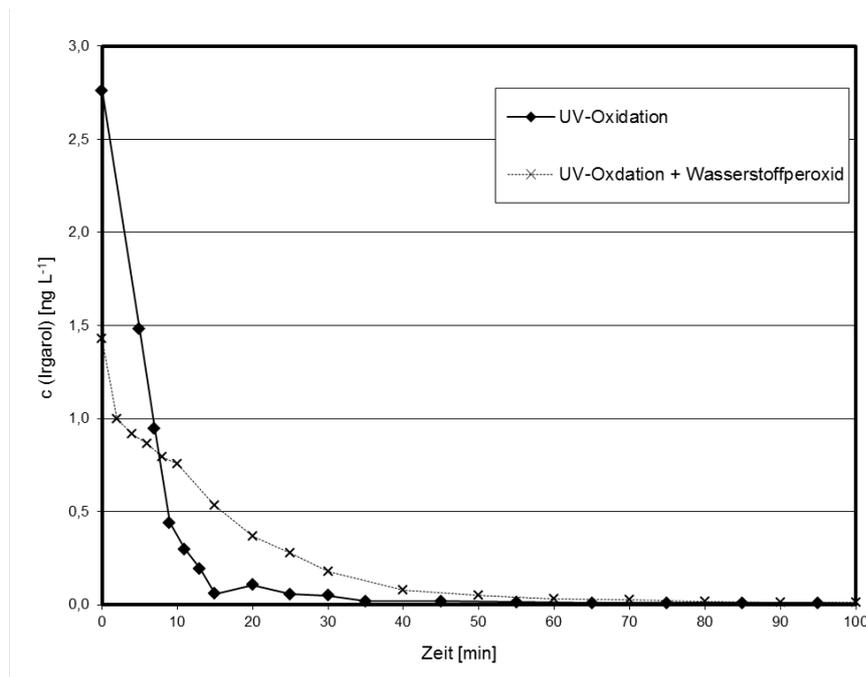
Im anschließenden Versuchen wurde Kläranlagenablauf mit Irgarol 1051 dotiert und die Abbaukinetik bei der Elimination bestimmt (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Abbaukinetik von Irgarol 1051 ( $c_0 = 200 \mu\text{g/mL}$ ) in Kläranlagenablauf in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration.**

Im oxidierten Kläranlagenablauf war es jedoch nicht möglich, die zuvor in Versuchen mit Reinstwasser detektierten Oxidationsprodukte wiederzufinden. Dies muss jedoch nicht zu dem Schluss führen, dass diese nicht gebildet werden, sondern kann auch auf störende Matrixeinflüsse bei Extraktion und Messung zurückzuführen sein.

Versuche zur UV-Oxidation wurden im Labormaßstab in Reinstwasser durchgeführt. Dabei wurde die Elimination von Irgarol 1051 sowohl mit als auch ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid untersucht. In Abbildung 27 ist der zeitliche Ablauf der Elimination dargestellt.

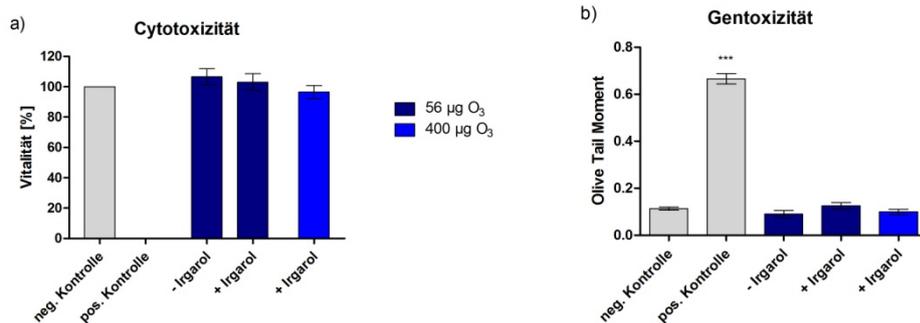


**Abbildung 27: Zeitlicher Ablauf der Oxidation von Irgarol 1051 bei der UV-Oxidation mit und ohne Wasserstoffperoxidzugabe.**

Neben den Abbauversuchen wurden ebenfalls Screening-Messungen durchgeführt, um eventuelle Oxidationsprodukte nachweisen zu können. Die bei diesen Messungen detektierten Substanzen konnten jedoch nicht strukturell identifiziert werden.

#### 4.3.9.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Der Nachweis einer möglichen Cytotoxizität von Irgarol fiel im MTT Test negativ aus. Irgarol in Reinstwasser mit einer Konzentration von 0,75 mg/L war weder vor noch nach der Ozonierung cytotoxisch (Abbildung 28a). Es konnten zudem keine Unterschiede zwischen den zwei getesteten Ozonkonzentrationen detektiert werden. Tests zur Gentoxizität von 0,75 mg/L Irgarol ergaben weder vor noch nach der Ozonierung eine Erhöhung des DNA schädigenden Potenzials. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Toxizität beim Einsatz von 140 und 1000 µg O<sub>3</sub>/L beobachtet werden (Abbildung 28b).



**Abbildung 28: Keine cytotoxischen (a) und gentoxischen (b) Effekte von 0,75 mg/L Irgarol vor und nach der Ozonierung mit 140 und 1000 µg Ozon je Liter.**

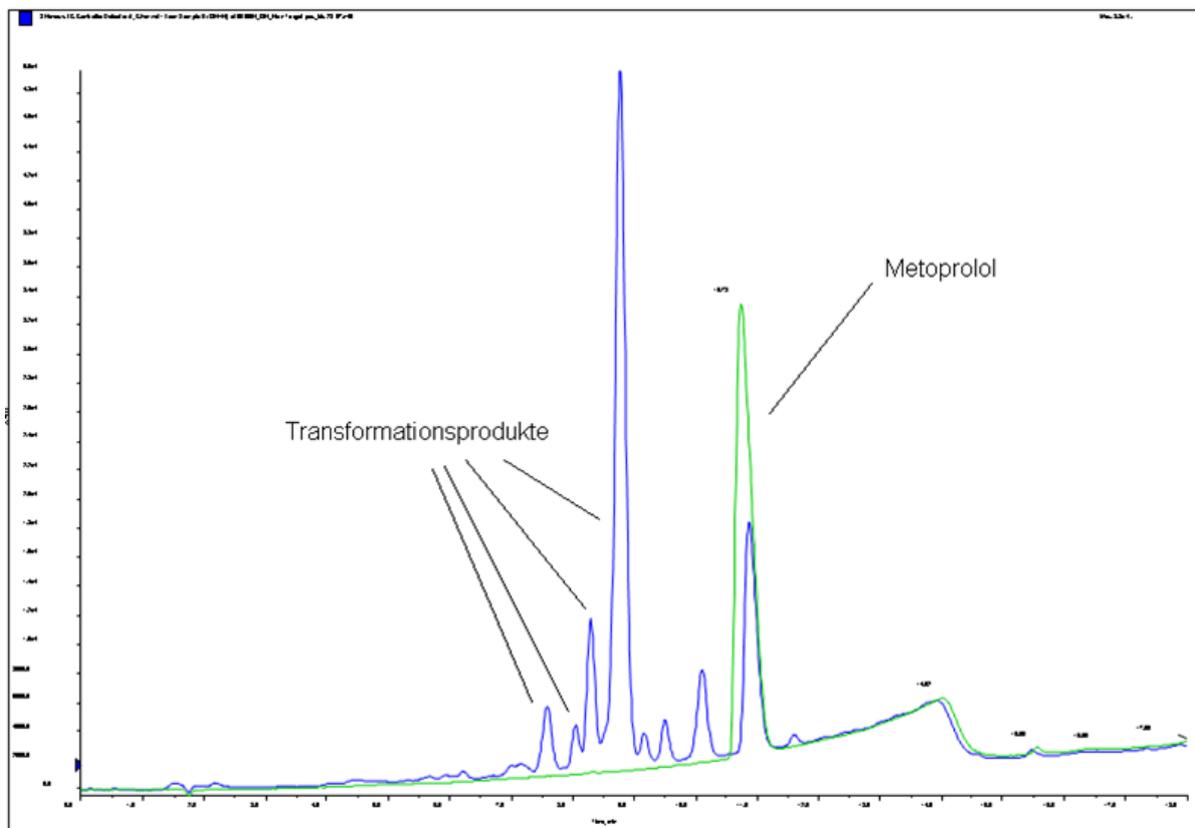
Einige Studien haben sich bereits umfassend mit der Wirkung von Irgarol auf aquatische Organismen beschäftigt. EC<sub>50</sub> Werte variieren dabei, wie auch schon bei anderen Substanzen je nach Spezies. Mohr et al. führten Mesokosmos Studien mit verschiedenen Makrophyten durch. Nach einer einmaligen Gabe von Irgarol lag der EC<sub>50</sub> zwischen 0,21 und 3,0 µg/L (Durchschnitt aller Spezies 1,38 µg/L) [210]. Eine weitere Studie ermittelte EC<sub>50</sub> Werte zwischen 11 µg/L und 50,8 mg/L auch hier in Abhängigkeit vom Organismus und der Expositionsdauer. Die berechneten LOEC Werte liegen dann zwischen 5 µg/L und 10 mg/L [211]. Okamura et al. führten Studien zur Toxizität von Irgarol sowie dem Abbauprodukt M1 (2-methylthio-4-tert-butylamino-6-amino-s-triazine) an fünf verschiedenen Organismen durch (D. magna, D. duplex, T. platyurus, A. salina). Der Vibrio fischeri Test ergab für beiden Substanzen EC<sub>50</sub> Werte über 50 mg/L, wohingegen sich die Werte für die beiden Substanzen bei allen anderen Organismen teilweise stark unterschieden. Insgesamt liegen die Werte für Irgarol zwischen 5,7 und 40 mg/L und die für M1 zwischen 11 und 40 mg/L [212]. Zusätzlich haben Okamura et al. noch EC<sub>50</sub> Werte von 1,6 µg/L (S. capri), 11 µg/L (L. gibba), 8,1 µg/L (L. minor) und >50 mg/L (L. sativa) beschrieben [213].

### 4.3.10 Metoprolol

#### 4.3.10.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

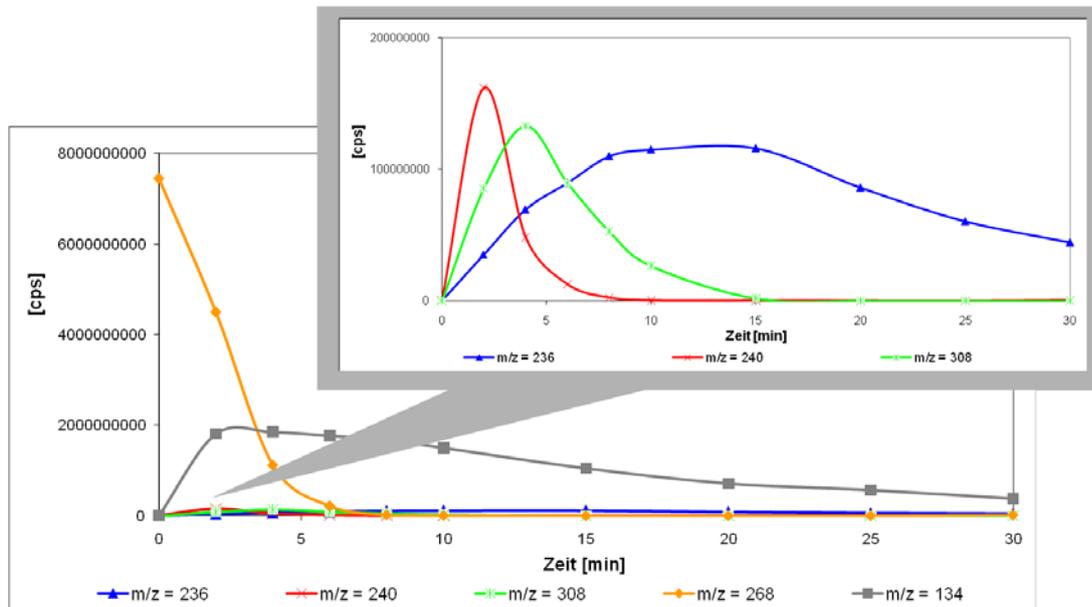
Die Elimination von Metoprolol in verschiedenen Matrices wurde sowohl mittels Ozon, als auch mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untersucht.

Ozonierung und UV-Oxidation von Metoprolol in Reinstwasser führten zu der Bildung von Transformationsprodukten. In Abbildung 29 ist das UV-Chromatogramm ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) einer unbehandelten (grün) und einer mit Ozon behandelten (blau) Metoprolollösung abgebildet.



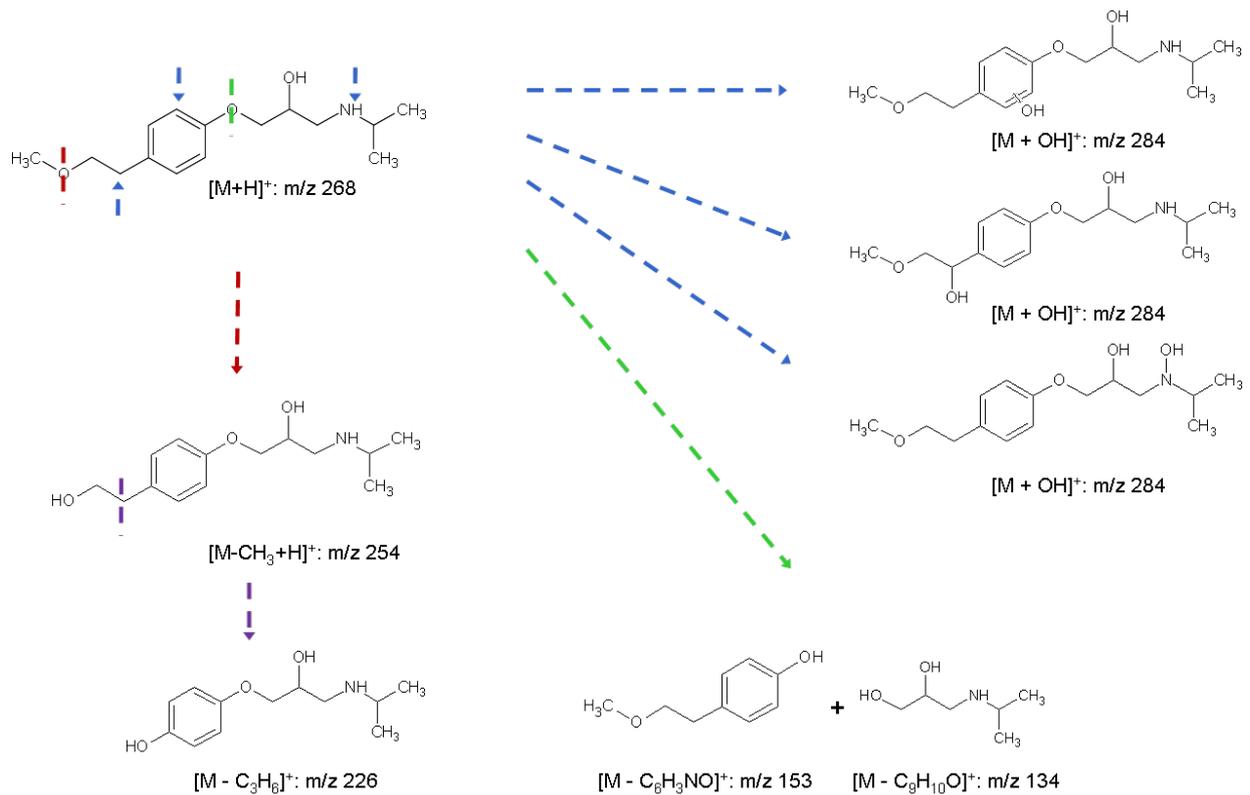
**Abbildung 29: UV-Chromatogramm einer unbehandelten (grün) und einer ozonierten (blau) Metoprolollösung ( $c_0 = 14 \text{ mg/L}$ ).**

Die Bildung und der Abbau der Transformationsprodukte von Metoprolol konnte über den Verlauf einer UV-Oxidation untersucht werden. In Abbildung 30 ist dieser zeitliche Verlauf dargestellt. Die Ursprungssubstanz ist in Gelb dargestellt.



**Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf von Bildung und Abbau der Haupttransformationsprodukte bei der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung von Metoprolol,  $c_0 = 14 \text{ mg/L}$ , HPLC Wasser,  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.3 \text{ g/L}$  im Labormaßstab.**

Anhand der Untersuchungen konnten bereits in der Literatur beschriebene Transformationsprodukte [149-152] bestätigt und zum Teil ( $m/z$  153) auch neue Strukturvorschläge ermittelt werden. In Abbildung 31 ist ein möglicher Abbauweg des Metoprolols angegeben.

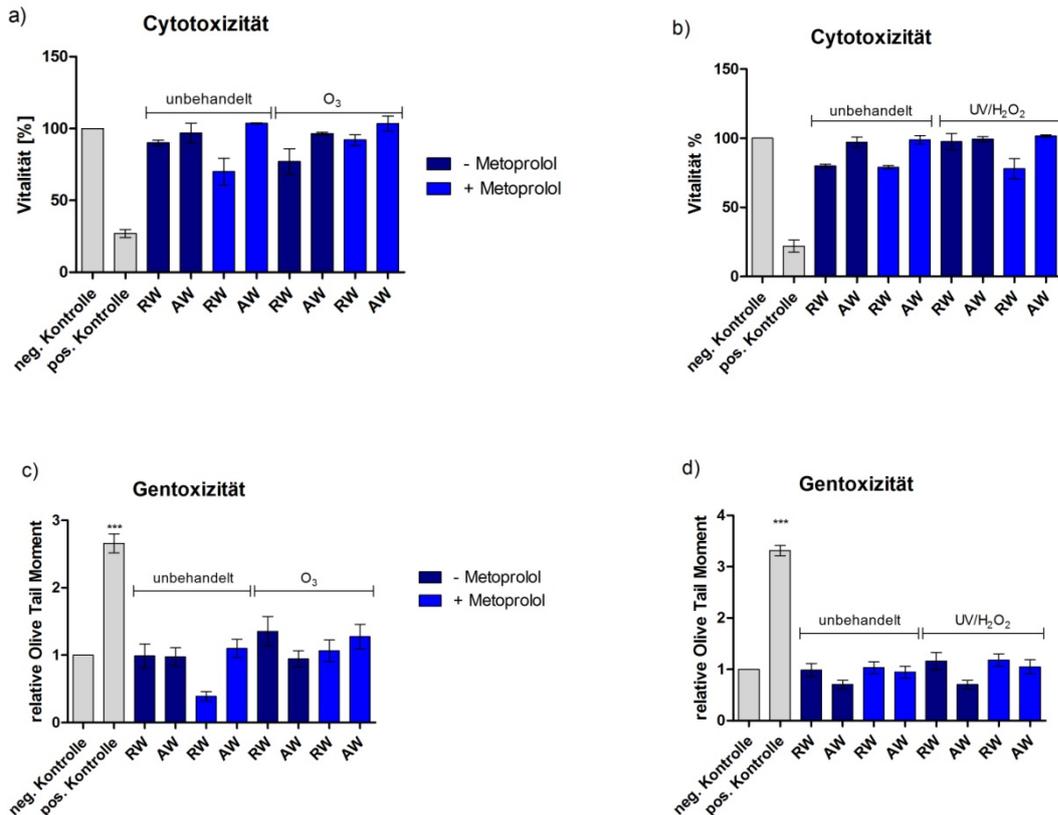


**Abbildung 31: Möglicher Abbauweg der UV-Oxidation von Metoprolol.**

Die identifizierten Abbauprodukte konnten jedoch nicht in der Matrix Kläranlagenablauf nachgewiesen werden.

#### 4.3.10.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse des MTT Tests ergaben keine cytotoxischen Effekte weder des Reinstwassers noch des Kläranlagenablaufes (Abbildung 32a und b). Es ist auch zu erkennen, dass sowohl die Ozonierung von 1,4 mg/L Metoprolol (Abbildung 32a) noch die UV Oxidation von 0,1 mg/L Metoprolol (Abbildung 32b) cytotoxische Effekte zur Folge haben. Somit sind Metoprolol selbst sowie die Nebenprodukte in den getesteten Konzentrationen als nicht cytotoxisch einzustufen. Auch diese Ergebnisse sind zur Veröffentlichung eingereicht [184].



**Abbildung 32: Ergebnisse der Cytotoxizitäts- und Genotoxizitätsuntersuchungen für Metoprolol.** a) Keine cytotoxischen Effekte der Proben mit und ohne Metoprolol vor und nach der (a) Ozonierung (1,4 mg/L) und (b) UV Oxidation (0,1 mg/L). c) Keine Genotoxizität vor und nach der Ozonierung (c) oder UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation (d).

Die Ergebnisse des Comet Assay spiegeln ein ähnliches Ergebnis wieder. Auch hier konnten weder für die ozonierten (Abbildung 32c) noch für die UV oxidierten (Abbildung 32d) Proben signifikant erhöhte Tail Moments im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Für Metoprolol sind allerdings toxische Effekte abhängig von der Konzentration und dem Testorganismus berichtet worden. EC<sub>50</sub> Werte von 63,9 mg/L [214] oder 200 mg/L [194] sowie ein EC<sub>50</sub> von 12 mg/L in *Daphnia magna* [215] und 31 mg/L in *Danio rerio* [216] sind beschrieben worden. Cheong et al. haben zudem noch einen IC<sub>50</sub> von 2,74 mg/L Metoprolol an humanen Zelllinien beschrieben [178].

### 4.3.11 Ofloxacin

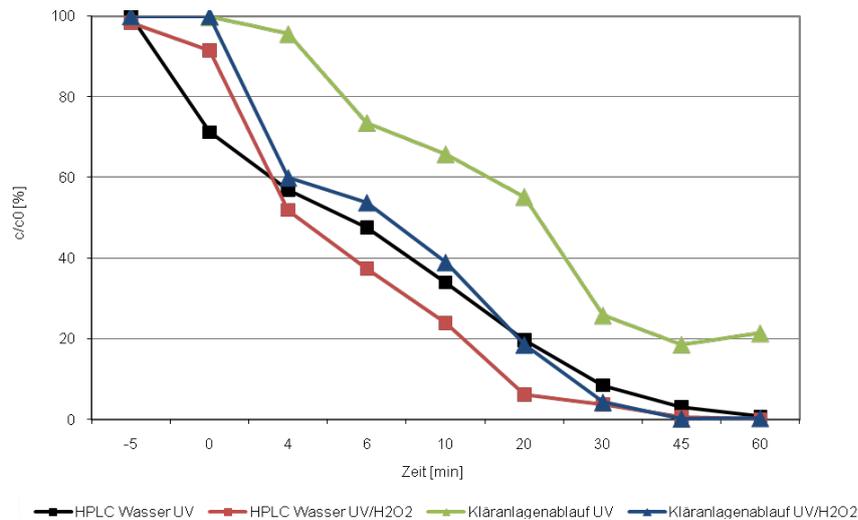
#### 4.3.11.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Die Abbaueffizienz von Ofloxacin wurde in Reinstwasser, Kläranlagenablauf und dotiertem Kläranlagenablauf untersucht.

Im Labormaßstab konnte gezeigt werden dass bei dem Verfahren der Ozonierung mit 10 mg/L bei hohen Konzentrationen ( $c_0 = 18 \text{ mg/L}$ ) in Reinst- und Abwasser ein Abbau von über 90 % erreicht werden kann. Parallel zum Abbau erfolgte eine vollständige Elimination der antibakteriellen Wirkung gegenüber *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus coagulans*.

Das Ergebnis eines nahezu vollständigen Abbaus konnte erfolgreich vom Labor- auf einen 200 L-Pilotmaßstab übertragen werden.

Die Behandlung von Ofloxacin in Reinstwasser mittels UV und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte ebenfalls sowohl im Labor- als auch im Pilotmaßstab eine vollständige Substanzelelimination bewirken (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Laborversuche zum Abbau von Ofloxacin mittels UV und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus dotierten HPLC Wasser und Kläranlagenablauf,  $c_0 = 18 \text{ µg/L}$ .**

Im Pilotmaßstab war die Abbaueffizienz aufgrund der höheren Lampenleistung im Vergleich zum Labormaßstab größer, daher konnte die Behandlungsdauer von ca. 45 min/L auf 0,75 min/L bei einer Ausgangskonzentration von 18 mg/L Ofloxacin verringert werden.

Die Behandlung von hoch dotiertem Kläranlagenablauf mit UV alleine war jedoch nicht ausreichend, um Ofloxacin im Labormaßstab vollständig aus der Lösung zu entfernen. Die Abbaueffizienz lag bei etwa 80 % mit einer verbliebenen antibakteriellen Wirkung gegenüber *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus coagulans*. Dies ist damit zu begründen, dass die zusätzlichen Wasserinhaltsstoffe des Kläranlagenablaufs Hydroxylradikale aus der Lösung abfangen und somit einen vollständigen Abbau verhindern. Diese Matrixeffekte können Reaktionskinetik und Reaktionsordnung beeinflussen [115, 129]. Zudem ist es möglich, dass Transformationsprodukte gebildet werden, die noch antibakterielle Wirksamkeit besitzen.

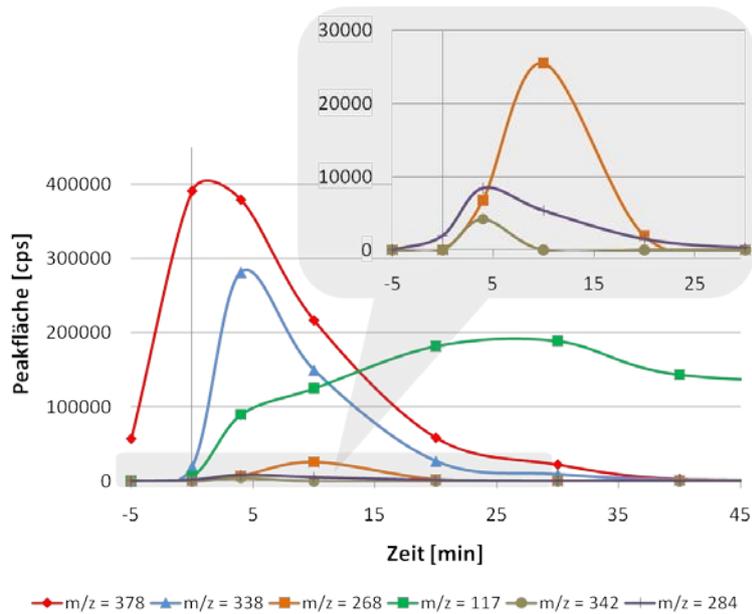
Bei den untersuchten AOP-Verfahren konnten zu 14 Transformationsprodukte nachgewiesen werden, von denen einige bereits für Ofloxacin oder das Strukturisomer Levofloxacin beschrieben sind [115, 118, 190]. Für vier der analysierten Produkte konnten zu den nominalen Massen von 116, 343, 377 und 393 Da mittels hochauflösender TOF-Messungen eindeutige Summenformeln zugeordnet werden (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Summenformeln von Transformationsprodukten von Ofloxacin, deren Masse mittels TOF-Messungen genau ermittelt werden konnte.**

Nominale Masse [Da]	Summenformel
116	$C_5H_{13}N_2O$
343	$C_{18}H_{20}N_3O_4$
377	$C_{18}H_{21}FN_3O_5$
393	$C_{18}H_{21}FN_3O_6$

Zudem wurde der Verlauf der Transformationsprodukte über die Dauer der oxidativen Behandlung untersucht (Abbildung 34). Dabei wurde deutlich, dass Einige direkt zu Beginn der Behandlung entstehen, wie z.B.  $m/z = 378$ . Andere entstehen erst zeitlich nach hinten versetzt wie  $m/z = 117$ . Das deutet darauf hin, dass diese erst aus primären Transformationsprodukten gebildet werden.

Insgesamt ist die Stabilität der Transformationsprodukte begrenzt, sie werden zum größten Teil kurz nach der Bildung wieder abgebaut. Nur das Produkt  $m/z = 117$  kann nicht innerhalb der Behandlungsdauer vollständig abgebaut werden.



**Abbildung 34: Bildung und Abbau der Haupttransmutationsprodukte bei der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung von Ofloxacin, c<sub>0</sub> = 18 mg/L, HPLC Wasser, c(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) = 0.3 g/L, Labormaßstab.**

Wie in Kapitel 4.3.5 bereits ausgeführt wurde für Fluorchinolonen in früheren Studien ein hohes mutagenes und genotoxisches Potenzial nachgewiesen [191].

Anhand der gebildeten Transformationsprodukte konnte für Ofloxacin ein möglicher Abbaumechanismus dargestellt werden [217].

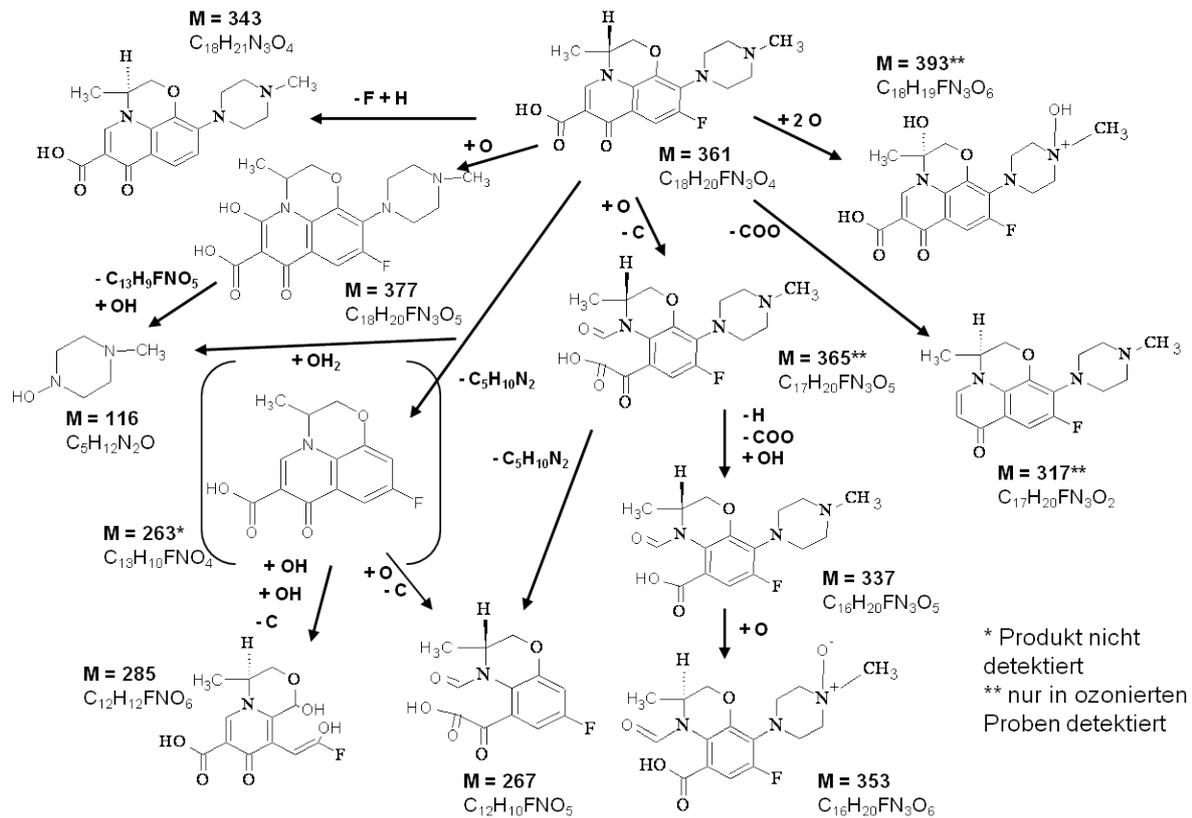
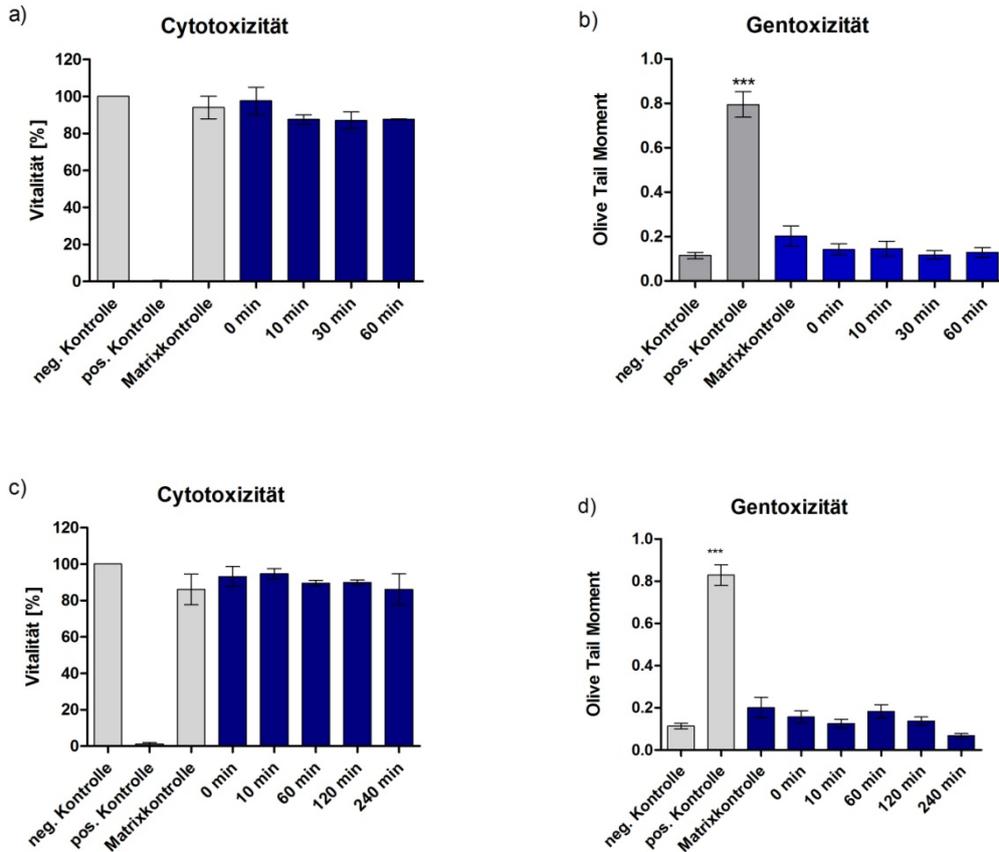


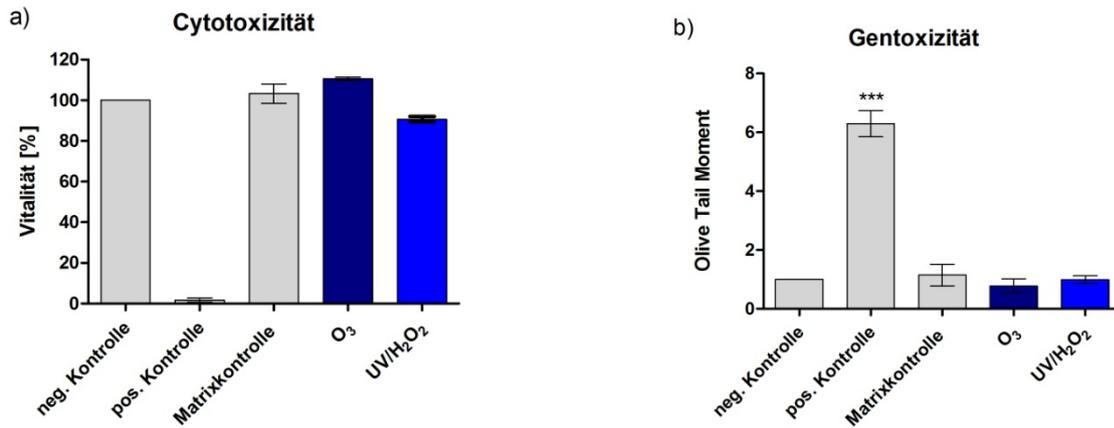
Abbildung 35: Möglicher Abbauweg von Ofloxacin nach Behandlung mit AOP.

#### 4.3.11.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Ofloxacin wurden in einer Konzentration von 0,018 g/L auf ein mögliches cytotoxisches oder gentoxisches Potenzial sowohl vor als auch nach der Ozonierung oder der UV Oxidation getestet. Die Ozonierung führte weder zur Bildung cytotoxischer (Abbildung 36a) noch gentoxischer (Abbildung 36b) Nebenprodukte. Auch Ofloxacin selbst zeigt bei der getesteten Konzentration in keinem der Testsysteme toxische Effekte. Der MTT Test sowie der Alkaline Comet Assay ergaben für die UV-oxidierten Proben das gleiche Bild. Auch hier sind weder vor noch nach der Behandlung cytotoxische (Abbildung 36c) noch gentoxische (Abbildung 36d) Wirkungen zu erkennen.



**Abbildung 36: Cytotoxizität und Genotoxizität von 0,018 g/L Ofloxacin bei Ozon- und UV-Behandlung. Die Ozonierung ergab weder cytotoxische (a) noch genotoxische (b) Effekte. Keine cytotoxischen (c) oder genotoxischen (d) Effekte vor oder nach der UV Oxidation. Kläranlagenablauf mit 0,018 g/L Ofloxacin wurde ebenfalls sowohl vor als auch nach der Ozonierung oder UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation auf ein mögliches toxikologisches Potenzial untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Oxidationsmethoden nicht zur Bildung toxischer Oxidationsnebenprodukte führen. Weder konnten cytotoxische Effekte (Abbildung 37a) noch genotoxische Effekte (Abbildung 37b) nachgewiesen werden.**



**Abbildung 37: Ofloxacin in dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 0,018 \text{ g/L}$ ) vor und nach der Ozonierung oder UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung. a) Weder vor noch nach (60 min) der jeweiligen oxidativen Behandlung liegt eine Cytotoxizität (a) oder eine Gentoxizität (b) vor.**

Daten zur Toxizität von Ofloxacin sind teilweise vorhanden. Trisciuglio konnten die Phototoxizität von Ofloxacin nachweisen [218]. Gentoxische Effekte bis zu Konzentrationen von 1 g/mL konnten nicht nachgewiesen werden [219], hingegen zeigten McQueen et al., dass 400 mg/L zu positiven Ergebnissen im UDS Test führen [220]. In weiteren Studien zeigten verschiedene Tests an unterschiedlichen Zelllinien cytotoxische Eigenschaften von Ofloxacin-Konzentrationen die deutlich über der hier getesteten Konzentration liegen [221-223].

#### 4.3.12 Organophosphate

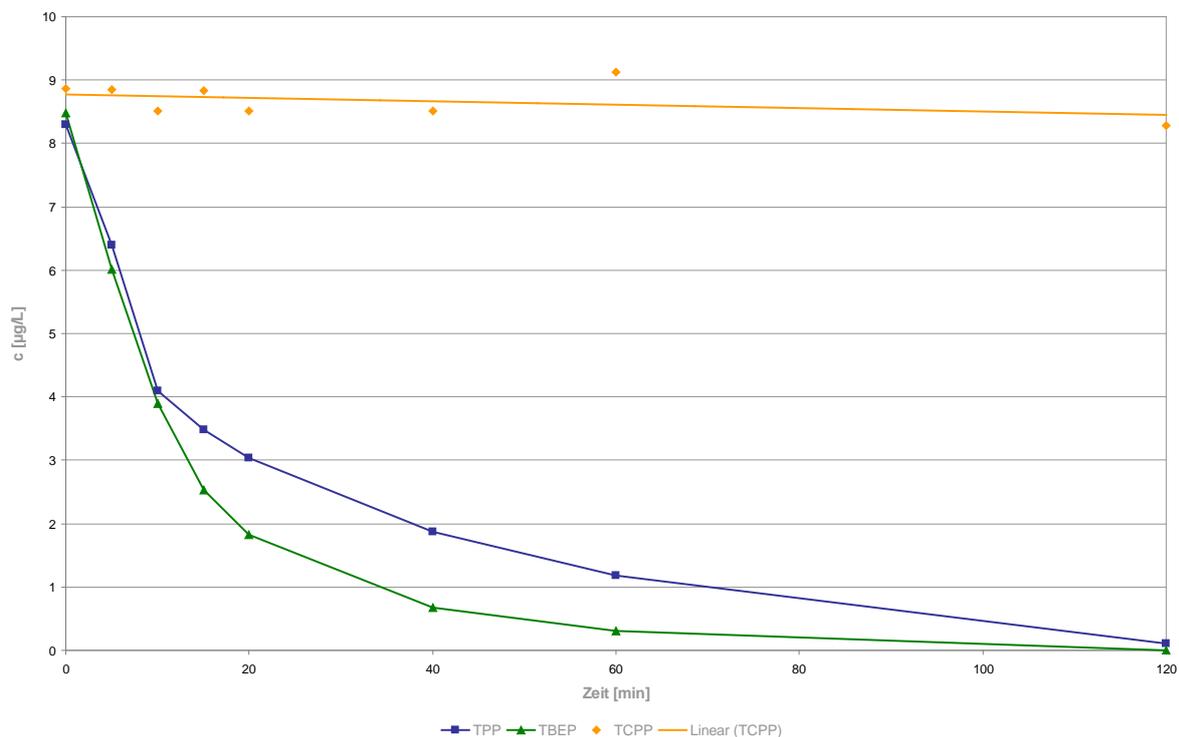
##### 4.3.12.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Die GC-MS-Screening Ergebnisse im Full-Scan-Modus blieben ohne die Detektion von stabilen Oxidationsprodukten. Es sind durch die Ozonbehandlung, wie auch bei der Behandlung mit UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine Oxidationsprodukte der untersuchten Organophosphate entstanden, die mit der gewählten Methode detektiert werden konnten.

In Abbildung 38 ist zu erkennen, dass das chlorierte Organophosphat TCPH über den gesamten Zeitraum von 120 Minuten keine signifikante Veränderung der Konzentration aufwies. TCPH besitzt keine funktionellen Gruppen, welche auf eine hohe Ozonreaktivität hinweisen und lies sich auch nicht durch eine Ozondosis von 5 mg/L abbauen. Pocostales et al. zeigten allerdings, dass ein Abbau von TCPH möglich ist [224]. Die zu erwartenden

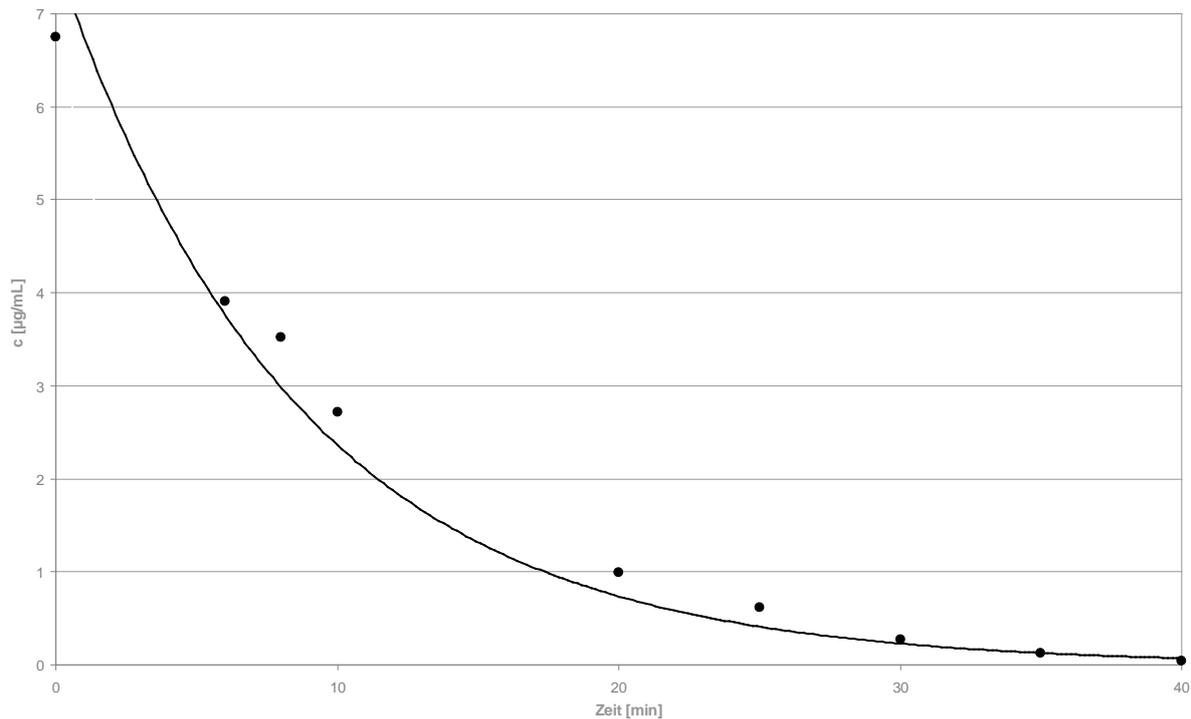
Produkte (Mono- und Dialkylphosphate sowie Alkanole) sind allerdings nur schwer zu detektieren [225].

Für die nicht chlorierten Organophosphate TPP und TBEP ist ersichtlich, dass die Verbindungen innerhalb der ersten 20 Minuten signifikant durch eine konstante Ozondosierung von 5 mg/L abgebaut wurden, wobei der Abbau von TBEP schneller vollzogen wurde als der von TPP. In beiden Fällen ist es nach 120 Minuten zu einem kompletten Abbau der Substanzen gekommen.



**Abbildung 38: Konzentrationsverlauf der Organophosphate TPP, TBEP und TCPP nach kontinuierlicher Ozonierung von 5 mg O<sub>3</sub>/L über 120 Minuten [µg/mL].**

In der Abbildung 39 ist der Konzentrationsverlauf von TPP durch die Behandlung mit UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu sehen. Es wird deutlich, dass im Fall von TPP ein deutlich schnellerer Abbau zu verzeichnen ist als im Vergleich zur Oxidation mit Ozon. Ein signifikanter Abbau findet in den ersten zehn Minuten statt. Nach 40 Minuten ist die Substanz nicht mehr zu detektieren.

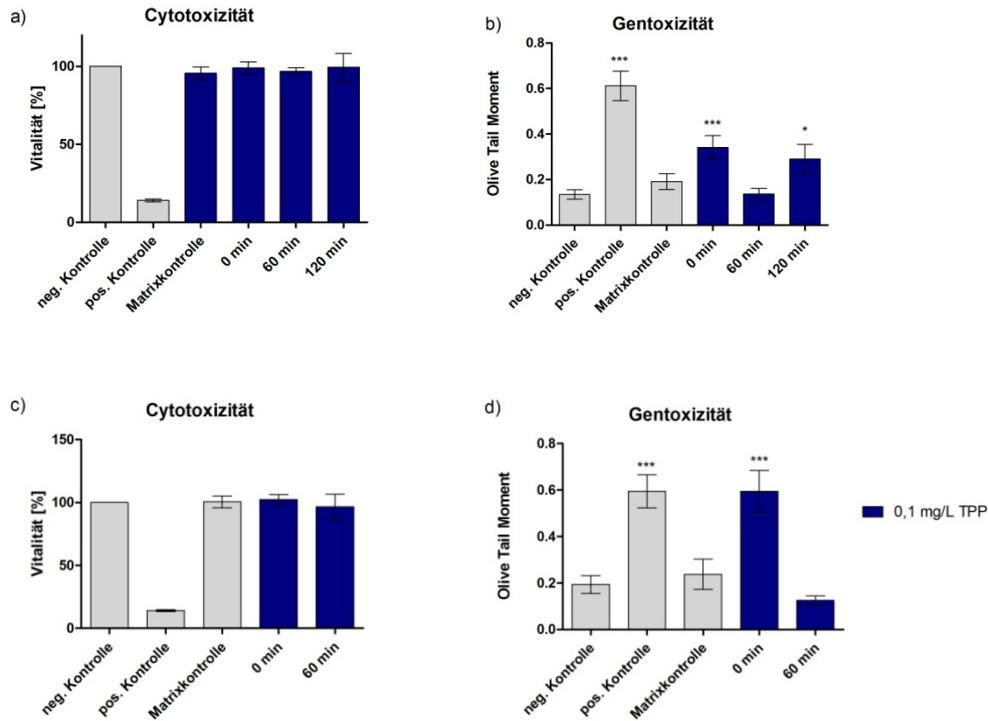


**Abbildung 39: Konzentrationsabnahme von TPP durch Behandlung mit UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Der Abbau des chlorierten Organophosphates TCPP mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erwies sich, wie auch durch Ozonierung, als nicht effektiv. Die TCPP Konzentration zeigte keine signifikante Abnahme (grafisch nicht dargestellt).

#### 4.3.12.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

**TPP:** Der MTT Test für TPP ergab keine Verringerung in der Anzahl lebender Zellen (% Vitalität), somit war keine der Proben cytotoxisch (Abbildung 40a). Hingegen zeigen die Ergebnisse der Gentoxizitätsuntersuchungen, dass 0,1 mg/L TPP in Reinstwasser bereits eine signifikante DNA Schädigung hervorrufen (Zeitpunkt -5 min). Nachdem die UV Lampe ihre volle Leistung erreicht hat (Bezeichnung „0 min“), sowie nach 60 min Bestrahlung sind keine gentoxischen Effekte mehr nachweisbar. Allerdings kommt es nach einer Behandlungsdauer von 120 min erneut zu minimalen DNA Schäden, was auf die Bildung toxischer Nebenprodukte zurückgeführt werden kann (Abbildung 40b).



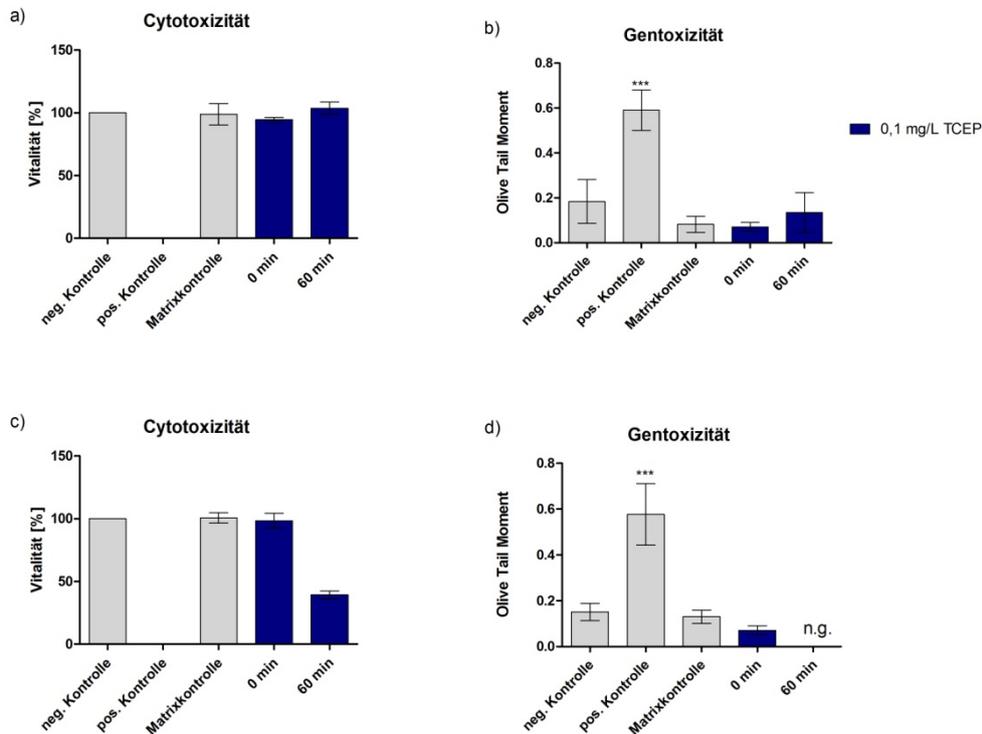
**Abbildung 40: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von TPP ( $c_0 = 0,1 \text{ mg/L}$ ) vor und nach der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung und Ozonierung (c = Cytotoxizität, d = Gentoxizität).**

Bei der Ozonbehandlung ergibt sich ein ähnliches Bild. Weder vor noch nach der Ozonierung sind cytotoxische Effekte erkennbar (Abbildung 40c), wohingegen die Probe mit 0,1 mg/L TPP vor der Ozonierung gentoxische Effekte aufweist, nach 60 min Behandlung allerdings nicht mehr (Abbildung 40d). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung, dass TPP bei einer Konzentration von 0,1 mg/L bereits gentoxisch wirkt, diese Effekte allerdings durch eine entsprechende Oxidation eliminiert werden können.

TCEP: 0,1 mg/L TCEP in Reinstwasser wurden sowohl vor als auch nach der Ozonierung sowie der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung auf mögliche cytotoxische und gentoxische Effekte untersucht.

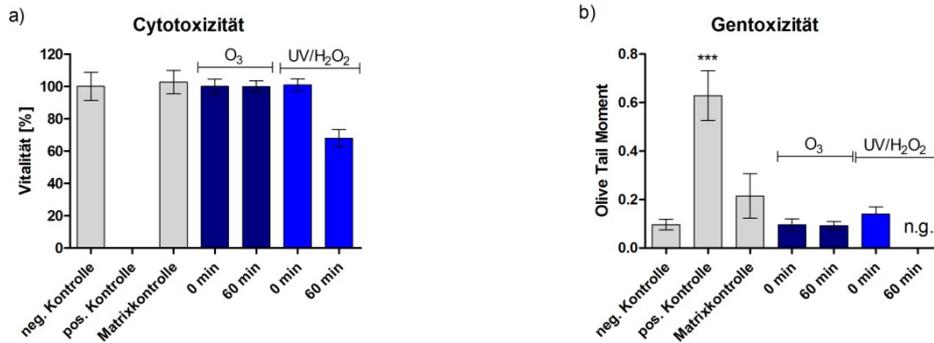
Die Ergebnisse der Cytotoxizitätsuntersuchung der ozonbehandelten Probe zeigen keinerlei Effekte (Abbildung 41a) wohingegen die Probe nach 60 min UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung als stark cytotoxisch eingestuft wird (Abbildung 41b). Da die Probe mit 0,1 mg/L TCEP vor der UV Behandlung nicht cytotoxisch ist, deuten die Ergebnisse auf die Bildung toxischer Nebenprodukte hin. Der Test auf Gentoxizität hingegen ergab, dass weder die Ozonierung

(Abbildung 41c) noch die UV-Oxidation (Abbildung 41d) zu einer DNA Schädigung führt. Auch hier ist die Probe vor der entsprechenden Oxidation nicht gentoxisch.



**Abbildung 41: Toxizitätsuntersuchungen von TCEP ( $c_0 = 0,1$  mg/L). a) Keine cytotoxischen oder gentoxischen Effekte (b) vor und nach 60 min Ozonierung. c) Keine cytotoxischen Effekte der unbehandelten Probe, aber stark cytotoxische Effekte nach 60 min UV-Oxidation. d) Gentoxische Effekte konnten weder vor noch nach der UV-Oxidation nachgewiesen werden.**

TCPP: 0,1 mg/L TCPP in Reinstwasser erzeugten weder vor noch nach der Ozonierung eine Abnahme der Zellvitalität. Vor der UV Oxidation waren auch keine cytotoxischen Effekte erkennbar, wohingegen nach 60 min UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung die Anzahl vitaler Zellen auf 63 % sank (Abbildung 42a). Diese Abnahme resultiert nicht von verbleibenden Peroxiden, da der Nachweis für diese negativ ausfiel. Dieselben Proben, außer der zuvor als mäßig cytotoxisch eingestuft, wurden ebenfalls auf mögliche gentoxische Eigenschaften untersucht. Auch hier waren bei keiner Probe Effekte im Alkaline Comet Assay zu erkennen (Abbildung 42b).



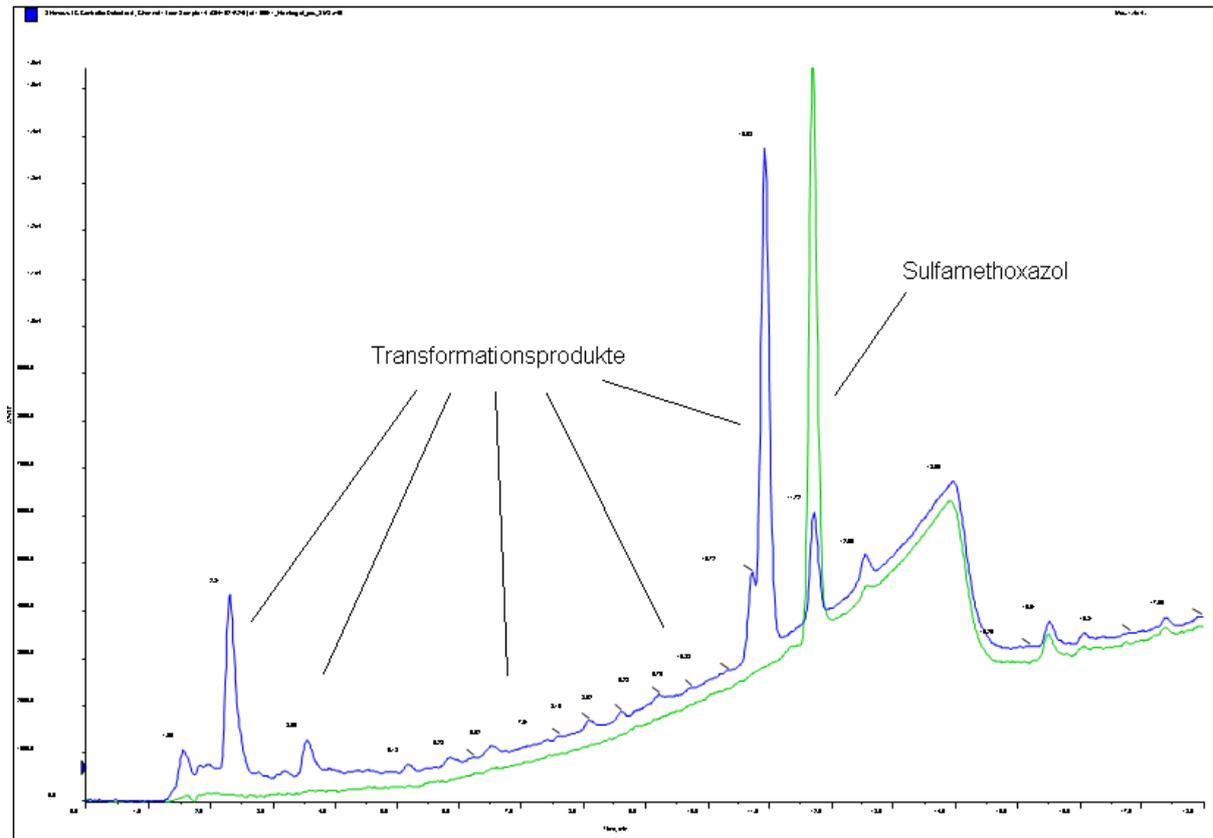
**Abbildung 42: Cytotoxizität (a) und Gentoxizität (b) von TCPP ( $c_0 = 0,1$  mg/L). a) 60 min UV Oxidation führen zu mäßig cytotoxischen Effekten. Ozonierte und nicht die nicht UV Oxidierte Proben haben keine Effekte. b) Keine gentoxischen Effekte der getesteten Proben. n.g. = nicht getestet, da cytotoxisch.**

Untersuchungen zur Toxizität der getesteten Organophosphate sind in der Literatur bisher kaum beschrieben. Föllmann et al. berichten, dass TCEP und TCPP nur in sehr hohen Konzentrationen (1 mM) zu cytotoxischen Effekten gegenüber V79 Zellen führen. Auch konnten sie keine Gentoxizität (bis zu Konzentrationen von 10 mM) im Comet Assay oder östrogene Effekte weder im Ishikawacellassay noch im Recombination Yeast Assay feststellen [226].

#### 4.3.13 Sulfamethoxazol

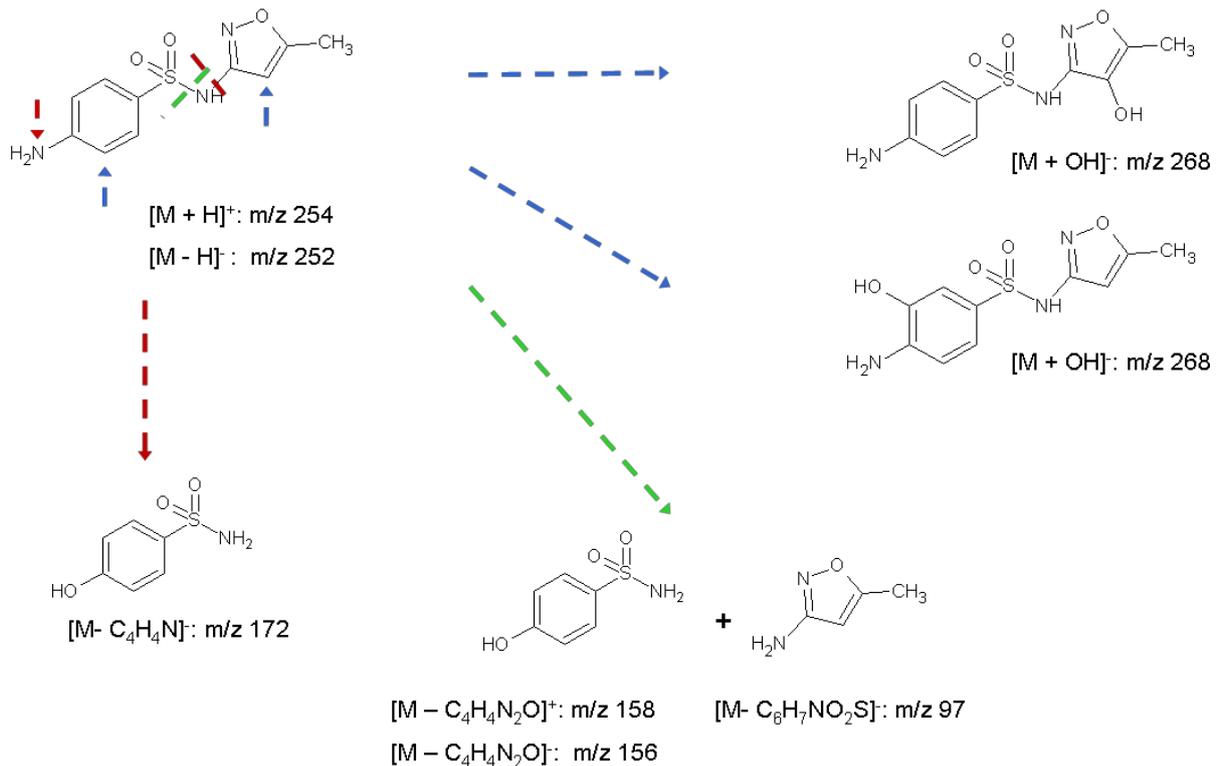
##### 4.3.13.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Auch durch die Oxidation von Sulfamethoxazol-Lösungen wurden Transformationsprodukte gebildet, was durch Abbildung 43 verdeutlicht wird. Dort ist ein UV-Chromatogramm einer unbehandelten Sulfamethoxazol-Lösung (grün) über das Chromatogramm der Behandlung mit 5 mg Ozon pro Liter (blau) abgebildet. Die entstandenen Transformationsprodukte sind deutlich erkennbar.



**Abbildung 43: UV-Chromatogramm einer ozonierten Sulfamethoxazol-Lösung ( $c_0 = 1 \text{ mg/L}$ ) vor (grün) und nach (blau) der Behandlung mit 5 mg Ozon pro Liter.**

Anhand der in der Einheitsauflösung erhaltenen m/z - Verhältnisse konnten Vorschläge über mögliche Strukturen der Transformationsprodukte erstellt werden und mit den aus der Literatur bekannten Strukturen verglichen werden. Ein möglicher Abbauweg für Sulfamethoxazol konnte erstellt werden und ist in Abbildung 44 dargestellt.

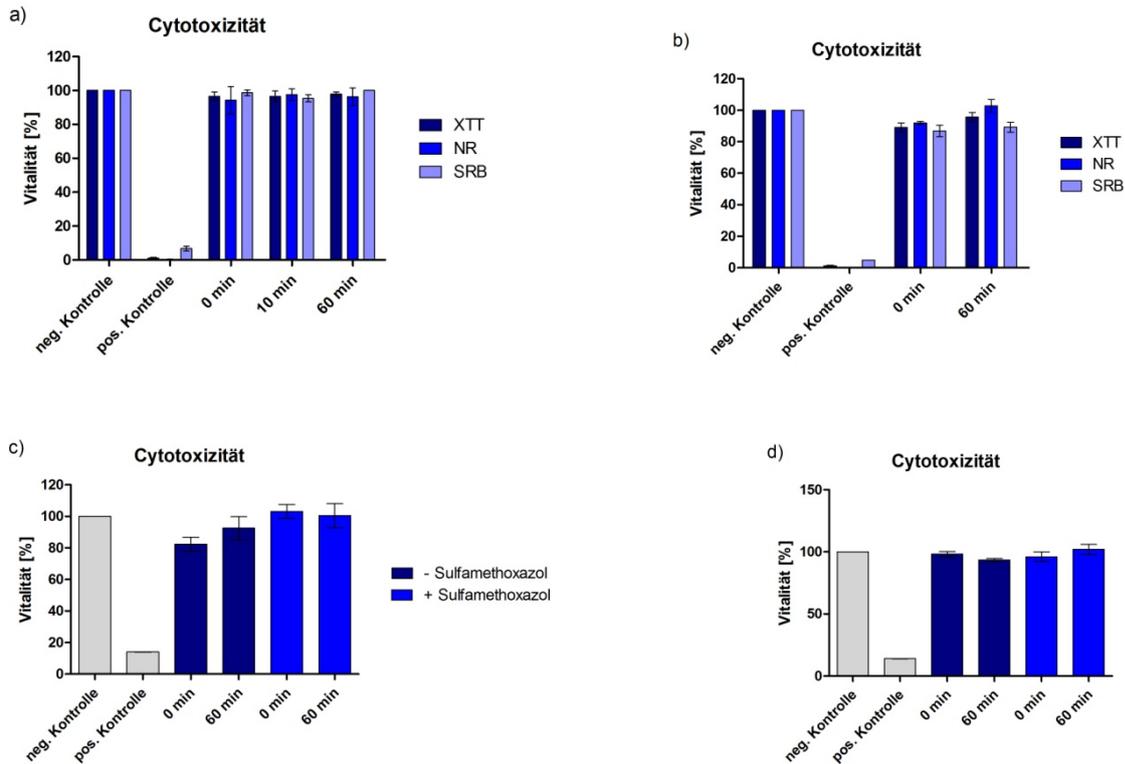


**Abbildung 44: Möglicher Abbauweg der Oxidation von Sulfamethoxazol.**

#### 4.3.13.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

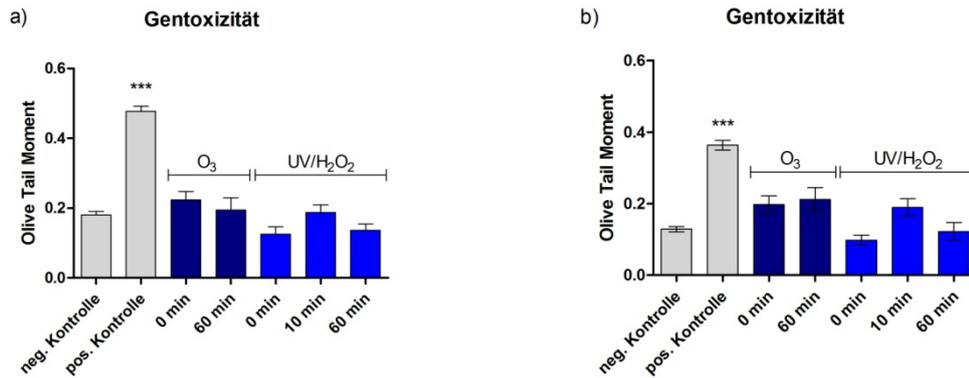
Die Cytotoxizität für Reinstwasser mit 1,4 mg/L (Ozonierung) oder 1 mg/L (UV Oxidation) Sulfamethoxazol ergaben weder vor und nach der Ozonierung (Abbildung 45a) noch vor und nach der UV Oxidation (Abbildung 45b) cytotoxische Effekte. Für alle vier hier eingesetzten Tests verringerte sich die Anzahl lebender Zellen nicht unter 81 %. Die Ergebnisse der gleichen Untersuchung mit Kläranlagenablauf bestätigen dies. Auch hier verringert sich die Vitalität nicht unter 81 %, so dass auch hier keine Cytotoxizität vorliegt.

Die entsprechenden Proben der Ozonierung wurden mittels des MTT Tests auf ihre mögliche Cytotoxizität untersucht. Auch hier sind weder für die Reinstwasser Proben (Abbildung 45c) noch für die Proben des Kläranlagenablaufes (Abbildung 45d) mit jeweils 1,4 mg/L cytotoxische Effekte detektiert. Allerdings existieren Hinweise in Studien, die cytotoxische Effekte beschreiben. Die  $EC_{50}$  Werte schwanken dabei je nach Methode und Organismus zwischen  $\mu\text{g/L}$  und  $\text{mg/L}$  Konzentrationen [163, 185, 227-230].



**Abbildung 45: Cytotoxizität von Sulfamethoxazol in Reinstwasser und Kläranlagenablauf. a) Reinstwasser mit Sulfamethoxazol und UV Oxidation. b) Kläranlagenablauf mit Sulfamethoxazol und Ozonierung. c) Ozoniertes Reinstwasser mit und ohne Sulfamethoxazol. d) Ozonierter Kläranlagenablauf mit und ohne Sulfamethoxazol.**

Neben dem Nachweis der Cytotoxizität wurden die Proben auch auf ihr gentoxisches Potenzial untersucht. Die Ergebnisse für oxidiertes Reinstwasser mit Sulfamethoxazol ergaben keine Erhöhung der Gentoxizität im Vergleich zur negativ Kontrolle (Abbildung 46a). Die entsprechenden Proben mit Kläranlagenablauf ergaben ebenfalls kein gentoxisches Potenzial (Abbildung 46b). Weder vor noch nach der Ozonierung oder UV-Oxidation [184, 195].



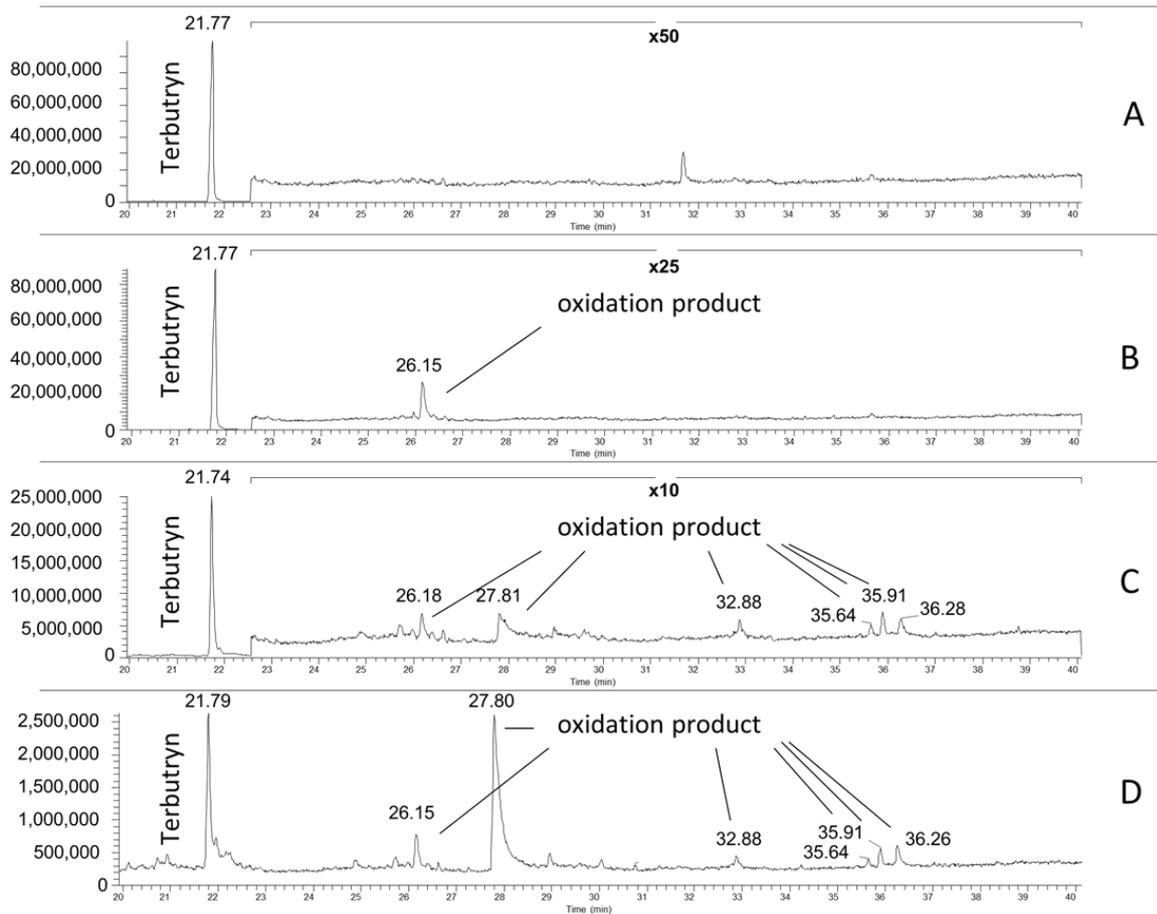
**Abbildung 46: Untersuchung von gentoxischen Effekte nach der Ozonierung oder UV Oxidation in a) Reinstwasser und b) Kläranlagenablauf.**

#### 4.3.14 Terbutryn

##### 4.3.14.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Die Elimination von Terbutryn wurde sowohl für die Verwendung von Ozon als Oxidationsmittel als auch für die UV-Oxidation mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid untersucht. Bei den zunächst durchgeführten Versuchen im Labormaßstab in Reinstwasser konnte die Bildung mehrerer Oxidationsnebenprodukte durch GC-MS-Untersuchungen nachgewiesen werden (s. Abbildung 47).

Eine eindeutige Identifizierung der Oxidationsprodukte war zunächst nicht möglich, jedoch konnte das toxische Potential dieser Substanzen im Vergleich zur Ausgangssubstanz Terbutryn ermittelt werden (siehe Kapitel 5.3.14.2).



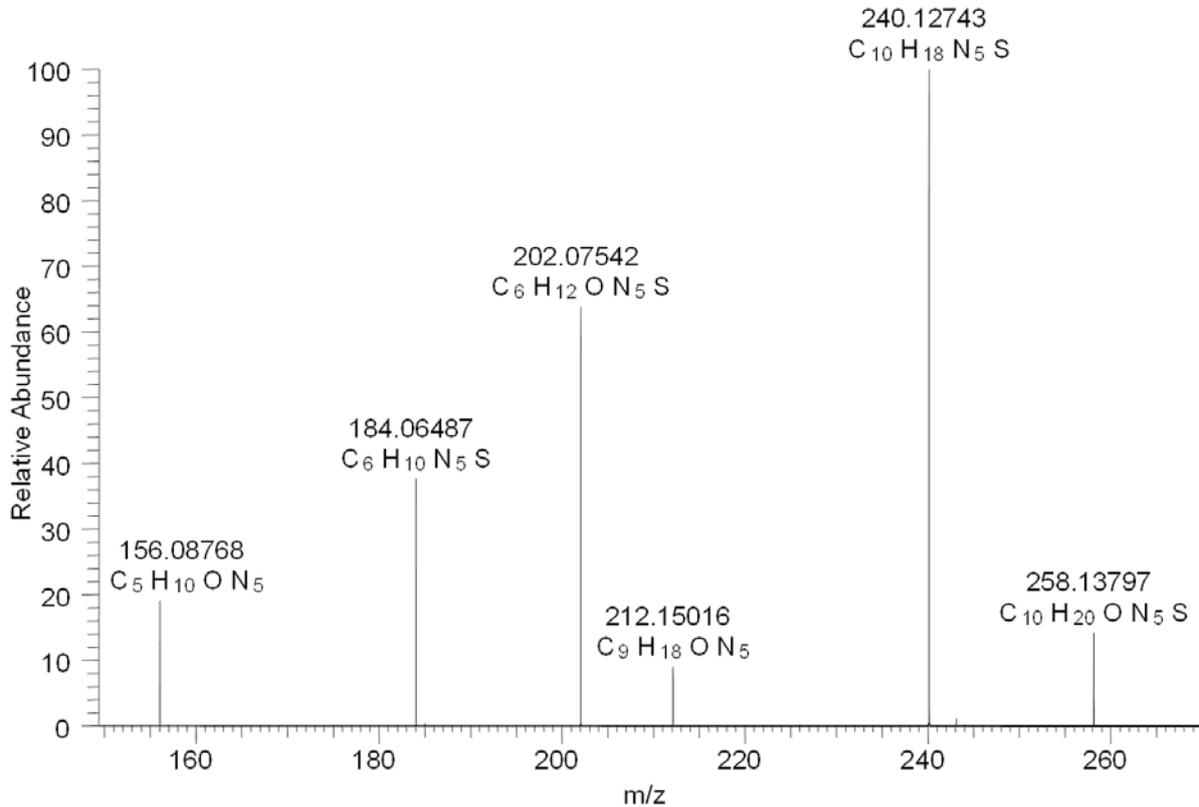
**Abbildung 47: GC-MS TIC Chromatogramm von Terbutryn (2 µmol/L) - (A) nicht oxidiert und oxidiert mit verschiedenen Ozon Konzentrationen ( $c_0 = 2$  (B), 5 (C) und 10 µmol/L(D)).**

Zusätzliche Messungen an einem HPLC-Orbitrap System bei der Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH ermöglichten jedoch die Bestimmung der Elementzusammensetzung einiger Produkte (s. Tabelle 18).

**Tabelle 18: Elementzusammensetzung von vier identifizierten Oxidationsnebenprodukten von Terbutryn.**

Elementzusammensetzung	Detektierte Masse [amu]	Massen Abweichung [ $\Delta$ mmu]
$[C_{10}H_{20}N_5SO]^+$	258,13837	0,063
$[C_{10}H_{19}N_5SO_2Na]^+$	296,11517	0,003
$[C_{10}H_{20}N_5O]^+$	226,16672	0,483
$[C_9H_{18}N_5O]^+$	212,15074	0,153

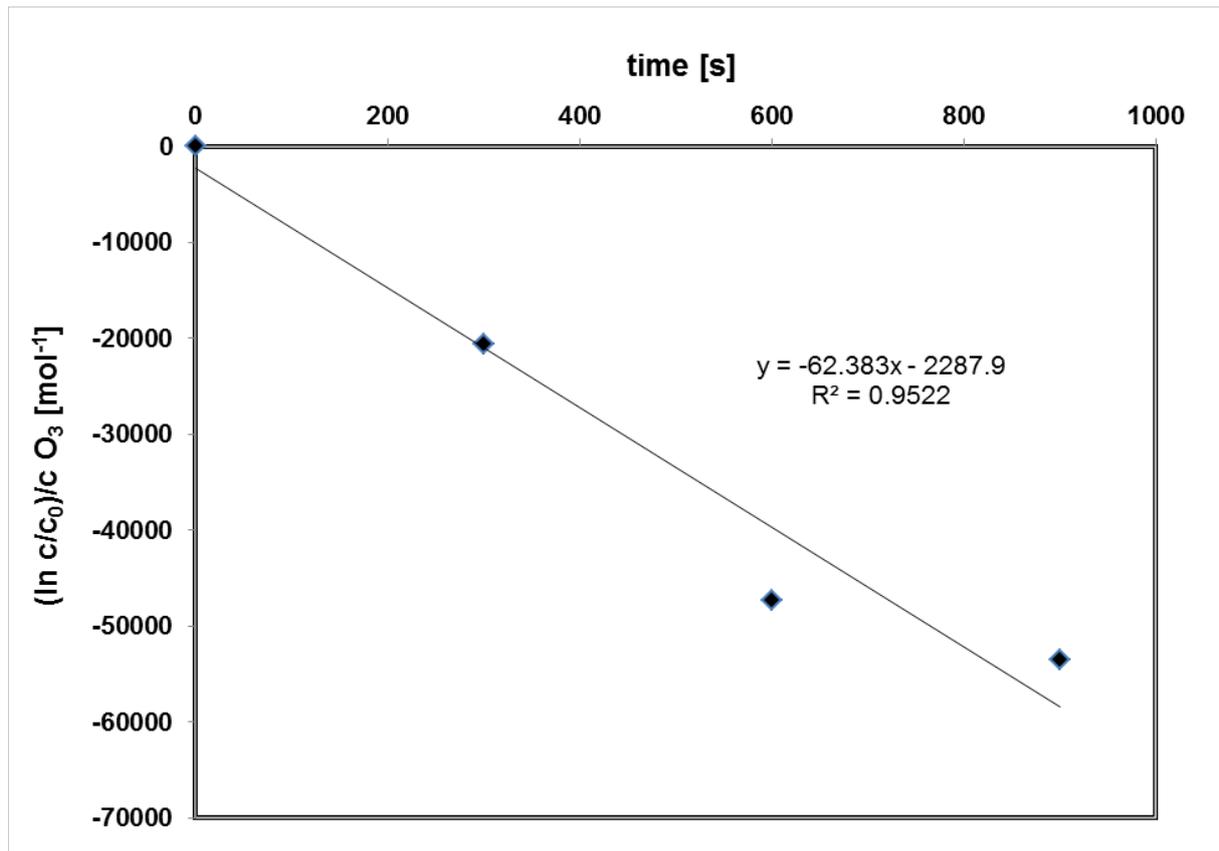
Zusätzlich durchgeführte MS<sup>2</sup>-Experimente ermöglichten es durch die spezifische Fragmentierung im Falle eines Produktes die Struktur aufzuklären (Abbildung 48).



**Abbildung 48: HPLC-Orbitrap Produkt Ionen Scan eines Oxidationsproduktes von Terbutryn (m/z 258.14; CID: 30 eV).**

Dieses Fragmentierungsmuster lässt darauf schließen, dass eine Addition von Sauerstoff an der Ethylamino-Gruppe stattfindet. Eine Addition von Sauerstoff an die Schwefelbrücke, wie für die Oxidation von Terbutryn mit Natriumhypochlorit von Brix et al. beschrieben, kann ausgeschlossen werden [158].

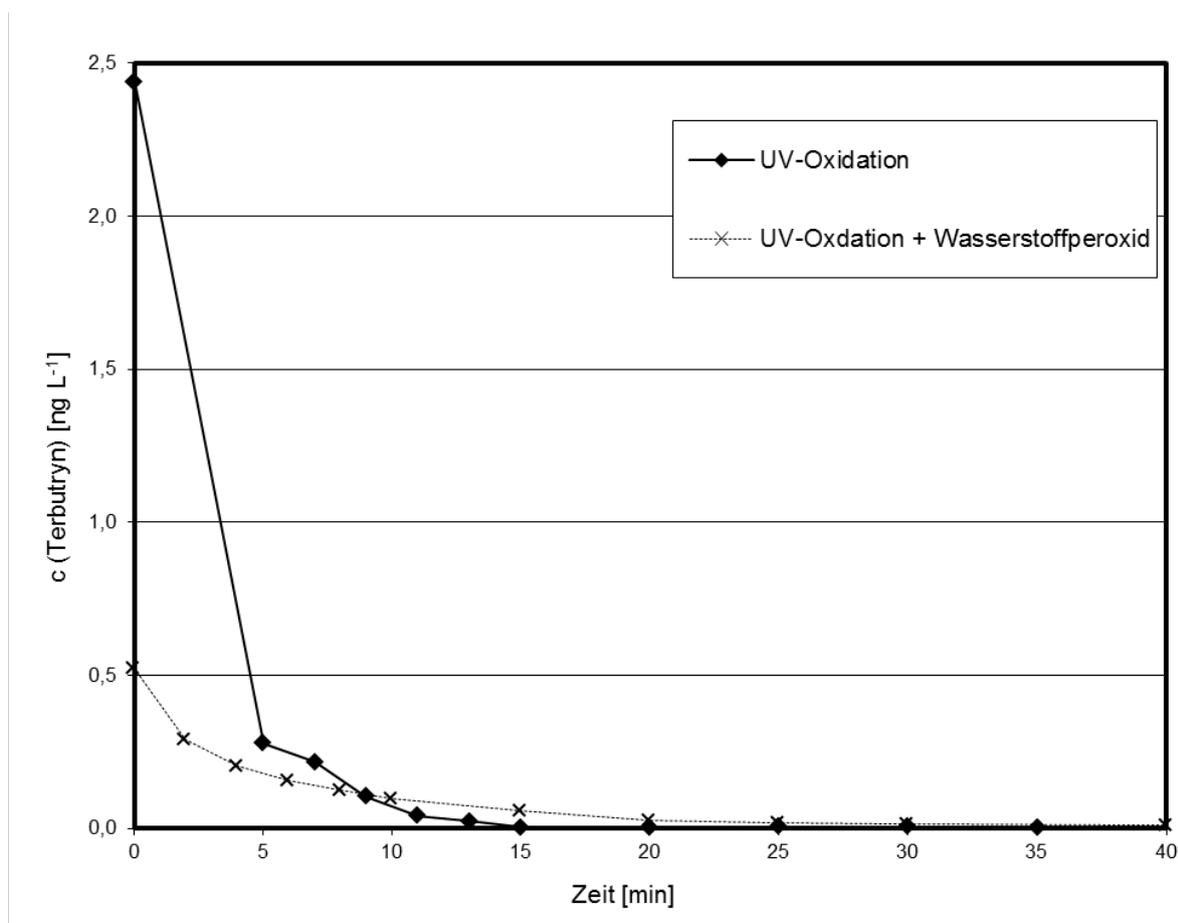
Im Folgenden wurde die Ozonoxidation von Terbutryn in dotiertem Kläranlagenablauf untersucht. Es konnte eine Kinetik für den Abbau von Ozon ermittelt werden (s. Abbildung 49).



**Abbildung 49: Abbaukinetik von Terbutryn ( $c_0 = 200 \mu\text{g/L}$ ) in Kläranlagenablauf in Abhängigkeit von der Ozonkonzentration.**

Die in den Reinstwasserversuchen identifizierten Oxidationsprodukte konnten im dotierten Kläranlagenablauf nach der Oxidation mit Ozon nicht wiedergefunden werden, wobei hier Matrixeinflüsse bei der Detektion das Hindernis waren.

Versuche zur UV-Oxidation wurden in Reinstwasser mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid durchgeführt. Dabei konnte zunächst der zeitliche Ablauf der Oxidation bestimmt werden (Abbildung 50).



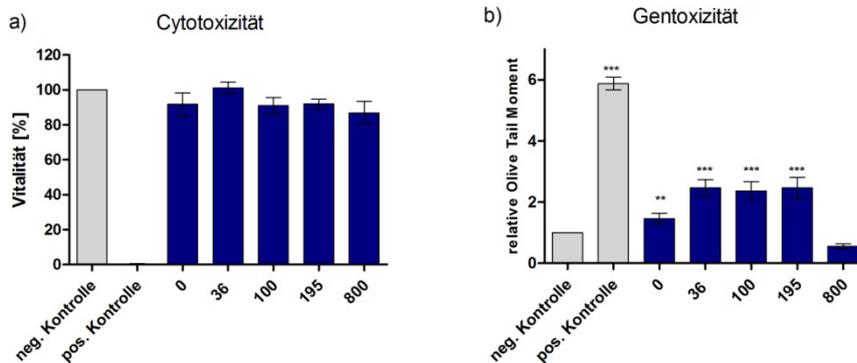
**Abbildung 50: Zeitlicher Ablauf der Oxidation von Terbutryn bei der UV-Oxidation mit und ohne Wasserstoffperoxid Zugabe.**

Bei den anschließend durchgeführten HPLC-MS-Screenings konnten zehn mögliche Oxidationsnebenprodukte detektiert werden. Basierend auf diesen Versuchen konnte eine strukturelle Identifizierung jedoch nicht durchgeführt werden.

#### 4.3.14.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Für die hier getesteten Proben (490 µg/L) ergab der MTT Test, dass weder die unbehandelte Probe noch die ozonierten Proben cytotoxische Effekte besitzen (Abbildung 51a). Allerdings zeigen die Ergebnisse des Alkaline Comet Assay, dass Terbutryn selbst schon sehr signifikante DNA Schäden hervorruft, welche nach der Behandlung mit den niedrigen Ozonkonzentrationen (36 – 195 µg/400 mL) eine erhöhte gentoxische Wirkung aufweisen. Erst der Einsatz von 800 µg O<sub>3</sub>/400 mL führte zu einer Reduktion der gentoxischen Effekte (Abbildung 51b). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Brix et al. publiziert. Sie konnten

zeigen, dass die Behandlung einer wässrigen Terbutrynlösung mit Hypochlorit zur Bildung von Desinfektionsnebenprodukten führt, die im *Vibrio fischeri* Lumineszenztest toxischer waren, als die unbehandelte Ausgangslösung [158].



**Abbildung 51: Cytotoxizität und Genotoxizität von ozonisiertem Terbutryn ( $c_0 = 490 \mu\text{g/L}$ ). a) Terbutryn vor der Behandlung, sowie nach der Ozonierung mit verschiedenen Konzentrationen hat keine cytotoxischen Effekte. b) Genotoxizität der unbehandelten, sowie der mit 36, 100 und 195  $\mu\text{g}/400 \text{ mL O}_3$  behandelten Probe. 800  $\mu\text{g}/400 \text{ mL O}_3$  führen zu keinen genotoxischen Effekten.**

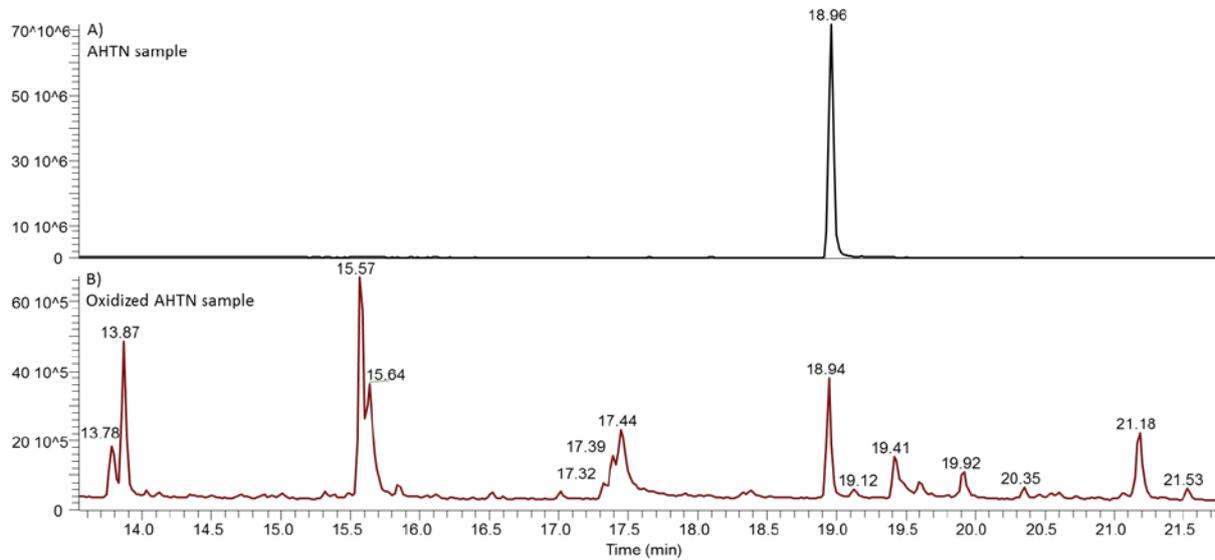
In der Literatur sind bereits einige weitere Studien beschrieben, in denen die Toxizität von Terbutryn untersucht wurde. Allerdings sind dort große Unterschiede zwischen den Testsystemen sowie den eingesetzten Testorganismen oder Zellkulturen in Bezug auf die Toxizität zu erkennen.  $LC_{50}$  Werte schwanken zwischen 1,4 mg/L und 8 mg/L [194, 231-233], wohingegen erste Effekte in Karpfen schon ab einer Konzentration von 4  $\mu\text{g/L}$  zu erkennen waren [234-236].  $EC_{50}$  Werte wurden zwischen 7 mg/L und 16 mg/L berichtet [194, 231].

#### 4.3.15 Tonalid (AHTN)

##### 4.3.15.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

Bei der Oxidation von AHTN mit Ozon konnten stabile Oxidationsprodukte von AHTN nachgewiesen werden. In Abbildung 52 wird das Chromatogramm einer unbehandelten und einer ozonierten AHTN Probe gezeigt. Viele stabile Oxidationsprodukte wurden gebildet. Das unbekannte Oxidationsprodukt bei der Retentionszeit 21,53 zeigt ein ähnliches Massenspektrum wie das synthetische AHTN Derivat 3-Acetyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,7,8,8-pentamethyl-2-naphthalenecarbaldehyd [146]. Die Strukturformel ist in Tabelle 19 dargestellt.

Da das AHTN Derivat nicht kommerziell verfügbar ist, konnte kein Vergleich mit einem Standard durchgeführt werden.

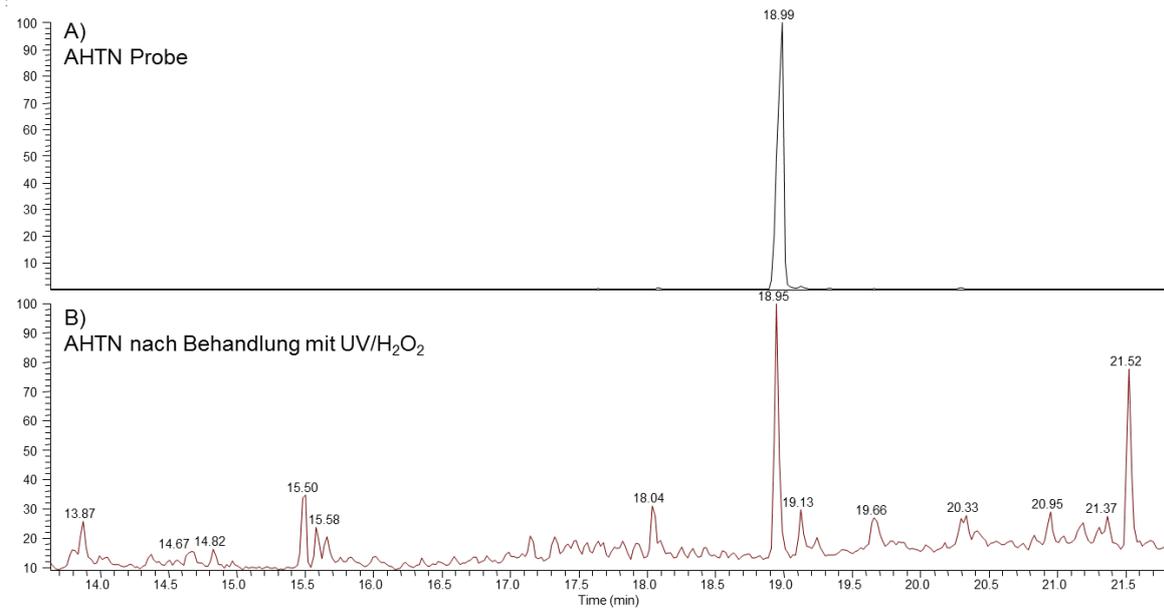


**Abbildung 52: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) ozonierten AHTN Probe.**

**Tabelle 19: Strukturformeln von AHTN und Oxidationsprodukten.**

Name	Akronym	Struktur
Tonalid	AHTN	
AHTN Derivat		

Bei der photooxidativen Behandlung von AHTN mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnten ebenfalls stabile Oxidationsprodukte nachgewiesen werden. In Abbildung 53 sind die Chromatogramme von AHTN vor und nach UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung gegenübergestellt.

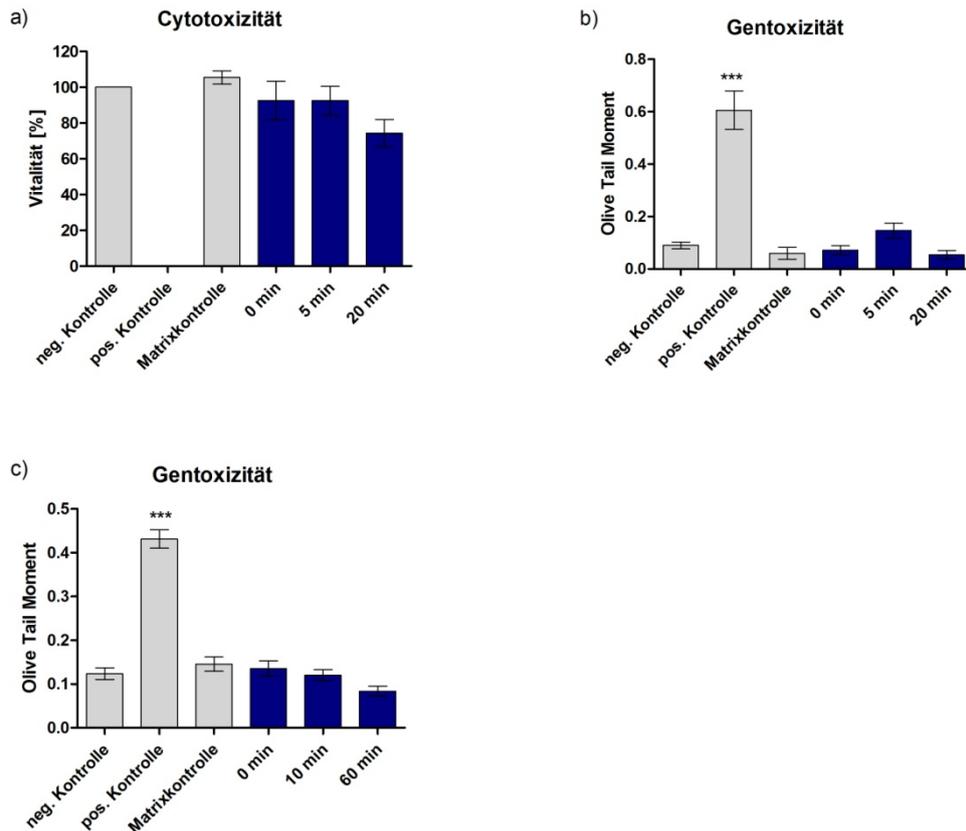


**Abbildung 53: Chromatogramme einer (A) unbehandelten und (B) mit UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten AHTN Probe.**

Zur eindeutigen Identifizierung der unbekannt Oxidationsprodukte von AHTN müssten ebenso wie bei HHCb weiterführende strukturaufklärende Analysen durchgeführt werden. Aus Zeitgründen und der im nachfolgenden Kapitel dargestellten negativen toxikologischen Ergebnisse wurde auf diese sehr aufwändigen Untersuchungen verzichtet.

#### 4.3.15.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse zeigen, dass 0,1 mg/L AHTN in Reinstwasser weder vor noch nach 5 min der UV Oxidation (Abbildung 54a und b) oder der Ozonierung (Abbildung 54c) toxische Effekte ausweisen. Erst eine Bestrahlungsdauer von 20 min resultierte in einer Verringerung der Vitalität auf 74 % (Abbildung 54a) und somit einer Einstufung als schwach cytotoxisch. Da auch hier der Nachweis auf mögliche Peroxide negativ ausfiel, ist von der Bildung toxischer Nebenprodukte auszugehen.



**Abbildung 54: Toxizität von 0,1 mg/L AHTN in Reinstwasser. Die UV Oxidation von resultierte weder in cytotoxischen (a) noch in gentoxischen (b) Effekten. c) AHTN war weder vor noch nach der Ozonierung gentoxisch.**

Balk et al. folgern in ihrer Studie zur Toxizität von AHTN, dass an Hand der ermittelten PNEC (predicted no effect concentrations) Werte, 3,5 µg/L bei aquatischen Organismen und 10 mg/kg Trockengewicht des Bodens, von dieser Substanz allerdings keine Gefahr für die Umwelt ausgeht [237]. In einer Studie zur östrogenen Wirkung konnte gezeigt werden, dass 50 ppm AHTN einen Effekt auf das Uterusgewicht von Mäusen haben und 50 µM die ERα Transkription induzieren [238], diese Effekte aber im Vergleich zu 17β-Estradiol sehr schwach sind. Sie kommen somit zu dem gleichen Ergebnis wie Balk et al., dass AHTN keinen Effekt auf Lebewesen in der Umwelt hat. Des Weiteren zeigten Api et al. Wie auch schon für HHCb, dass auch keine gentoxischen und mutagenen Effekte von AHTN ausgehen [209].

### 4.3.16 Triclosan

#### 4.3.16.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

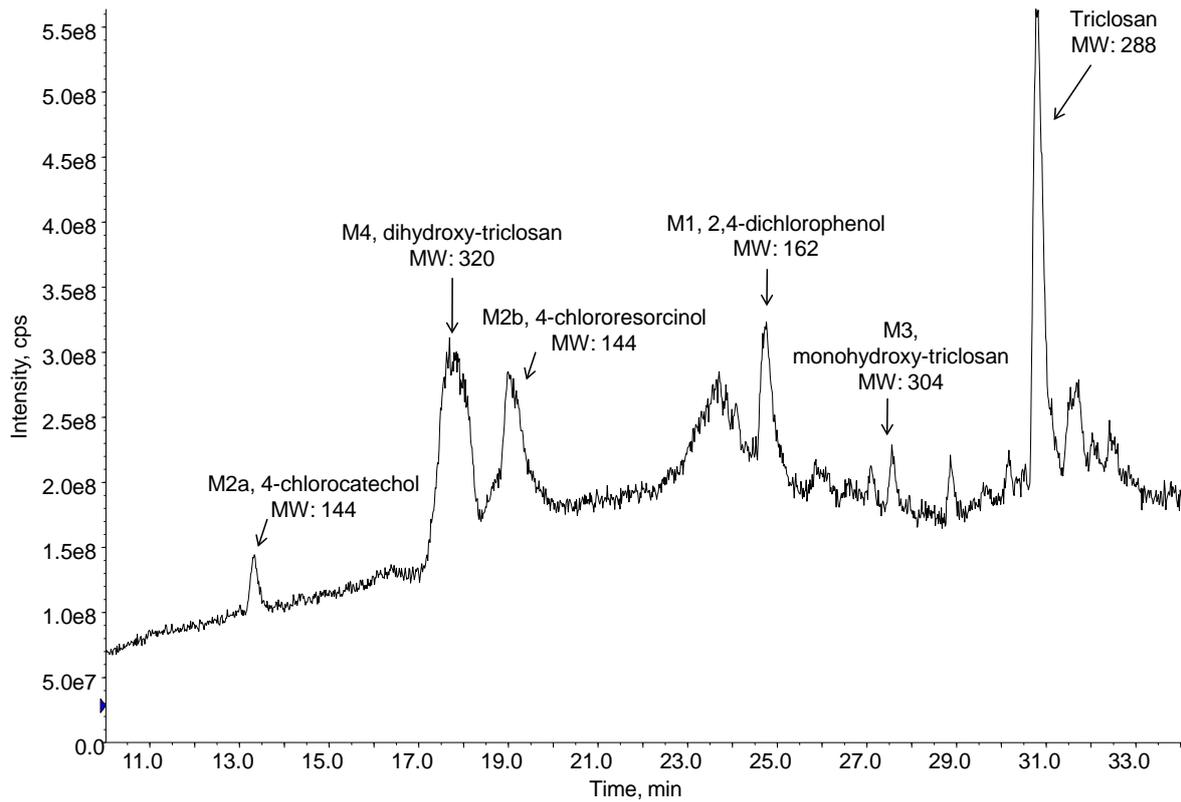
Durch die GC-MS Untersuchungen einer ozonierten Triclosan Probe mit einem Molverhältnis von 1:2 (Triclosan/Ozon) konnten drei relevante Transformationsprodukte detektiert werden (Tabelle 20). Als Haupttransformationsprodukt wurde 2,4-Dichlorphenol identifiziert. Es entsteht durch die Spaltung einer Etherbindung des Triclosans.

**Tabelle 20: GC-MS Ergebnisse für die Identifikation der Transformationsprodukte.**

Verbindung	Reten- tionszeit  [min]	MW  [Da]	RT + MS entspricht Standard	RT + MS entspricht Theorie	Massenfragmente (beinhalten die Cl Isotopensignale)  [Da]
Triclosan (M)	24.99	288	Ja	Ja	288 (290, 292), 252 (254, 256), 218 (220)
2,4- Dichlorphenol (M1)	5.88	162	Ja	Ja	162 (164, 166), 126, 98, 63
Chlorocatechol (M2)	11.40	144		Ja	144 (146), 115, 81, 52
Monohydroxy- triclosan (M3)	28.45	304		Ja	304 (306, 308), 234 (236, 238)

Untersuchungen mittels HPLC-MS/MS konnten Dichlorphenol als Haupttransformationsprodukt bestätigen. Ein Chromatogramm ist in Abbildung 55 zu finden. Die Transformationsprodukte sind in Tabelle 21 aufgeführt.

2,4-Dichlorphenol (M1) ist bereits als Metabolit und als Transformationsprodukt der Oxidation mit Manganoxiden bekannt [33, 171].

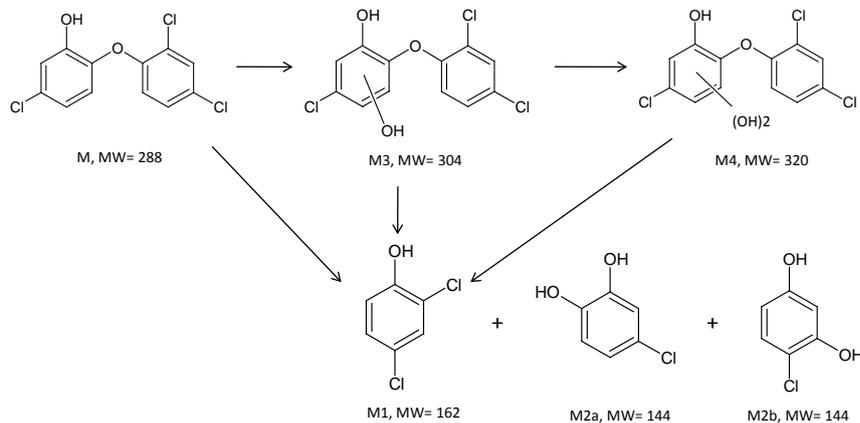


**Abbildung 55: HPLC-MS/MS Q1-Scan Chromatogramm einer Probe mit einem Triclosan:Ozon-Verhältnis von 1:2 über (Elektronenspray-Ionisation mit negativer Polarisierung ESI (-) und Vorschlag zur Identifikation).**

**Tabelle 21: HPLC-MS/MS Ergebnisse für die Identifikation der Transformationsprodukte.**

Verbindung	Retentionszeit [min]	MW [Da]	RT + MS entspricht Standard	RT + MS entspricht Theorie	Fragmente Produktionenscan [Da]
Triclosan (M)	30.78	288	Ja	Ja	287, 252, 251
2,4-Dichlorophenol (M1)	24.76	162	Ja	Ja	161, 125, 89, 61, 35
4-chlorocatechol (M2a)	13.31	144	Ja	Ja	143, 107, 79, 51, 35
4-chlororesorcinol (M2b)	19.19	144	Ja	Ja	143, 107, 79, 51, 35
Monohydroxy-triclosan (M3)	27.56	304		Ja	303, 161, 125, 113, 85, 35
Dihydroxy-triclosan (M4)	17.65	320		Ja	319, 161, 125, 35

Durch die Identifizierung einiger Transformationsprodukte konnte ein möglicher Abbauweg des Triclosans ermittelt werden (Abbildung 56).



**Abbildung 56: Mögliche Abbauprodukte des Triclosans.**

Die Kontamination von Oberflächen- und Grundwasser mit Triclosan ist ein aufkommendes Problem der Umwelt- und Ingenieurwissenschaften. Das Resultat der Studie lautet wie folgt:

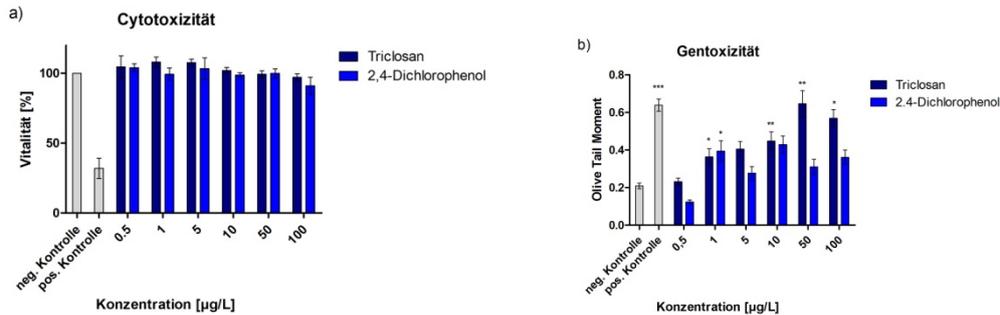
Das Entfernen von Triclosan aus Wasser und Abwasser kann durch Ozonierung erzielt werden. Triclosan ist hoch reaktiv gegenüber der Ozonierung. Das Behandlungsverfahren ermöglicht es, Triclosan vollständig zu eliminieren und es in die Produkte 2,4-Dichlorphenol, Chlorocatechol, Monohydroxytriclosan und Dihydroxytriclosan umzuwandeln. Die Erhöhung der Ozonkonzentration in den Reaktionen führt zu geringeren Konzentrationen an Triclosan und dessen Oxidationsnebenprodukte. 2,4-Dichlorphenol zeigt, bei den eingesetzten Konzentrationen, geringere genotoxische Effekte als Triclosan, jedoch ist diese Verbindung für aquatische Organismen toxisch. Die anderen Umsetzungsprodukte können zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingestuft werden.

Die Bildung und das Vorkommen der identifizierten Zersetzungsprodukte sollte bei Anwendungen im Originalmaßstab untersucht werden.

Reaktorentwürfe sollten die Bildung von Oxidationsnebenprodukten mit einbeziehen und möglicherweise höhere Ozonraten und längere Verweilzeiten in Betracht ziehen.

#### 4.3.16.2 *Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen*

Triclosan und das identifizierte Oxidationsnebenprodukt 2,4-Dichlorphenol wurden in Reinstwasser gelöst und in Konzentration bis zu 100 µg/L auf cytotoxische und genotoxische Effekte untersucht. Der MTT Test ergab hierbei, dass beide Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen keine Verringerung der Vitalität unter 90 % zur Folge haben (Abbildung 57a), und somit keine cytotoxischen Effekte aufweisen. Die Ergebnisse der genotoxischen Untersuchung hingegen zeigen, dass Triclosan in den höheren Konzentrationen genotoxische Effekte besitzt, 2,4-Dichlorphenol hingegen nicht (Abbildung 57b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ozonierung eine geeignete Methode ist um das genotoxische Triclosan aus dem Wasser zu entfernen [239].



**Abbildung 57: Cytotoxizität und Genotoxizität von Triclosan und 2,4-Dichlorophenol. a) Triclosan und 2,4-Dichlorophenol haben bis zu einer Konzentration von 100 µg/L keine cytotoxischen Effekte. b) Triclosan wirkt mit steigenden Konzentrationen genotoxisch, 2,4-Dichlorophenol hingegen nicht..**

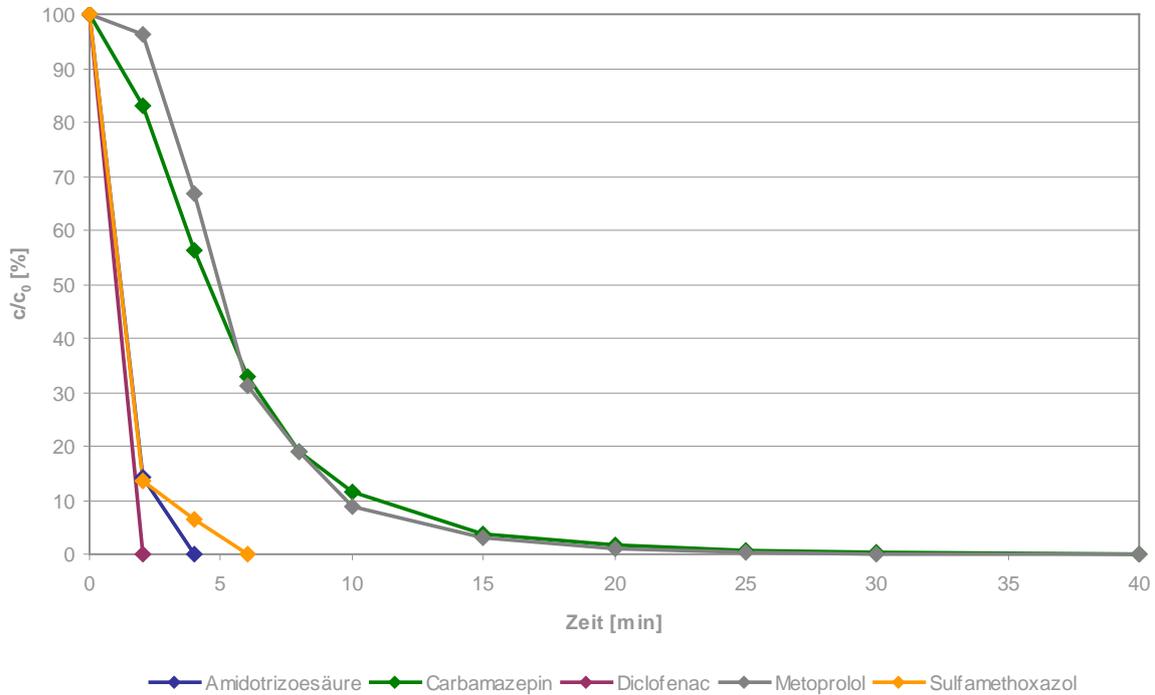
Die hier erlangten Ergebnisse sind vergleichbar mit einigen bereits publizierten Studien bei denen der Einfluss von Triclosan und 2,4-Dichlorophenol auf aquatische Organismen untersucht wurde. Wilson et al. konnten zeigen, dass toxische Effekte bei Algen ab einer Konzentration von 0,15 µg/L und einer Expositionsdauer von 13 Tagen auftreten. Zusätzlich wurden Veränderungen in der Zusammensetzung der eingesetzten Algen schon ab einer Konzentration von 0,015 µg/L nachgewiesen [28], wohingegen die EC<sub>50</sub> Werte für Triclosan in Fisch zwischen 240 und 410 µg/L schwanken [32]. In vitro Versuche an humanen Zahnfleisch Zellen ergaben toxische Effekte ab einer Konzentration von 4,3 mg/L [240]. Akute toxische Effekte wurden mit Hilfe des *Vibrio fischeri* Biolumineszenztests ab einer Konzentration von 0,28 µg/L nachgewiesen [241]. Toxische Effekte (EC<sub>50</sub> = 6,5 mg/L) von 2,4-Dichlorophenol in *Lemna gibba* sind bisher von Ensley et al. beschrieben worden [242]. Zusätzlich zu diesen toxischen Effekten wurde bereits gezeigt, dass Triclosan sowie die entsprechenden Abbauprodukte auch endokrine Effekte aufweisen können [243-245].

#### 4.3.17 Substanzmix

##### 4.3.17.1 Ergebnisse der chemischen Untersuchungen

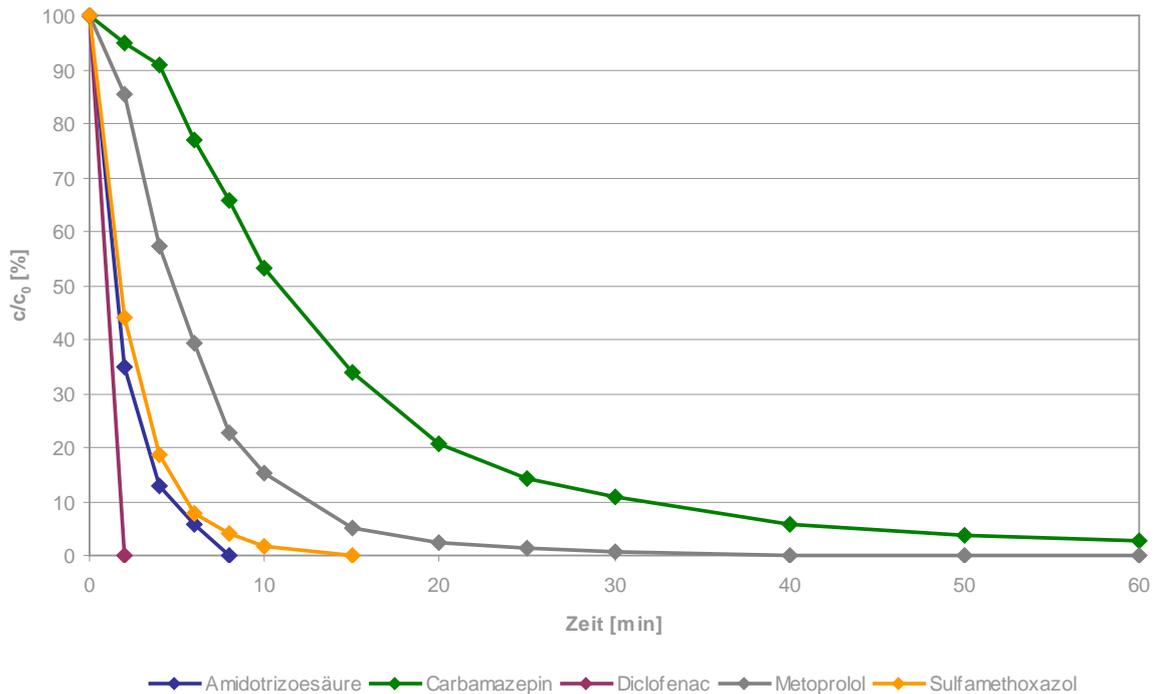
Der Abbau eines Substanzgemisches wurde sowohl in Reinstwasser, als auch im Kläranlagenablauf untersucht. Das Substanzgemisch bestand aus Amidotrizoesäure, Sulfamethoxazol, Carbamazepin, Metoprolol und Diclofenac. Alle Substanzen sind in einer Ausgangskonzentration von 100 µg/L zu den unterschiedlichen Matrices dotiert worden.

Der vollständige Abbau der leicht oxidierbaren Stoffe ist nach 2 – 6 min erreicht. Carbamazepin und Metoprolol wurden erst nach 40 bzw. 35 min aus dotierten Reinstwasser entfernt.



**Abbildung 58: Abbaukurven des Substanzmix aus dotiertem Reinstwasser ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) mittels UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation ( $0,3 \text{ g/L H}_2\text{O}_2$ ).**

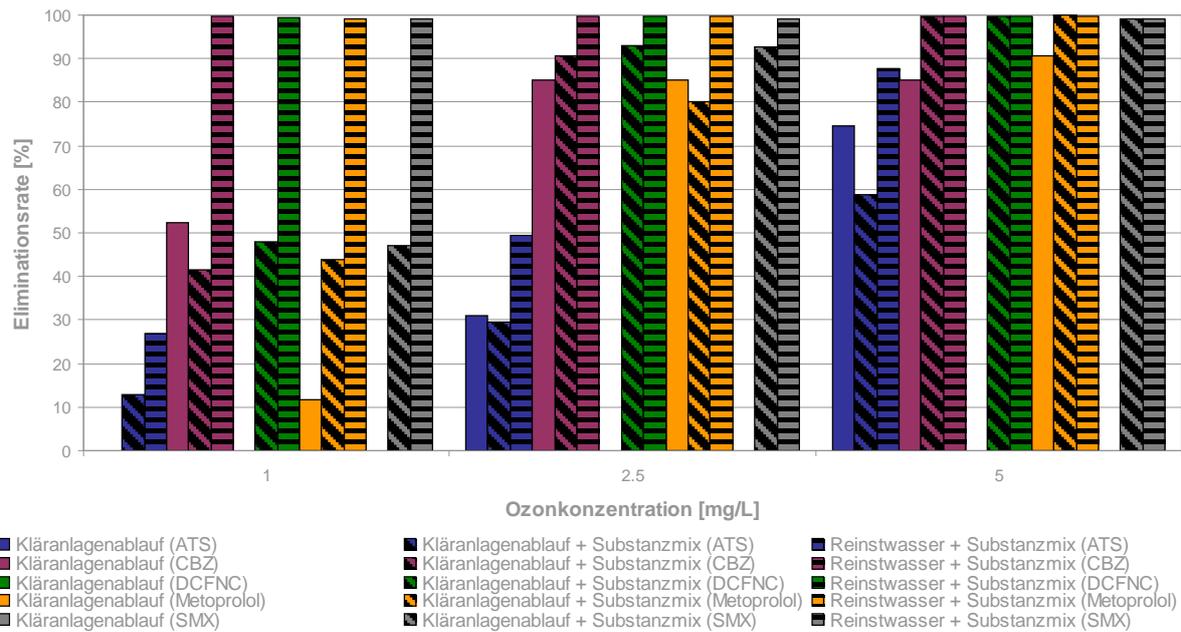
In dotiertem Kläranlagenablauf wird die Elimination der fünf Substanzen durch eine höhere Matrixkonzentration verringert.



**Abbildung 59: Abbaukurven des Substanzmix aus dotiertem Kläranlagenablauf mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation (0,3 g/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

In Abbildung 60 sind die Eliminationsraten der fünf Substanzen im Kläranlagenablauf, dotiertem Kläranlagenablauf und Reinstwasser mittels verschiedener Ozonkonzentrationen dargestellt.

Durch höhere Ozonkonzentrationen ist eine bessere Abbauleistung möglich. Auch der Einfluss der Matrix wird deutlich. In Reinstwasser konnte eine vollständige Elimination bereits mit 1 mg/L Ozon erzielt werden. In dotiertem Kläranlagenablauf war dies erst mit 10 mg/L Ozon möglich. Eine Ausnahme stellt die Amidotrizoesäure dar. Es ist zu keiner Zeit ein vollständiger Abbau zu beobachten.



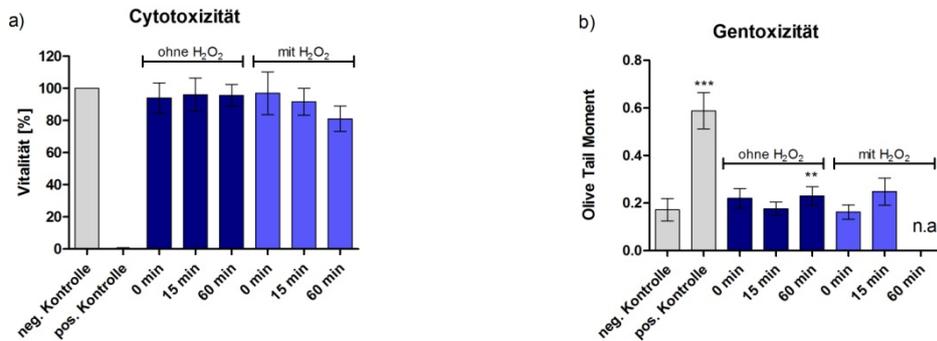
**Abbildung 60: Eliminationsraten des Substanzmix im Kläranlagenablauf, dotiertem Kläranlagenablauf ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) und dotiertem Reinstwasser ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) mittels verschiedener Ozonkonzentrationen.**

#### 4.3.17.2 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen

Zusätzlich zu den Wasserproben mit nur einer Substanz wurde noch ein Arzneimittelmix bestehend aus je  $100 \mu\text{g/L}$  (Endkonzentration je  $10 \mu\text{g/L}$ ) Amidotrizoesäure, einem Röntgenkontrastmittel, Sulfamethoxazol (Antibiotikum), dem Antiepileptikum Carbamazepin, Metoprolol ( $\beta$ -Blocker) und dem Analgetikum Diclofenac untersucht.

Die hier getesteten Proben wurden vor der UV Oxidation sowie 15 min und 60 min nach einschalten der Lampe genommen, wobei die Lampe ihre maximale Leistung nach 20 min erreicht. Im MTT Test konnten keine cytotoxischen Effekte des Arzneimittelmixes nachgewiesen werden, weder vor noch nach der Oxidation. Obwohl die Probe nach 60 min Oxidation und der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu den Zeitpunkten 0 min und 15 min eine Verringerung der Zellvitalität aufweist, ist diese laut DIN EN ISO 10993-5 immer noch als nicht cytotoxisch einzustufen, da die Vitalität noch 81 % beträgt (Abbildung 61a). Der Alkaline Comet Assay hingegen weist bei den zwei Proben nach einer 60 minütigen UV Behandlung gentoxische Effekte auf, wobei sich die beiden Proben beim Grad der Schädigung noch unterscheiden. Die Probe ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultierte in einer sehr

signifikanten DNA Schädigung wohingegen die Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine zu große Schädigung der DNA hervorruft, die eine Auswertung unmöglich macht (Abbildung 61b). Bei allen anderen Proben konnten keine gentoxischen Effekte nachgewiesen werden. Weder vor noch nach der UV Oxidation, noch im Vergleich mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Abbildung 61: Toxizität eines Arzneimittelmixes mit je 10 µg/L Amidotrizoesäure, Sulfamethoxazol, Metoprolol, Diclofenac und Carbamazepin. a) Keine Verringerung der Vitalität vor und nach der UV Oxidation des Arzneimittelmixes mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B) Keine gentoxische Effekte vor oder nach der UV Oxidation ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vor und nach 15 min UV Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine Gentoxizität, nach 60 min UV Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gentoxische Effekte. n.a. = nicht auswertbar auf Grund zu starker DNA Schäden.**

Es wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass ein Mix an Substanzen eine höhere Toxizität haben kann, als die einzelnen Substanzen selbst. Häufig kommt es bei Substanzen mit ähnlicher Wirkweise zu einer Addition der Effekte [211, 246-248], und die Toxizität eines Mixes kann von den Wirkungen der einzelnen Substanzen abgeleitet werden.

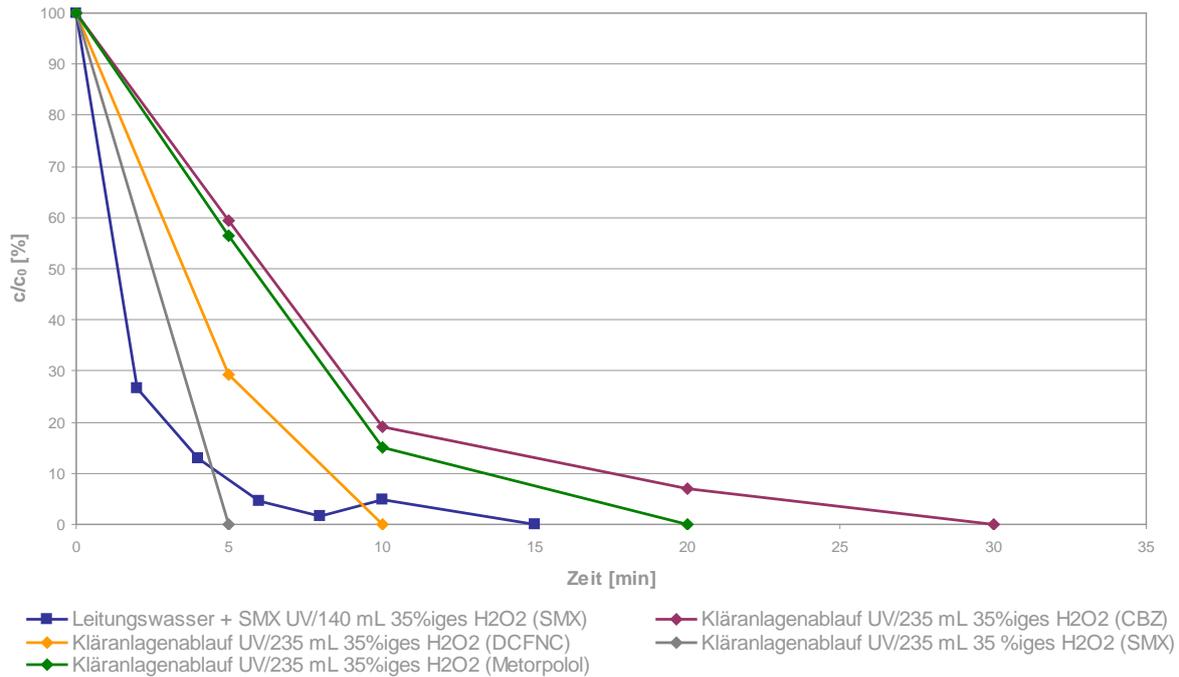
#### 4.4 Installation, Inbetriebnahme und Ergebnisse der UV-Durchflussanlage

Die Installation der UV-Anlage Typ IBL uviblox<sup>®WTP 2x4</sup> erfolgte zunächst am IUTA. Nach der Inbetriebnahme erfolgten zunächst Versuche im Batchbetrieb. Die Pumpe der Durchflussanlage fördert dabei das zu behandelnde Wasser aus einem IBC-Container durch die Reaktoren der MD-Strahler. Die beiden UV-Lampen sind in Reihe geschaltet. Vor den Reaktoren kann über eine Dosierpumpe ein Oxidationsmittel (hier Wasserstoffperoxid) zugefügt werden. Nach der Behandlung ist sowohl eine pH- als auch eine Redox-Sonde integriert. Über einen Messdatenschreiber können sowohl diese Messwerte als auch die Temperatur und die Durchflussgeschwindigkeit abgelesen werden. Ein UV-Monitor überwacht die Leistung der UV-Strahler. Nach der Behandlung wird das Wasser in den IBC-Container zurückgepumpt.

Die Batchversuche wurden mit 1 m<sup>3</sup> dotiertem Leitungswasser (100 µg/L Sulfamethoxazol) bzw. Kläranlagenablauf durchgeführt. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte mit der Dosierpumpe konstant 0,5 L/h einer 35 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zudosiert werden.

In Abbildung 62 ist der Abbau der Leitsubstanzen in Leitungswasser und in Kläranlagenablauf mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dargestellt.

Durch eine höhere Ausgangskonzentration im dotierten Leitungswasser ( $c_0 = 100 \mu\text{g/L}$ ) und einer niedrigeren Wasserstoffperoxidkonzentration konnte Sulfamethoxazol nur langsamer abgebaut werden als im Kläranlagenablauf mit einer höheren Matrixkonzentration. Im Vergleich zu den drei weiteren Substanzen ist SMX leicht abbaubar. Im Kläranlagenablauf wurde die Substanz in 5 min vollständig aus dem Wasser entfernt. Diclofenac konnte erst nach 10 min, Metoprolol nach 20 min und Carbamazepin nach 30 min eliminiert werden.



**Abbildung 62: Abbaukurven von ausgewählten Leitsubstanzen in dotiertem Leitungswasser und Kläranlagenablauf mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation im Batchbetrieb der Durchflussanlage.**

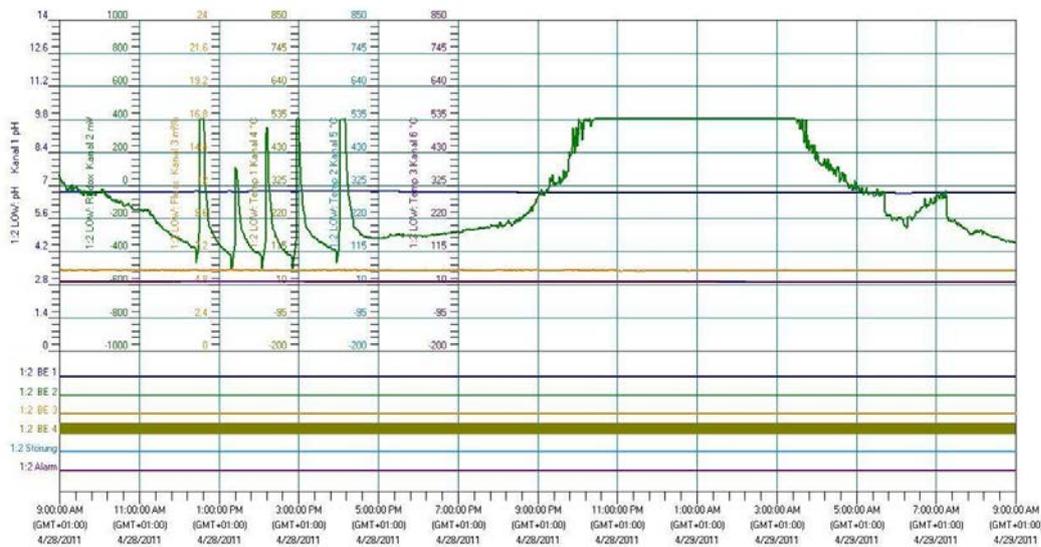
Nach den ersten Batchversuchen wurde die Oxidationsanlage an den Ablauf der Nachklärung einer Klärstraße auf der Kläranlage Bottrop (Abbildung 63) angeschlossen. Die Entnahme des Kläranlagenablaufs erfolgt aus einem Kanal hinter den Nachklärbecken. Nach der Behandlung mit der Pilotanlage wird das Wasser wieder in diesen Kanal eingeleitet.



**Abbildung 63: Luftaufnahme der Kläranlage Bottrop (Quelle: Emschergenossenschaft).**

Im Durchflussbetrieb wurden sowohl Stichproben- als auch 24h-Versuche durchgeführt. Während eines 24 h-Versuches wurde eine Einstellung der Durchflussanlage beibehalten. Zur Beurteilung der Eliminationsleistung wurden verschiedene Durchflussraten und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen getestet. Zur Probenahme wurde ein Probenehmer installiert, der vor und nach der Behandlung Mischproben erstellt.

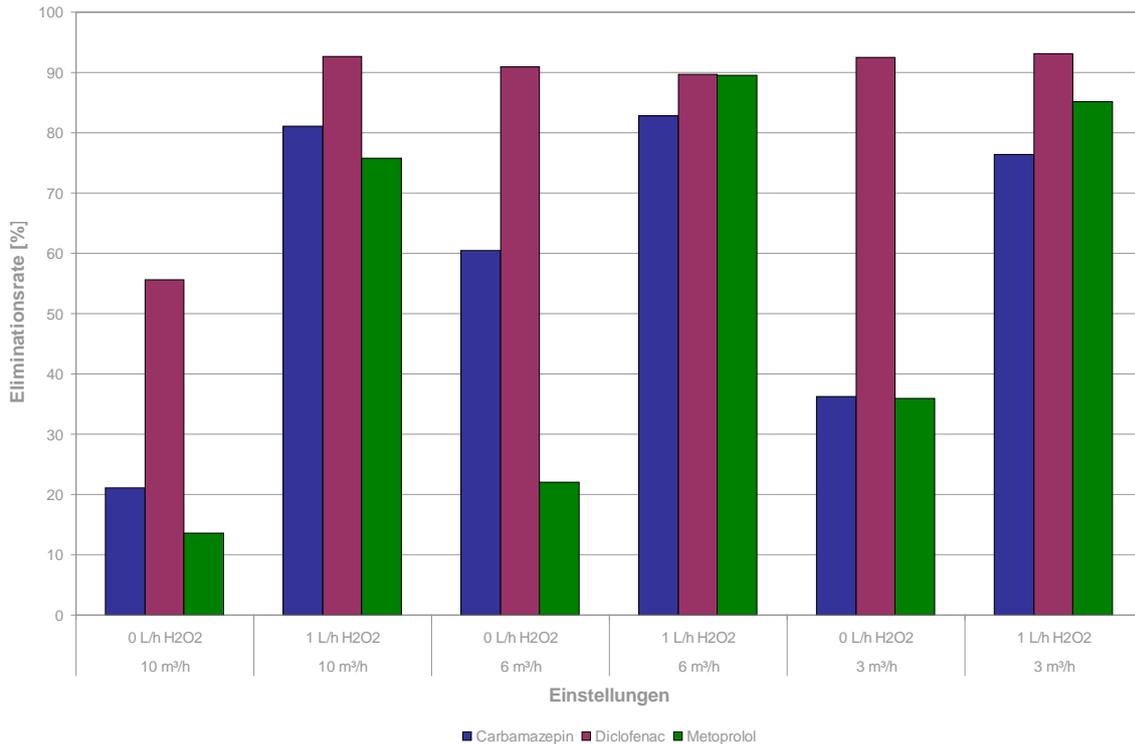
In Abbildung 64 ist beispielhaft die Aufzeichnung des Messdatenschreibers während eines 24 h-Versuches dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl die drei Temperaturwerte und der pH-Wert als auch die Durchflussgeschwindigkeit konstant blieben. Der Redox-Wert konnte durch Kommunikationsprobleme zwischen der Sonde und dem Messdatenschreiber nicht dargestellt werden.



**Abbildung 64: Aufzeichnung des Messdatenschreibers während eines 24 h-Versuches.**

In Abbildung 65 sind die Eliminationsraten von Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol aus Kläranlagenablauf aus 24 h-Versuchen dargestellt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 3, 6 und 10 m<sup>3</sup>/h, was Verweilzeiten von 10, 5 bzw. 3 s entspricht. Untersucht wurde jeweils die UV- und die UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation (2x4 kW bzw. 1 L/h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

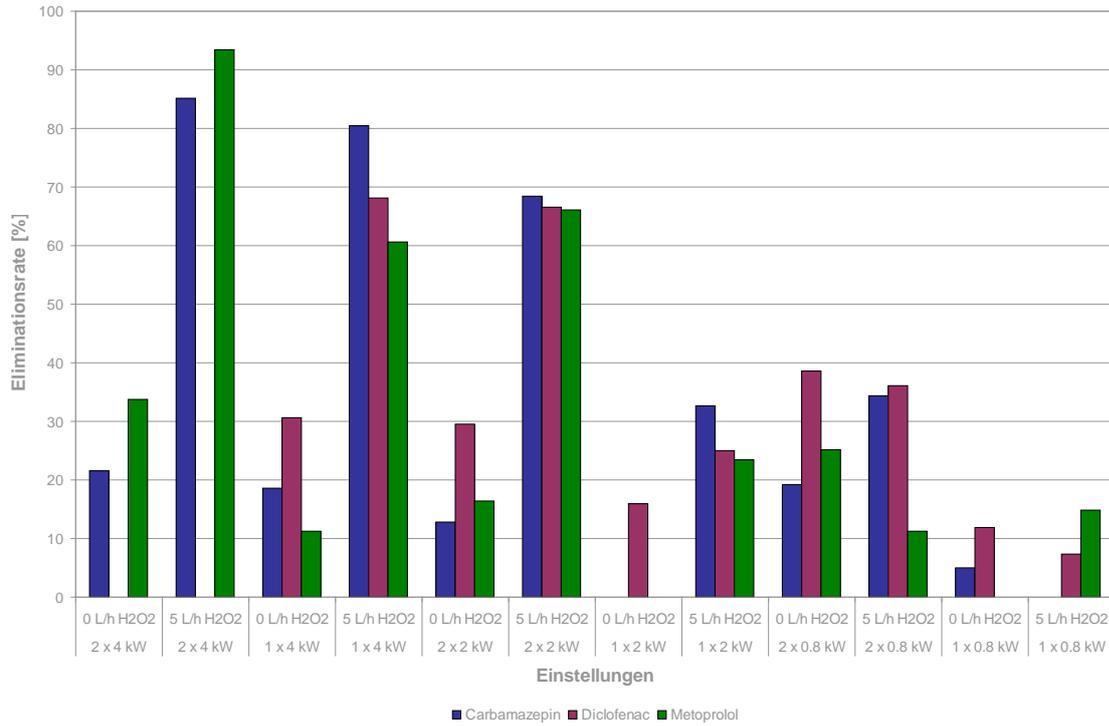
Eine vollständige Elimination von Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol konnte mit keiner Einstellung erzielt werden. Am leichtesten abbaubar ist Diclofenac, das nur bei der UV-Oxidation mit einem Durchfluss von 10 m<sup>3</sup>/h nicht eine Eliminationsrate von  $\geq 90$  erreicht. Allgemein lässt sich eine Begünstigung der Abbauleistung durch höhere Wasserstoffperoxidkonzentrationen und eine höhere Verweilzeit feststellen.



**Abbildung 65: Eliminationsraten der 24 h-Versuche im Ablauf der Kläranlage Bottrop für Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation.**

In Stichprobenversuchen wurden weitere Einstellungen getestet. So wurde dabei auch die Lampenleistung variiert. In Abbildung 66 sind die Eliminationsraten von Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol aus undotiertem Kläranlagenablauf in Bottrop mittels UV- und UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 m<sup>3</sup>/h dargestellt.

Bei konstantem Durchfluss ist die Abbauleistung bei höheren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen größer. Auch eine hohe Leistungseinstellung der UV-Strahler trug zu höheren Eliminationsraten bei, wobei keine der drei Substanzen vollständig aus dem Kläranlagenablauf entfernt werden konnte. Versuche mit nur einer UV-Lampe zeigten, dass nur ein geringer Unterschied in der Abbauleistung der beiden Strahler vorliegt. So hat Reaktor 1 eine längere Reaktionsstrecke bis zur Probenahme als Reaktor 2 und somit eine geringfügig längere Reaktionszeit.



**Abbildung 66: Eliminationsraten von Carbamazepin, Diclofenac und Metoprolol aus Kläranlagenablauf mittels UV- und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation aus Stichprobenversuchen mit einer Durchflussrate von 6 m<sup>3</sup>/h.**

#### 4.5 Erstellung einer Datenbank über Oxidationsnebenprodukte

Datenbanken von reinen Substanzen mit Strukturinformationen sind für den Bereich der GC-MS aufgrund der standardisierten Elektronenstoßionisation bei 70 eV schon seit vielen Jahren etabliert und kommerziell verfügbar. Die bekanntesten und umfangreichsten sind die NIST- (National Institute of Standards and Technology, USA) und Wiley-Datenbank [249]. Aufgrund der gerätespezifischen Ionisierungs- und Fragmentierungseigenschaften ist die Erstellung einer massenspektrometrischen Datenbank zur Substanzidentifizierung mittels LC-MS eine sehr komplexe Aufgabe. Für den klinisch-forensischen Bereich erfolgte für Drogen und Arzneimittelwirkstoffe in den letzten Jahren die Entwicklung kommerzieller Datenbanken [250, 251]. Die Wiley-VCH Datenbanken enthalten die bisher umfangreichste Sammlung von ESI-MS-Daten [252, 253].

Für im Rahmen dieses Forschungsvorhabens behandelte Transformationsprodukte sind bisher keine Datenbanken verfügbar. Mit Hilfe der Datenbankfunktion der Gerätehersteller ist es mittlerweile möglich eigene Datensätze aufzubauen. Bei neueren Geräten ist ein Vergleich der Spektren innerhalb eines Herstellers mittlerweile gut möglich. Problematisch ist allerdings immer noch die eingeschränkte Übertragbarkeit zwischen unterschiedlichen LC-MS-Geräteherstellern. Mögliche Lösungsansätze werden derzeit im Rahmen des DIN Arbeitskreises "Non-Target-Screening" diskutiert. Mit Unterstützung der Wasserchemischen Gesellschaft wurde durch das Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbandes Landeswasserversorgung in Langenau die open source Datenbank DAIOS entwickelt ([www.daios-online.de](http://www.daios-online.de)). Die frei zugängliche Datenbank befindet sich zurzeit im Aufbau. DAIOS ist speziell zur Identifizierung von Komponenten im Rahmen von Non-Target-Screenings entwickelt worden. In ihr sind Informationen zu organischen Spurenstoffen, Metaboliten und deren Transformationsprodukten enthalten. Im Rahmen der Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses als auch der Teilnahme am o. g. DIN-Arbeitskreis wurde abgestimmt, dass die Daten dieses Forschungsvorhabens in DAIOS eingepflegt werden. Die Suchfunktion umfasst sowohl die Möglichkeit nach spezifischen Substanzen als auch nach massenspektrometrischen Daten zu suchen (Abbildung 67).

Abbildung 67: Suchmaske der open source Datenbank DAIOS online.

Die beispielhaft durchgeführte Suche nach dem Analgetikum Diclofenac lieferte folgenden Treffer (Abbildung 68).

Abbildung 68: Eintrag des Analgetikums Diclofenac in der Datenbank DAIOS online.

Im Rahmen der begleitenden wissenschaftlichen Untersuchungen dieses Forschungsprojektes sind zu 26 Substanzen Literaturrecherchen und teilweise auch eigene Versuche zu Transformationsprodukten durchgeführt worden. Anhand dieser Daten konnten ca. 500 Einträge erstellt werden. Die Daten umfassen:

- Angaben zur Ursprungssubstanz (Name, systematische Bezeichnung, Toxizität, Ionisierung und Elementarzusammensetzung) sowie
- Angaben zum Transformationsprodukt (Name, systematische Bezeichnung, Toxizität, Ionisierung, Elementarzusammensetzung, charakteristisches Fragmentierungsmuster, Strukturformel, Referenz, chromatographische Bedingungen)

Die Ergebnisse der Versuche und Literaturrecherchen werden in wissenschaftlichen Publikationen und auf der Homepage des IUTA (<http://www.iuta.de>) veröffentlicht. Darüber hinaus werden Teile der Daten in die open source Datenbank DAIOS online implementiert.

## 5 Diskussion und Ausblick

### 5.1 Diskussion

Hauptziele des Projektes waren die chemische und toxikologische Validierung und Bewertung oxidativer Abwasserbehandlungs-Verfahren zur Eliminierung von Mikroverunreinigungen aus Kläranlagenabläufen.

In Abstimmung mit den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses erfolgte die Auswahl von 16 relevanten Spurenstoffen zur weitergehenden Untersuchung im Rahmen dieses Forschungsprojektes. Zehn weitere, wichtigen Komponenten wurden für projektbegleitende wissenschaftliche Untersuchungen zu gebildeten Oxidationsprodukten ausgewählt.

In Rahmen der Versuche zur Oxidation im Labormaßstab in Reinstwasser konnten bei fast allen untersuchten Substanzen die Bildung von Oxidationsnebenprodukten beobachtet werden (s. Abschnitt 4.3). Bei der Untersuchung AOP-behandelter dotierter und nicht dotierter Abwasserproben konnten jedoch die aus den Versuchen mit Standardlösungen erhaltenen Ergebnisse häufig nicht bestätigt werden. Dies ist auf die niedrigen Konzentrationen und störende Matrixeinflüsse zurückzuführen, die durch den erhöhten Hintergrund die Sensitivität erheblich einschränkten und so die Detektion der erwarteten Oxidationsnebenprodukte im Spurenbereich sehr schwierig machte. Der Abbau der ausgewählten Analyten konnte jedoch auch im Kläranlagenablauf beobachtet werden und ermöglichte für einige Substanzen die Ermittlung von Abbaukinetiken für diese Matrix.

Neben der Adaptierung und Optimierung der chemischen Analysemethoden war insbesondere die Etablierung neuer toxikologischer Testverfahren für die sichere und robuste Anwendung in Kläranlagen ein erster zentraler Baustein. Die Adaptierung aller vier angewandten toxikologischen Tests an die Untersuchung wässriger Proben konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Dieses war notwendig, da es durch den osmotischen Druck des Wassers zu Veränderungen an den Zellen kommen kann. Diese Veränderungen können vielfältig sein, und Einfluss auf das Testergebnis haben. Ist die Konzentration des Wassers zu hoch, kann es zu cytotoxischen Effekten kommen und somit zu falsch positiven Ergebnissen. Eine 1:10 Verdünnung der wässrigen Proben ins Zellkulturmedium hat sich ebenso als geeignet herausgestellt wie die Zugabe von 10%igen methanolischen Lösungen nach Festphasenextraktion oder HPLC-Fraktionierung im gleichen Verhältnis. Die Untersuchungen zeigten, dass die zellbasierten Testsysteme mit Realproben und einer maximalen Methanol-Konzentration von 1 % ohne Störungen durchgeführt werden können.

Bei Proben aus Kläranlagenablauf war zusätzlich auch die mikrobielle Belastung des Wassers zu beachten. Durch Mikroorganismen im Ablauf der Kläranlagen kam es zu Kontaminationen während der Exposition der CHO Zellen. Dadurch wurden die Säugerzellen so stark geschädigt, dass eine Auswertung nicht mehr möglich war. Durch eine Sterilfiltration der Proben vor der Exposition konnten Kontamination vermieden werden, und die Tests ohne Störungen zu Ende geführt werden.

Zur Kombination von chemisch-toxikologischen Untersuchungen und der Reduzierung von Matrixeffekten konnten Methoden zur Festphasenextraktion und HPLC-Fraktionierung erfolgreich entwickelt werden. Bei der UV-Oxidation entstehende Peroxide müssen zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen mit Katalase zerstört werden, wohingegen ozonisierte Proben, wie oben bereits ausgeführt, im Verhältnis von 1:10 zur Zellsuspension ohne weitere Vorbehandlungsschritte untersucht werden konnten.

Im Hinblick auf die Wirksamkeit erweiterter Oxidationsverfahren, im speziellen der Ozonierung und der UV Oxidation, konnte ausgehend von den toxikologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Verfahren in den meisten Fällen als geeignet angesehen werden können. Für fast alle Analyten konnten weder vor noch nach der Ozonierung oder Oxidation mittels UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxische oder gentoxische Effekte nachgewiesen werden. Für Ciprofloxacin wurden auch keine mutagene Wirkungen festgestellt. Diese Ergebnisse zeigten, dass die eingesetzten Oxidationsverfahren gute Methoden sind, um diese Substanzen erfolgreich aus dem Ablauf von Kläranlagen zu eliminieren. Die in der Literatur für einige dieser Substanzen beschriebenen toxischen Effekte sind durch den Einsatz von teilweise deutlich höheren Konzentrationen begründet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass im Hinblick auf die Entwicklung der Toxizität das Oxidationsverfahren, die Behandlungsdauer und die Menge der eingesetzten Oxidantien eine wichtige Rolle spielen können. Eine Übertragung der Ergebnisse von Laborversuchen mit Reinstwasser auf Kläranlagenabläufe war nicht immer möglich. Die Technikumsversuche mit realen Abwässern unterschiedlicher Kläranlagenabläufe bestätigten allerdings die Arbeitshypothese, dass die untersuchten AOP-Verfahrensvarianten (O<sub>3</sub>, UV und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ohne die Bildung von toxikologisch relevanten Transformationsprodukten zur Spurenstoffelimination eingesetzt werden können.

Aufgrund der vielversprechenden Projektergebnisse erfolgte bereits während der Projektlaufzeit die großtechnische Umsetzung durch Mitglieder des projektbegleitenden Ausschusses (Emschergenossenschaft, Ruhrverband und Wirtschaftsbetriebe Duisburg).

Das Ziel, durch das Forschungsvorhaben die Leistungsfähigkeit der oxidativen Abwasserbehandlung zu demonstrieren, um die weitere Entwicklung und den Einsatz dieser Technologie zu fördern, wurde vollständig erreicht.

Ergänzend zu den Projektpublikationen werden die wirkstoffspezifischen Informationen sowohl auf den Seiten des IUTA als auch in der frei zugänglichen massenspektrometrische Datenbank DAIOS zu Metaboliten und Transformationsprodukten jedem Interessierten aus dem Kreis der potentiellen Anwender, insbesondere auch KMU zur Verfügung gestellt.

## 5.2 Ausblick

Sowohl Ozonung als auch UV-Oxidation konnten erfolgreich als hilfreiche Verfahren zur Eliminierung von Spurenstoffen aus der Matrix Kläranlagenablauf etabliert werden. Somit ist es Kläranlagenbetreibern möglich, zukünftige Grenzwerte für organische Spurenstoffe durch den Einsatz innovativer oxidativer Behandlungsverfahren im Ablauf von Kläranlagen einzuhalten. Die Bildung von Transformationsprodukten ist jedoch sehr wahrscheinlich. Im Rahmen des Forschungsprojektes „Oxidationsnebenprodukte“ konnte keine Erhöhung der Toxizität der Kläranlagenabläufe durch die Behandlung der Wässer mit Ozon oder UV-Oxidation nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens wurden fortlaufend auf wissenschaftlichen Tagungen und im projektbegleitenden Ausschuss veröffentlicht und finden gegenwärtig auch eine Anwendung in großtechnischen Projekten (MKULNV NRW-Projekte „Elimination von Arzneimitteln und organischen Spurenstoffen: Entwicklung von Konzeptionen und innovativen, kostengünstigen Reinigungsverfahren“). So sind z. B. im Rahmen des Teilprojektes 6 („Elimination von Arzneimittelrückständen in kommunalen Kläranlagen“) an drei Kläranlagen in Nordrhein Westfalen Vollstromozonanlagen errichtet worden. Bei den drei Kläranlagen handelt es sich um die Kläranlagen Bad Sassendorf, Schwerte und Duisburg-Vierlinden.

In Bad Sassendorf wird das Abwasser von 12.000 Einwohnergleichwerten (E) behandelt. Eine Besonderheit der Einwohner ist der hohe Altersdurchschnitt der Bevölkerung, und dass im Einzugsgebiet der Kläranlage sechs Kurkliniken liegen. Der Ozoneintrag erfolgt über Diffusoren. Der Ablauf der Kläranlage durchfließt einen Schönungsteich. Der weitere Abbau der anoxidierten Spurenstoffe wird in diesem Forschungsprojekt ebenfalls untersucht.

Die zweite ausgebaute Kläranlage befindet sich in Schwerte. Dort wird das Abwasser von 50.000 E zweistraßig behandelt. Der Abwassermix besteht jeweils zu fast 50 % aus kommunalem und industriellem Abwasser. Der Ausbau der Kläranlage mittels Pulveraktivkohledosierung und Ozondosierung durch Diffusoren erfolgte jedoch nur an einer Straße. Somit dient die unausgebaute Straße als Referenz. Das Untersuchungsprogramm sieht verschiedene PAK-Dosierungen alleine und in Kombination mit verschiedenen Ozondosen vor. Die PAK-Dosierung erfolgt ausschließlich im Rezirkulationsstrom, während die alleinige Ozonbehandlung auch nachgeschaltet betrieben werden kann.

Auf der Kläranlage Duisburg-Vierlinden sollen verschiedene Ozoneintragssysteme (Diffusor und Pumpe-Injektor) miteinander verglichen werden. So ist dort eine Vollstromozonung mit zwei separaten Ozonanlagen aufgebaut worden. Die biologische Nachbehandlung des Abwassers kann anhand eines mit Wachstumskörpern befülltem Wirbelbett untersucht werden. Das Abwasser stammt fast ausschließlich aus Haushalten mit einem Einwohnergleichwert von 30.000.

Eng mit Teilprojekt 6 ist das Teilprojekt 10 verknüpft. In diesem Projekt (Metabolitenbildung beim Einsatz von Ozon) wird sowohl eine Toxizitätsorientierte Identifizierung von relevanten Transformationsprodukten als auch eine Untersuchung auf bekannte Oxidationsnebenprodukte wie Bromat und Nitrosamine durchgeführt. Die im Rahmen dieses IGF-Forschungsvorhabens entwickelten toxikologischen Untersuchungsmethoden konnten hier bereits Eingang in die Praxis finden. Erste Teilergebnisse sind in Form einer Projektpräsentation veröffentlicht:

<http://www.spurenstoffe.net/index.php/de/projekte/teilprojekt-10>

Einzelauftrag 8 (Ertüchtigung kommunaler Kläranlagen durch den Einsatz von Verfahren mit UV-Behandlung) beschäftigt sich mit dem Einsatz von UV-Verfahren zur Behandlung des vorgereinigten Abwassers. In einer zweiten Projektphase soll demnächst eine UV-Behandlungseinheit auf der Kläranlage Essen-Süd installiert werden (<http://www.spurenstoffe.net/images/stories/download/Schulze-Hennings.pdf>).

Weitere Teilprojekte dieser Ausschreibung beschäftigen sich mit Industriechemikalien, Krankenhäusern, dem Einsatz von Aktivkohle, dem Einsatz der Membrantechnik, und dem volkswirtschaftlichen Nutzen. Informationen zu diesen und weiteren Projekten sind auf der Internetseite <http://www.spurenstoffe.net/> zu finden.

## 6 Gegenüberstellung der erzielten Ergebnisse mit den im Forschungsantrag beabsichtigten Zielen

Die enge Zusammenarbeit der drei Forschungsstellen hat sich als sehr effektiv herausgestellt. Aufgrund der Vielzahl der untersuchten Substanzen erfolgte zusätzlich zu den am IUTA bereits vorhandenen Labor- und Technikumsanlagen auch an der Universität Duisburg – Essen der Aufbau einer einfachen Laboranlage zur Ozonung an der Universität Duisburg – Essen. Hierdurch konnten insbesondere die grundlegenden Untersuchungen zur Identifizierung von Oxidationsnebenprodukten im Vergleich zu den im Antrag geplanten Arbeiten deutlich erweitert werden.

Ursprünglich vorgesehene parallele TOC-Untersuchungen haben sich als nicht aussagekräftig herausgestellt. Stattdessen erfolgten stoffspezifische Quantifizierungen und die Ermittlung von Abbaukinetiken für die ausgewählten Substanzen.

Sämtliche geplanten Arbeitspakete wurden durchgeführt. Zum Soll-/Ist-Vergleich des Arbeits- und Zeitplans sind abweichend durchgeführte Tätigkeiten in Tabelle 22 schraffiert markiert. Im Vergleich zum Antrag ist es in den Arbeitspaketen 3.3.2, 3.3.4 und 3.3.5 zu Verzögerungen gekommen, wodurch auch Arbeitspaket 3.3.7 erst deutlich später gestartet werden konnte. Aufgrund dieser Tatsache ist auch eine Verlängerung des Arbeitspaketes 3.3.8 notwendig gewesen. Durch eine kostenneutrale Projektverlängerung um 6 Monate konnten alle geplanten Arbeiten wie beantragt durchgeführt und die Ziele des Forschungsvorhabens erreicht werden.

Eine Aufstellung aller beantragten und durchgeführten Arbeitsschritte ist in Tabelle 23 zu finden. In Abstimmung mit dem projektbegleitendem Ausschuss wurden einige Arbeiten verworfen und durch andere Arbeitspakete ersetzt. So führte zum Beispiel der Abgleich von TOC und Substanzabbau zu keiner aussagekräftigen Korrelation und wurde somit durch stoffspezifische Quantifizierungen und die Ermittlung von Abbaukinetiken für ausgewählte Substanzen ersetzt.

**Tabelle 22: Zeitplan der Arbeitspakete des Forschungsvorhabens.**

	Zeitraum (Quartal)											FS	
	2008	2009				2010				2011			
	I	I	II	III	IV	I	II	III	IV	V	I		II
Projektkoordination und –verwaltung	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	IUTA
3.3.1 Auswahl und Priorisierung repräsentativer Markersubstanzen	■												DUE, IUTA, AM
3.3.2 Begleitende wissenschaftliche Untersuchungen zu Oxidationsprodukten	■	■	▨	▨	▨	▨					▨		DUE, IUTA,
3.3.3 Evaluierung und Erweiterung der chemischen Analysemethoden für Oxidations(neben)produkte		■	■	■									DUE
3.3.4 Adaptierung und Optimierung toxikologischer Testmethoden für Kläranlagenabläufe		■	■	■	■	▨	▨	▨	▨	▨			AM
3.3.5 AOP-Modellversuche zur Identifizierung von potentiell problematischen Oxidationsprodukte und priorisierten Markersubstanzen			■	■	■	▨	▨	▨	▨	▨	▨		IUTA, DUE, AM
3.3.6 Laborversuche mit realen Abläufen kommunaler Kläranagen in Batch-Betrieb incl. Bilanzierung der Substanzen				■	■	■	▨						IUTA, DUE
3.3.7 Technikumsversuche an einer Kläranlage									▨	▨	▨		IUTA, DUE
3.3.8 Untersuchungen zur Toxizität von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen sowie anfallender Extrakte der Ablaufproben			■	■	■	■	■	■	▨	▨	▨		AM
3.3.9 Erstellung einer Datenbank über Oxidationsnebenprodukte				■			■	■	▨	▨	▨		IUTA, DUE
Auswertung, Erstellung von Zwischenberichten und Abschlussbericht						■					■	■	

■ Arbeitspaket entsprechend dem Forschungsantrag durchgeführt  
 ▨ Verlängerte Arbeitspaket-Bearbeitung

**Tabelle 23: Aufstellung der geplanten und durchgeführten Arbeitsschritte.**

AP	Durchführung laut Antrag	Tatsächliche Durchführung
3.3.1	In Zusammenarbeit mit PA: Auswahl repräsentativer Markersubstanzen	In Zusammenarbeit mit PA: Auswahl repräsentativer Markersubstanzen
3.3.2	Projektbegleitende Recherche zu in der Literatur beschriebenen Oxidationsprodukten Beschaffung von Standards und käuflich erwerblichen Oxidationsnebenprodukten	Projektbegleitende Recherche zu in der Literatur beschriebenen Oxidationsprodukten Beschaffung von Standards und käuflich erwerblichen Oxidationsnebenprodukten
3.3.3	Vergleich der Analysemethoden mit der Literatur Anpassung der Methoden an in 3.3.1 ausgewählte Substanzen Aufbau von neuen Quantifizierungsmethoden Erarbeitung von Probenvorbereitungsmethoden Untersuchungen zu Stabilität und Fraktionierbarkeit Erarbeitung von SPE-Methoden, Lagerung in DMSO	Vergleich der Analysemethoden mit der Literatur Anpassung der Methoden an in 3.3.1 ausgewählte Substanzen Aufbau von neuen Quantifizierungsmethoden Erarbeitung von Probenvorbereitungsmethoden Untersuchungen zu Stabilität und Fraktionierbarkeit Erarbeitung von SPE-Methoden, Lagerung in MeOH
3.3.4	Adaptierung und Optimierung toxikologischer Testmethoden an die Matrix Kläranlagenablauf	Adaptierung und Optimierung toxikologischer Testmethoden an die Matrix Kläranlagenablauf
3.3.5	Durchführung von Oxidationsversuchen in Reinstwasser anhand hochdotierter Modellsubstanzen (Mineralisierung möglich?)  Korrelation von Abbauverhalten und TOC  Durchführung von toxikologischen Untersuchungen mit nicht komplett mineralisierten Proben Untersuchung aller Proben durch alle drei beteiligten Forschungsstellen IUTA: Durchführung der Oxidationsversuche im Labor- und Pilotmaßstab  UDE: Durchführung der chemischen Analysen an den von IUTA hergestellten Proben, Bilanzierung der Substanzen  AM: Durchführung von toxikologischen Untersuchungen an den vom IUTA hergestellten Proben	Durchführung von Oxidationsversuchen in Reinstwasser anhand hochdotierter Modellsubstanzen (Mineralisierung möglich, aber nicht wirtschaftlich!)  Korrelation nicht möglich - Stattdessen stoffspezifische Quantifizierungen und Ermittlung von Abbaukinetiken für ausgewählte Substanzen  Durchführung von toxikologischen Untersuchungen mit nicht komplett mineralisierten Proben  IUTA: Durchführung der Oxidationsversuche im Labor- und Pilotmaßstab Zusätzlich: LC-MS/MS Untersuchungen  UDE: Zusätzlich: Durchführung von Ozonexperimenten  UDE: Durchführung der chemischen Analysen an den von UDE hergestellten Proben, Ermittlung von Abbaukinetiken für ausgewählte Substanzen  AM: Durchführung von toxikologischen Untersuchungen an den vom IUTA und UDE hergestellten Proben

<b>AP</b>	<b>Durchführung laut Antrag</b>	<b>Tatsächliche Durchführung</b>
3.3.6	<p>Durchführung von Oxidationsversuchen in Kläranlagenabläufen anhand im Labormaßstab</p> <p>Untersuchung aller Proben durch alle drei beteiligten Forschungsstellen</p> <p>IUTA: Durchführung der Oxidationsversuche</p> <p>UDE: Durchführung der chemischen Analysen an den von IUTA hergestellten Proben, Bilanzierung der Substanzen</p> <p>AM: Durchführung von toxikologischen Untersuchungen an den vom IUTA hergestellten Proben</p>	<p>Durchführung von Oxidationsversuchen in Kläranlagenabläufen anhand im Labormaßstab</p> <p>IUTA: Durchführung der Oxidationsversuche Zusätzlich: LC-MS/MS Untersuchungen</p> <p>AM: Durchführung von toxikologischen Untersuchungen an den vom IUTA hergestellten Proben</p>
3.3.7	<p>Durchführung von Technikumsversuchen an einer Kläranlage mit der im Rahmen des Projektes neu angeschafften UV-Durchflussanlage und bereits auf der Kläranlage Bottrop installierten Anlagen zu Ozonung und UV-Oxidation</p>	<p>Durchführung von Technikumsversuchen an einer Kläranlage mit der Durchflussanlage</p> <p>Zusätzlich: Ausweitung der Untersuchungen der Durchflussanlage und Untersuchungen zum Non-Target-Screening. Aufgrund des Ende 2009 gestarteten Großprojektes an der KA Bad Sassendorf erfolgte der Abbau der Ozon-Pilotanlage an der KA Bottrop. Auf vergleichende O<sub>3</sub>-UV-Untersuchungen wurde in Abstimmung mit dem PA verzichtet und stattdessen eine intensivere Untersuchung der UV-Oxidation im Pilotmaßstab durchgeführt.</p> <p>Im Anschluss des Forschungsvorhabens erfolgen weitere Untersuchungen mit der angeschafften Anlage an der KA Duisburg – Rheinhausen.</p>
3.3.8	<p>Untersuchungen zur Toxizität von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen, sowie anfallender Extrakte</p>	<p>Untersuchungen über den gesamten Projektverlauf fortlaufend durchgeführt</p>
3.3.9	<p>Erstellung einer Datenbank über Oxidationsnebenprodukte</p>	<p>Erstellung einer Datenbank über Oxidationsnebenprodukte und Implementierung von Teilergebnissen in die open source Datenbank DAIOS online</p>

## **7           Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)**

### **7.1         Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse**

Die hier vorgestellten Verfahren und die Forschungsergebnisse sind insbesondere im Bereich der kommunalen und industriellen Abwasserbehandlung und Abwassertechnik von Interesse, finden aber auch in der dezentralen Abwasserreinigung häufig Anwendung. Entsprechend Anlage 1 des Fragebogens zur Einschätzung der erzielten Forschungsergebnisse kann eine Zuordnung zu den Fachgebieten Chemie, Mikrobiologie, Umwelttechnik, Elektrotechnik, Mess-, Regel- und Automatisierungstechnik vorgenommen werden. Zu den Wirtschaftszweigen (gemäß Anlage 2), in denen die Ergebnisse einsetzbar sind, zählen die Chemische Industrie, Energie- und Wasserversorgung sowie Dienstleistungen, die überwiegend für Unternehmen erbracht werden. Eine Nutzung ist darüber hinaus in allen Branchen bei der Entsorgung und Behandlung von Prozess- und Abwässern möglich. Insbesondere Abwasserverbände sowie Betreiber von kommunalen und industriellen Abwasserbehandlungsanlagen profitieren direkt von den Projektergebnissen.

Eine Umsetzung findet derzeit bereits im großtechnischen Maßstab statt. Nach einer ersten Studie in der Schweiz erfolgte am 06.11.2009 die Inbetriebnahme einer Ablaufozonung an der Kläranlage Bad Sassendorf und am 06.10.2010 an der Kläranlage Schwerte. In Duisburg – Vierlinden wird am 14.10.2011 die dritte deutsche Anlage zur Ablaufozonung mit dem Ziel der Spurenstoffelimination in Betrieb genommen. Im Gegensatz zur Anlage in Regensdorf (Schweiz) sind alle drei Anlagen nach einem ersten Forschungsbetrieb für den Dauerbetrieb ausgelegt. [MUNLV TP 6, 10, 8, Schweiz]. Das Projektteam des IGF-FV „Oxidationsnebenprodukte“ ist an den weiterführenden Forschungsarbeiten dieser drei großtechnischen Anlagen beteiligt.

Die kritische Frage nach toxikologisch bedenklichen Oxidationsnebenprodukten konnte mittels der im Rahmen des dieses Forschungsvorhabens im Labor- und Pilotmaßstab erlangten Ergebnisse beantwortet werden. Mit Hilfe der verwendeten Teststrategie konnten keinerlei toxikologisch bedenklichen Effekte durch die Oxidation von Reinstwasser und Kläranlagenabläufen ermittelt werden.

## 7.2 **Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU**

Das öffentliche Interesse an einer Verringerung von Mikroverunreinigungen wie Arzneimitteln, Personal Care Produkten, endokrin wirksamen Industriechemikalien etc. in die Umwelt ist in den letzten Jahren stark gestiegen, so dass das Vorhalten einer entsprechend weit entwickelten Technologie für die in diesem Bereich tätigen KMU einen erheblichen Wettbewerbsvorteil darstellt. Die Umsetzung der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) erfordert die Optimierung der heutigen Kläranlagentechnik und Ausstattung kommunaler und industrieller Kläranlagen mit zusätzlichen Behandlungsstufen zur Gewährleistung der Grundforderung der EU liefert hier einen wichtigen Beitrag zur Schaffung eines Marktes für die weitergehende Behandlung von kommunalem Abwasser, da die Gewässer nach WRRL in einem guten ökologischen und chemischen Zustand zu überführen sind.

In Deutschland gibt es derzeit 6659 kommunale Kläranlagen [254], von denen eine erhebliche Anzahl mit ihren Emissionen die Oberflächengewässer beeinflussen und somit zu Verstößen gegen die Umweltqualitätsnormen der OgewV und EU WRRL beitragen.

Neben diesem primären Einsatzort der neuen Technologie ergibt sich eine Vielzahl weiterer Nutzungsmöglichkeiten. In weniger entwickelten Regionen werden z. B. von potenziellen Herstellern außerdem wichtige Einsatzfelder im Bereich der dezentralen Wasseraufbereitung aus Grund- und Brackwasser gesehen. Die Hygienisierung von kommunalen Abwässern und Konditionierung von Belebtschlamm sind weitere Anwendungsfelder, insbesondere dort, wo Kläranlagen, wie z. B. an der Isar in die Nähe von Badegewässern einleiten. Die Konditionierung des Belebtschlammes ist durch vermehrte Blähschlamm-Bildung bei warmer Witterung für alle Anlagenbetreiber interessant. Nimmt dieses Phänomen überhand, wird der Belebtschlamm aus der Anlage ausgetragen und in die Gewässer eingetragen. Dies hat hohe Abwasserabgaben für den Betreiber ebenso wie längere Rekonditionierungsphasen zur Folge. Oxidative Verfahren können auch bei der Lösung dieses Problems helfen. Vor der Realisierung der verschiedenen Anwendungen spielt allerdings immer wieder die Frage nach der Bildung von Oxidationsnebenprodukten und deren ökotoxikologischer Bewertung eine zentrale Rolle. Durch die in diesem Forschungsvorhaben gewonnenen Erkenntnisse konnten wichtige Hinweise und Methoden zur chemisch-toxikologischen Überprüfung neuer Verfahren und Anwendungen gegeben werden. KMU wurde ermöglicht zukünftig Fragen nach toxikologisch bedenklichen Transformationsprodukten wissenschaftlich zu begegnen und somit die Technik der erweiterten Oxidationsverfahren weltweit zu vermarkten.

Auch aus Sicht der Abwasserverbände sind die erweiterten Oxidationsverfahren die nach Kosten/Nutzenbetrachtungen effizientere Technik (gegenüber der Nanofiltration) zur Entfernung organischer Spurenstoffe aus den Abläufen der Kläranlagen.

## 8 Transfer der Ergebnisse in die Wirtschaft

Die Forschungsergebnisse sollten während der Projektlaufzeit den im projektbegleitenden Ausschuss (PA) vertretenen KMU, Verbänden und der interessierten Öffentlichkeit zeitnah zugänglich gemacht werden. Hierzu sind die in Tabelle 24 aufgeführten Transfermaßnahmen durchgeführt worden.

**Tabelle 24: Umgesetzte Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.**

Medium	Termin	Thema	Zielgruppe
1. PA Sitzung	04.12.2008	Projektvorstellung	PA Mitglieder
3. CPW-Wasserseminar für die Getränke- und Lebensmittelindustrie, Waidring Tirol, Österreich	24.-25.06.2009	Vortrag	ca. 100 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
18 <sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, IMSC 2009, Bremen, Deutschland	30.08.-04.09.2009	Posterpräsentation	ca. 1800 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
2. PA Sitzung	26.10.2009	Präsentation der ersten Projektergebnisse	PA Mitglieder
IUTA Tätigkeitsbericht 2009		Bericht über erste Teilergebnisse	Wirtschaft und Wissenschaft
International Conference and Exhibition on Water in the Environment; Stellenbosch, South Africa	02.-04.03.2009	Posterpräsentation	ca. 80 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
GDCh-Fachgruppentagung Umweltchemie und Ökotoxikologie	23.-25.09.2009	2 Poster mit ersten Ergebnissen	ca. 200 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
Analytica 2010, München, Deutschland	23.-25.03.2010	Posterpräsentation	Fachmesse für Analytik, ca. 32.000 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft

<b>Medium</b>	<b>Termin</b>	<b>Thema</b>	<b>Zielgruppe</b>
IOA3 Konferenz, Genf	28.-30.04.2010	Vortrag	ca. 120 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft
Tagung der Wasserchemischen Gesellschaft	10.-12.05.2010	2 Poster mit Projektergebnissen	ca. 250 Fach- und Führungskräfte aus der Wasserwirtschaft
SETAC 2010, Sevilla, Spanien	23.-27.05.2010	4 Poster mit Projektergebnissen	ca. 3000 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
3. PA Sitzung	08.06.2010	Präsentation der Projektergebnisse	PA Mitglieder
MHUT – Mülheimer Unternehmer Treff, Mülheim, Deutschland	08.06.2010	Vortrag	ca. 30 Unternehmens- vertreter
Genotoxicity in aquatic systems, Freiburg, Germany	22.-24.09.2010	Vortrag	ca. 100 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft
Langenauer Wasserforum 2010, Langenau, Deutschland	08.-09.11.2010	Vortrag und 3 Poster mit Projektergebnissen	ca. 220 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft
5th Biodetectors Conference 2010, Amsterdam, Niederlande	14.-15.10.2010	Vortrag	ca. 60 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft
IUTA Tätigkeitsbericht 2010		Bericht über Teilergebnisse	Wirtschaft und Wissenschaft
4. Sitzung der Arbeitsgruppe „Non- Target Screening“, Frankfurt, Deutschland	24.02.2011	Vortrag	ca. 10 Teilnehmer aus Wirtschaft und Wissenschaft
4. PA Sitzung	06.04.2011	Präsentation der Projektergebnisse	PA Mitglieder
Tagung der Wasserchemischen Gesellschaft	30.05.- 01.06.2011	Vortrag und Posterpräsentation	ca. 300 Fach- und Führungskräfte aus der Wasserwirtschaft

Medium	Termin	Thema	Zielgruppe
3 <sup>rd</sup> Seminar of European PhD Students on Water and Health, Cannes, Frankreich	2.9-29.06.2011	Vortrag	ca. 60 Teilnehmer aus Wissenschaft
UBA-Workshop Monitoring von Arzneimitteln in der Umwelt	14.-15.09.2011	Posterpräsentation	ca. 100 Teilnehmer aus Behörden, Wirtschaft und Wissenschaft
Langenauer Wasserforum 2011, Langenau, Deutschland			ca. 220 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft
IUTA Workshop 2012			ca. 30 Vertreter aus Wirtschaft und Wissenschaft
IFAT 2012			Wirtschaft und Wissenschaft
AOP 2013			ca. 300 Fach- und Führungskräfte der Wasserwirtschaft

Des Weiteren gehen die Ergebnisse des Projektes an den direkt und indirekt beteiligten Hochschulen in das Lehrangebot ein. Hierzu wurden im Rahmen des Studiengangs „Water Science“ von IUTA und DUE mehrere sechswöchige Praktika zur Ozonung von Spurenstoffen für Master-Studenten angeboten. Das Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin (AM) am Universitätsklinikum Essen bietet für Masterstudenten des Studienganges „Toxikologie“ und für Studenten des Masterstudienganges „Medizinische Biologie“ Praktika und Seminare an.

## 8.1 Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes wurden und werden die Ergebnisse einem breiten Interessenskreis durch Publikationen, Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen und Konferenzen vorgestellt. Nachfolgend sind die aus diesem Forschungsvorhaben resultierenden Veröffentlichungen und Abschlussarbeiten aufgeführt.

### 8.1.1 Publikationen

Teutenberg, T.; Türk, J. Nachweis von Spurenstoffen und Transformationsprodukten mittels Massenspektrometrie: Welche Rolle spielt die Chromatografie? Analytik news, Publikationsdatum: 10.12.2010, <http://www.analytik-news.de/Fachartikel/2010/72.html>.

Janzen, N., Dopp, E., Hesse, J., Richard, J., Türk, J., Bester, K. Transformation products and reaction kinetics of fragrances in advanced wastewater treatment with ozone. Chemosphere, CHEM23290R1, akzeptiert.

Türk, J., Richard, J., vom Eyser, C., Börgers, A., Bester, K., Dopp, E. Chemical and toxicological evaluation of by-products during oxidative treatment of waste water treatment plant effluents. Journal Ing. Ozonation (IOA), 2011, eingereicht.

Richard, J., Börgers, A., vom Eyser, C., Bester, K., Türk, J., Dopp, E. In vitro toxicity of four micropollutants before and after oxidative waste water treatment. Journal of Toxicology, Special Issue "Water contaminants and Health", eingereicht.

vom Eyser, C., Boergers, A., Bester, K., Dopp, E., Tuerk, J. Chemical and biological evaluation of transformation products from ofloxacin degradation via ozonation and UV-oxidation. Water Research, eingereicht.

Chen, X., Richard, J., Dopp, E., Türk, J., Liu, Y., Bester, K. Ozonisation products of triclosan in advanced wastewater treatment. Water Research, eingereicht.

Wolff, M., Janzen, N., Richard, J., Dopp, E., Tuerk, J., Bester K. Oxidation of the s-Triazine herbicide Terbutryn with ozone – reaction kinetic, by-product identification and toxicity evaluation. in Vorbereitung.

Börgers, A., Richard, J., Bester, K., Dopp, E., Türk, J. Chemische und toxikologische Charakterisierung von Oxidationsnebenprodukten, in Vorbereitung.

### 8.1.2 Vorträge

Tuerk, J.; Sayder, B.; Vitz, H.; Kiffmeyer, T.K.; Kabasci, S. Eliminierung von Spurenstoffen mittels erweiterter Oxidationsverfahren (AOP). 3. CPW-Wasserseminar für die Getränke- und Lebensmittelindustrie, Waidring (Tirol, Österreich), 24./25.06.2009.

Richard J.; Boergers A.; Tuerk J.; Bester K.; Dopp E. Genotoxic properties of water contaminants before and after oxidative waste water treatment. 3<sup>rd</sup> International Symposium Genotoxicity in aquatic systems: Causes, effects and future needs, Freiburg, Deutschland, 22.09.-24.09.2010.

Richard J.; Börgers A.; vom Eyser C.; Bester K.; Türk J.; Dopp E. Assessment of genotoxicity and estrogen-like activity in ozone treated waste water. BioDetectors 2010, Amsterdam, Niederlande, 14.10.-15.10.2010.

Tuerk, J.; Boergers, A.; Richard, J.; Dopp, E.; Wolff, M.; Janzen, N.; Tavian, M.; Chen, X.; Bester, K. Chemical and toxicological identification of by-products during oxidative waste water treatment. Ozone & Related Oxidants: Solutions for Emerging Pollutants of Concern to the Water and the Environment. IOA-E3G International Conference, April 28 - 30, 2010 - Geneva, Switzerland.

Türk, J. Abwasserreinigung - Elimination von Spurenstoffen aus Abwässern. MHUT – Mülheimer Unternehmer Treff, Mülheim, Deutschland, 08.06.2010.

Türk, J.; Teutenberg, T. Nachweis von Spurenstoffen und Transformationsprodukten mittels Massenspektrometrie – Welche Rolle spielt die Chromatografie? Langenauer Wasserforum 2010, Langenau, Deutschland, 08.11.–09.11.2010.

Zedda, M., Türk, J., Börgers, A., Richard, J., Dopp, E., Wolff, M., Janzen, N., Tavian, M., Chen, X., Bester, K. Kurzzusammenfassung IGF-FV 15862 N (Oxidationsnebenprodukte) und Methoden-beschreibung „Non-Target Screening“. 4. Sitzung der Arbeitsgruppe „Non-Target Screening“, Frankfurt, 24.02.2011.

Dopp, E., Richard, J., Börgers, A., vom Eyser, C., Chen, X., Bester, K., Türk, J. Toxikologische Beurteilung von Spurenstoffen im Abwasser vor und nach der oxidativen Abwasserbehandlung. Wasser 2011, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Norderney, 30.05.-01.06.2011.

Richard, J., Börgers, A., vom Eyser, C., Chen, X., Janzen, N., Bester, K., Türk, J., Dopp, E. Toxicological evaluation of micropollutants in waste water treatment plant effluents before and after oxidative treatment. 3<sup>rd</sup> Seminar of European PhD Students on Water and Health, Cannes, 27.06.-29.06.2011.

#### 8.1.4 Posterpräsentationen

Cyris, M.; Tuerk, J.; Bester, K.; Dopp, E.; Schmidt, T. Investigations for assessment and prevention of toxic oxidation by-products in oxidative waste water treatment. International Conference and Exhibition on Water in the Environment, Stellenbosch, South Africa, 02.-04.03.2009.

Tavian, M.; Janzen, N.; Wolff, M.; Zedda, M.; Richard, J.; Chen, X.; Dopp, E.; Tuerk, J.; Bester, K.; Identification of oxidation by-products in poststream ozonisation in waste water treatment plants Part A: Chemical Identification. Jahrestagung 2009 der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Stoffverhalten und -wirkungen in Umweltkompartimenten. Trier, 23.-25.09.2009.

Richard, J; Tavian, M.; Janzen, N.; Gerhards, M.; Chen, X.; Tuerk, J.; Bester, K.; Dopp, E. Identification of oxidation by-products in post stream ozonisation in waste water treatment plants Part B: Toxicity directed evaluation-identification. Jahrestagung 2009 der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Stoffverhalten und -wirkungen in Umweltkompartimenten. Trier, 23.-25.09.2009.

Zedda, M.; Türk, J.; Börgers, A.; Portner, C.; Schmidt, T.C. New strategies for non-target analysis of oxidation by-products using linear ion trap and QTOF. 18<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, IMSC 2009, Bremen, Deutschland, 30.08.–04.09.2009.

Janzen, N.; Tavian, M.; Wolff, M.; Richard, J.; Dopp, J.; Tuerk, J.; Bester, K. Ozonation of the polycyclic musks HHCB and AHTN and identification of oxidation by-products. Wasser 2010, 10.-12.05.2010, Bayreuth, Deutschland.

Boergers, A.; Richard J.; Dopp E.; Bester K.; Tuerk J. Identification of oxidation by-products during oxidative waste water treatment. Part 1: Oxidative processes and chemical analysis. SETAC 2010, Sevilla, Spanien, 23.05.-27.05.2010.

Richard J.; Boergers A.; Chen X.; Tavian M.; Janzen N.; Bester K.; Dopp E.; Tuerk J. Identification of oxidation by-products during oxidative waste water treatment. PART 2: TOXICOLOGICAL IN VITRO ANALYSES, SETAC 2010, Sevilla, Spanien, 23.05.-27.05.2010.

Türk, J.; Börgers, A.; Richard, J.; Dopp, E.; Janzen, N.; Tavian, M.; Wolff, M.; Chen,; Bester, K. Chemische und toxikologische Evaluierung von Transformationsprodukten bei der oxidativen Abwasserbehandlung. Wasser 2010, 10.-12.05.2010, Bayreuth, Deutschland.

Tavian, M.; Becker, C.; Eltfeld, J.; Wolff, M.; Janzen, N.; Börgers, A.; Richard, J.; Chen, X.; Dopp, E.; Türk, J.; Bester, K. Identification of oxidation by-products of Atenolol in post-stream ozonation in waste water treatment plants. Analytica Conference 2010, München, Deutschland, 23.03.-25.03.2010.

Wolff, M.; Janzen, N.; Tavian, M.; Chen, X.; Richard, J.; Dopp, E.; Türk, J.; Bester, K. Identification and toxicity evaluation of oxidation by-products of the biocide Terbutryn oxidized with ozone. SETAC 2010, Sevilla, Spanien, 23.05.-27.05.2010.

vom Eyser, C., Börgers, A., Richard, J., Dopp, E., Bester, K., Türk, J. Chemical and biological evaluation of ofloxacin transformation products. Wasser 2011, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Norderney, 30.05.-01.06.2011.

Börger, A.; vom Eyser, C., Raab, J., Richard, J.; Dopp, E.; Wolff, M.; Bester, K., Türk, J. Untersuchungen zur Bewertung und Vermeidung von toxischen Oxidationsnebenprodukten bei der oxidativen Abwasserbehandlung. UBA-Workshop Monitoring von Arzneimitteln in der Umwelt, Dessau, 14.-15.09.2011.

## 8.2 Abschlussarbeiten

Annika Kruit: Evaluierung von verschiedenen Testsystemen zur Bestimmung der Östrogenität von Kläranlagenabläufen. Bachelorarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen; 1.6.2010 – 21.9.2010.

Helena Bielak: Toxikologische Untersuchung von Arzneimittelrückständen im Abwasser vor und nach der UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung. Bachelorarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen; 4.2.2011 – 6.6.2011.

Claudia vom Eyser: Degradation of Fluoroquinolones Ofloxacin and Ciprofloxacin via Ozonation and UV-Oxidation. Masterarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen; 01.07.2010 - 03.01.2011.

Julia Raab: Evaluierung von UV-Oxidationsversuchen zur Behandlung von Kläranlagenabläufen. Bachelorarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen; 04.10.2010 - 07.02.2011.

Julia Hesse: Ozonation of micropollutants and identification of transformation products. Masterarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen, 01.07.2010 - 03.01.2011.

Andreas Kremser: Identification of selected oxidation by-products of selected biocides by different reactions. Bachelorarbeit, Studiengang Water Science, Fachbereich Chemie, Universität Duisburg-Essen, 01.06.2010 - 02.11.2010.

### 8.3 Projektbearbeiter

Projektleiter: Herr Dr. Jochen **Türk** (IUTA)  
Herr Christian **Becker** (UDE)  
Herr PD Dr. Kai **Bester** (UDE)  
Frau Helena **Bielak** (AM)  
Frau Andrea **Börgers** (IUTA)  
Frau Xijuan **Chen** (UDE)  
Frau Maike **Cyris** (IUTA)  
Frau Prof. Dr. Elke **Dopp** (AM)  
Herr Philip **Eickenbusch** (AM)  
Herr Jörg **Eltfeld** (UDE)  
Frau Claudia **vom Eyser** (IUTA)  
Herr Johannes **Fleischer** (AM)  
Frau Melanie **Gerhards** (AM)  
Frau Julia **Hesse** (UDE)  
Herr Niklas **Janzen** (UDE)  
Herr Andreas **Kremser** (UDE)  
Frau Annika **Kruit** (IUTA, AM)  
Herr Bernd **Niederstrasser** (UDE)  
Frau Elisabeth **Preckel** (AM)  
Frau Julia **Raab** (IUTA)  
Frau Dr. Ursula **von Recklinghausen** (AM)  
Frau Jessica **Richard** (AM)  
Frau Xenia **Szeleczki** (IUTA)  
Herr Mauro **Tavian** (UDE)  
Herr Marco **Wolff** (UDE, IUTA)

#### 8.4 Autoren des Schlussberichtes

Projektleiter: Herr Dr. Jochen **Türk** (IUTA)

Herr PD Dr. Kai **Bester** (UDE)

Frau Andrea **Börgers** (IUTA)

Frau Prof. Dr. Elke **Dopp** (AM)

Herr Jörg **Eltfeld** (UDE)

Frau Claudia **vom Eyser** (IUTA)

Herr Niklas **Janzen** (UDE)

Frau Julia **Raab** (IUTA)

Frau Jessica **Richard** (AM)

Herr Marco **Wolff** (UDE, IUTA)

## 9 Literaturverzeichnis

1. Frimmel, F.H. and M.B.E. Müller, *Heil-Lasten - Arzneimittelrückstände in Gewässern. 10. Berliner Kolloquium der Gottlieb Damler- und Karl Benz-Stiftung*. 2006, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
2. Gottschalk, C., J.A. Libra, and A. Saupe, *Ozonation of Water and Waste Water*. 2000, Weinheim: Wiley-VCH.
3. Oppenländer, T., *Photochemical purification of water and air: advanced oxidation processes (AOPs): principles, reaction mechanisms, reactor concepts*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
4. von Sonntag, C., *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair - A Chemical Perspective*. 2006, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
5. Niessner, R., A. Wenzel, and A. Gahr, *TOC-removal and degradation of pollutants in leachate using a thin-film photoreactor*. *Water Research*, 1999. **33**(4): p. 937-946.
6. Vollmuth, S. and R. Niessner, *Degradation of Pcdd, Pcdf, Pah, Pcb and Chlorinated Phenols during the Destruction Treatment of Landfill Seepage Water in Laboratory Model Reactor (Uv, Ozone, and Uv/Ozone)*. *Chemosphere*, 1995. **30**(12): p. 2317-2331.
7. Schumacher, J., Y.Z. Pi, and M. Jekel, *Ozonation of persistent DOC in municipal WWTP effluent for groundwater recharge*. *Water Science and Technology*, 2004. **49**(4): p. 305-10.
8. Valdes, H., C.A. Zaror, and M. Jekel, *Kinetic study of reactions between ozone and benzothiazole in water*. *Water Science and Technology*, 2003. **48**(11-12): p. 505-10.
9. Vidal, G., et al., *Combined oxidative and biological treatment of separated streams of tannery wastewater*. *Water Science and Technology*, 2004. **49**(4): p. 287-92.
10. Frimmel, F.H., C. Zwiener, and G. Kleiser, *Oxidationsverfahren in der Wasseraufbereitung*. *Nachrichten aus der Chemie*, 2000. **48**(1): p. 32-35.
11. Schroder, H.F. and R.J.W. Meesters, *Stability of fluorinated surfactants in advanced oxidation processes - A follow up of degradation products using flow injection-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple stage mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1082**(1): p. 110-119.

12. Niessner, R., M. Seiss, and A. Gahr, *Improved AOX degradation in UV oxidative waste water treatment by dialysis with nanofiltration membrane*. Water Research, 2001. **35**(13): p. 3242-3248.
13. Huber, M.M., et al., *Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(11): p. 4290-9.
14. Ternes, T.A., et al., *Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?* Water Research, 2003. **37**(8): p. 1976-82.
15. *Richtlinie 76/474/EWG des Rates vom 4. Mai 1976 betreffend der Verschmutzung infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft*. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L129, 1976.
16. Umweltbundesamt, *Bericht der Bundesrepublik Deutschland zur Durchführung der Richtlinie 76/464/EWG und Tochterrichtlinien betreffend die Verschmutzung der Oberflächengewässer infolge der Ableitung bestimmter gefährlicher Stoffe in die Gewässer der Gemeinschaft 2002-2004*.
17. Bester, K., *Polycyclic musks in the Ruhr catchment area - transport, discharges of waste water, and transformations of HHCB, AHTN and HHCB-lactone*. Journal of Environmental Monitoring, 2005. **7**(1): p. 43-51.
18. Buerge, I.J., et al., *Behavior of the polycyclic musks HHCB and AHTN in lakes, two potential anthropogenic markers for domestic wastewater in surface waters*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(24): p. 5636-5644.
19. Schirmer, K., et al., *Application of non standard toxicity tests for risk assessment of human pharmaceuticals and personal care products*. SETAC - Europe, 7.-11. May 2006, Den Haag.
20. Bester, K., *Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant*. Chemosphere, 2004. **57**(8): p. 863-70.
21. Bester, K., *Personal Care Compounds in the Environment - Pathways, Fate and Methods for Determination*. 2006, Weinheim: Wiley-VCH.

22. Bester, K., et al., *Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight II: Polycyclic musk fragrances*. Water Research, 1998. **32**(6): p. 1857-1863.
23. Kolpin, D.W., et al., *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance*. Environmental Science & Technology, 2002. **36**(6): p. 1202-11.
24. Adolfsson-Erici, M., et al., *Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden*. Chemosphere, 2002. **46**(9-10): p. 1485-1489.
25. Bester, K., *Triclosan in a sewage treatment process - balances and monitoring data*. Water Research, 2003. **37**(16): p. 3891-3896.
26. Bester, K., *Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2005. **49**(1): p. 9-17.
27. McAvoy, D.C., et al., *Measurement of triclosan in wastewater treatment systems*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002. **21**(7): p. 1323-1329.
28. Wilson, B.A., et al., *Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(9): p. 1713-1719.
29. Ferrer, I., et al., *Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater samples*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2004. **18**(4): p. 443-50.
30. McNeill, K., et al., *Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2003. **158**(1): p. 63-66.
31. Balmer, M.E., et al., *Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland*. Environmental Science & Technology, 2004. **38**(2): p. 390-395.
32. Lindstrom, A., et al., *Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater*. Environmental Science & Technology, 2002. **36**(11): p. 2322-2329.

33. Huang, C.H. and H.C. Zhang, *Oxidative transformation of triclosan and chlorophene by manganese oxides*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(11): p. 2421-2430.
34. Morrall, D., et al., *A field study of triclosan loss rates in river water (Cibolo Creek, TX)*. Chemosphere, 2004. **54**(5): p. 653-660.
35. Wind, T., *Prognosis of environmental concentrations by geo-referenced and generic models: a comparison of GREAT-ER and EUSES exposure simulations for some consumer-product ingredients in the Itter*. Chemosphere, 2004. **54**(8): p. 1145-1153.
36. Singer, H., et al., *Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments*. Environmental Science & Technology, 2002. **36**(23): p. 4998-5004.
37. MUN-LV (Ministerium für Umwelt, N., Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen), *Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen*. 2004, Düsseldorf.
38. Adler, P., T. Steger-Hartmann, and W. Kalbfus, *Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenen Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes*. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 2001. **29**(4): p. 227-241.
39. Belfroid, A.C., et al., *Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands*. Science of the Total Environment, 1999. **225**(1-2): p. 101-8.
40. Ternes, T.A., P. Kreckel, and J. Mueller, *Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge*. Science of the Total Environment, 1999. **225**(1-2): p. 91-9.
41. Ternes, T.A., et al., *Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil*. Science of the Total Environment, 1999. **225**(1-2): p. 81-90.
42. Bester, K. and M.P. Schlusener, *Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(22): p. 3269-3278.

43. Jobling, S., et al., *Widespread sexual disruption in wild fish*. Environmental Science & Technology, 1998. **32**(17): p. 2498-2506.
44. Pickering, A.D. and J.P. Sumpter, *Comprehending endocrine disruptors in aquatic environments*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(17): p. 331a-336a.
45. Routledge, E.J., et al., *Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening*. Environmental Science & Technology, 1998. **32**(11): p. 1549-1558.
46. Routledge, E.J., et al., *Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach*. Environmental Science & Technology, 1998. **32**(11): p. 1559-1565.
47. Thorpe, K.L., et al., *Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish*. Environmental Science & Technology, 2003. **37**(6): p. 1142-1149.
48. Ternes, T., et al., *Assessment of Technologies for the removal of Pharmaceuticals and Personal Care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse*. 2004, Federal Institute of Hydrology (BfG), Koblenz; ESWE-Institute for Water Research and Water Technology, Wiesbaden, Germany. p. 1-61.
49. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), *Arzneimittel in der Umwelt - Auswertung der Untersuchungsergebnisse*, F.H.H.-B.f.U.u.G.-U.i.A.d.B.L.f.C. (BLAC), Editor. 2003: Hamburg.
50. Heberer, T., *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicology Letters, 2002. **131**(1-2): p. 5-17.
51. Jones, O.A., N. Voulvoulis, and J.N. Lester, *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. Water Research, 2002. **36**(20): p. 5013-22.
52. Umweltbundesamt, *Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung – OGewV)*. 2011.
53. *EU WRRL (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik*.

54. Ministerium für Klimaschutz, U., Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, *Programm Reine Ruhr - Bewirtschaftungsplanung im Einzugsgebiet der Ruhr Gebietsforum Ruhr 16.03.2010*. 2010.
55. Umweltbundesamt, *Grenzwerte, Leitwerte, Orientierungswerte, Maßnahmenwerte – Definitionen und Festlegungen mit Beispielen aus dem UBA*. Fortschreibung eines Vortrags zur 42. Essener Tagung für Wasser- und Abfallwirtschaft „Mikroschadstoffe in der aquatischen Umwelt“ vom 18.-20. März 2009 im EUROGRESS Aachen, 2009.
56. Mudrack, K. and S. Kunst, *Biologie der Abwasserreinigung*. 2003, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
57. MUN-LV (Ministerium für Umwelt, N., Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen), *Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen*. Vol. 12. Auflage. 2006, Düsseldorf.
58. a) *Umweltbundesamt: Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt*. Berlin, 29.-30.09.2004. b) *Fachtagung: Gefährliche Stoffe neue Parameter – Einfluss auf die Wasserwirtschaft der Zukunft – Oberhausen*, 16.03.2005. c) *1. Kölner Wasser- und Abwassertage: Arzneimittelrückstände im Abwasser – Auswirkungen auf den Wasserkreislauf, Köln*, 29.-30.11.2005. d) *Industrial Water 2006 - European Conference on Efficient Use of Water Resources in Industry, Frankfurt am Main*, 06.-08.02.2006.
59. *Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse (POSEIDON)*. EVK1-CT-2000-00047, 2001 - 2004: [www.eu-poseidon.com](http://www.eu-poseidon.com); <http://grdc.bafg.de/servlet/is/2886/>.
60. *Removal of Persistent Polar Pollutants Through Improved Treatment of Wastewater Effluents - (P-THREE)*. EVK1-CT-2002-00116, 2002 - 2005. [www.pthree.de](http://www.pthree.de).
61. *Ecotoxicological Assessments and Removal Technologies for Pharmaceuticals in Wastewaters (REMPHARMA WATER)*. 2003.
62. Knepper, T.P., et al., *Removal of persistent polar pollutants through improved treatment of wastewater effluents (P-THREE)*. *Water Science and Technology*, 2004. **50**(5): p. 195-202.

63. Heberer, T. and D. Feldmann, *Removal of pharmaceutical residues from contaminated raw water sources by membrane filtration*, in *Pharmaceuticals in the environment*, K. Kümmerer, Editor. 2004, Springer Verlag: Berlin. p. 391-410.
64. Heberer, T., et al., *Production of Drinking Water from Highly Contaminated Surface Waters: Removal of Organic, Inorganic, and Microbial Contaminants Applying Mobile Membrane Filtration Units*. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 2002. **30**(1): p. 24-33.
65. Ried, A., et al., *Ozonation and advanced oxidation processes as an option in waste water treatment for elimination of Endocrine Disrupters and Pharmaceuticals. 3rd International Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment – Special Topic: AOP's for Recycling and Reuse, May 18.-22., Goslar 2003, CUTEC Serial Publication No. 57, Papierflieger Verlag, Clausthal-Zellerfeld.*
66. McDowell, D.C., et al., *Ozonation of carbamazepine in drinking water: Identification and kinetic study of major oxidation products*. *Environmental Science & Technology*, 2005. **39**(20): p. 8014-8022.
67. Vogna, D., et al., *Kinetic and chemical assessment of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of antiepileptic drug carbamazepine*. *Chemosphere*, 2004. **54**(4): p. 497-505.
68. Huber, M.M., T.A. Ternes, and U. von Gunten, *Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 alpha-ethinylestradiol*. *Environmental Science & Technology*, 2004. **38**(19): p. 5177-5186.
69. *Oxidative Technologies for Water and Wastewater Treatment – Special Topic: Recalcitrant and Anthropogenic Micropollutants. Proceedings on the 4th International Conference, May 15-17, Goslar 2006, CUTEC Serial Publication No. 68, Papierflieger Verlag, Clausthal-Zellerfeld.*
70. *Industrial Water 2006. European conference on efficient use of water resources in industry. February 6-8, 2006, Frankfurt/Main, book of abstracts. 2006.*
71. Catalkaya, E.C., U. Bali, and F. Sengul, *Photochemical degradation and mineralization of 4-chlorophenol*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2003. **10**(2): p. 113-20.

72. Fandrich, R. and R. Kümmel, *Photokatalytische Unterstützung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-C-Oxidation durch TiO<sub>2</sub> zur Behandlung schwach kontaminierter Wässer am Beispiel der EDTA-Eliminierung*. 1999, WEKA - Fachverlag: Augsburg.
73. Horsch, P., A. Speck, and F.H. Frimmel, *Combined advanced oxidation and biodegradation of industrial effluents from the production of stilbene-based fluorescent whitening agents*. *Water Research*, 2003. **37**(11): p. 2748-56.
74. Oppenlander, T., et al., *Novel vacuum-UV-(VUV) and UV-excimer flow-through photoreactors for waste water treatment and for wavelength-selective photochemistry*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*, 1995. **107**(6): p. 621-636.
75. Schroder, H.F., et al., *Elucidation of the behavior of tannery wastewater under advanced oxidation conditions*. *Chemosphere*, 2004. **56**(5): p. 411-423.
76. *Klares Wasser – Saubere Umwelt: Ativer Gewässerschutz in München. Broschüre der Münchner Stadtentwässerung*. August 2005.
77. Gehr, R., et al., *Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater*. *Water Research*, 2003. **37**(19): p. 4573-86.
78. Popp, W. and S. Huber, *Abwasserdesinfektion zur Verbesserung der hygienischen Wasserqualität für das Baden in Flussgewässern*. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis*, 2005. **10**(5): p. 313.
79. Kiffmeyer, T.K., et al., *Entwicklung eines Verfahrens zur oxidativen Behandlung von Krankenhausabwasser-Teilströmen - insbesondere zur Eliminierung von Zytostatika im Abwasser. Abschlussbericht zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) geförderten Forschungsvorhaben Nr. 13147 N*. 2004, VEU: Duisburg.
80. Tuerk, J., T.K. Kiffmeyer, and K.G. Schmidt, *Degradation of hazardous pharmaceuticals in hospital and industrial waste waters. Oxidative Technologies for Water and Wastewater Treatment – Special Topic: Recalcitrant and Anthropogenic Micropollutants. Proceedings of the 4th International Conference, May 15-17, Goslar 2006, CUTEC Serial Publication No. 68, Papierflieger Verlag, Clausthal-Zellerfeld*.

81. Tuerk, J., T.K. Kiffmeyer, and K.G. Schmidt, *Advanced oxidation processes (AOP) for the degradation of hazardous pharmaceuticals in hospital and industrial waste waters. Industrial Water 2006. European conference on efficient use of water resources in industry. February 6-8. 2006, Frankfurt/Main.*
82. Türk, J., et al., *Oxidative Behandlung von Krankenhausabwasser-Teilströmen - Bestimmung des Abbaus von persistenten Pharmazeutika mittels HPLC-MS/MS.* CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 2004. **55**(3): p. 97-99.
83. Parkinson, A., et al., *Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* Water Research, 2001. **35**(15): p. 3656-64.
84. Bonacquisti, T.P., *A drinking water utility's perspective on bromide, bromate, and ozonation.* Toxicology, 2006. **221**(2-3): p. 145-8.
85. Grummt, T., *The application of oxidative processes – A toxicological problem? Oxidative Technologies for Water and Wastewater Treatment – Special Topic: Recalcitrant and Anthropogenic Micropollutants. Proceedings of the 4th International Conference, May 15-17, Goslar 2006, CUTEC Serial Publication No. 68, Papierflieger Verlag, Clausthal-Zellerfeld.*
86. Heringa, M.B., et al., *Formation and removal of genotoxic activity during UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GAC treatment of drinking water.* Water Research, 2011. **45**(1): p. 366-374.
87. Vogelpohl, A. and S.-M. Kim, *Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment.* Journal of Industrial & Engineering Chemistry, 2004. **10**(1): p. 33-40.
88. Oppenländer, T. and G. Baum, *Industrieabwässer VUV/UV-oxidativ reinigen.* Umwelt, 1995. **25**(3): p. 100-101.
89. Oppenländer, T., J. Hall, and S. Gröger, *Vakuum - UV - Oxidation als Methode zur Abwasserbehandlung.* Chemie in Unserer Zeit, 1996. **30**(5): p. 244-249.
90. Fandrich, R., *Untersuchung zur oxidativen Eliminierung organischer Schadstoffe.* UMSICHT-Schriftenreihe Band 13, Fraunhofer IRB Verlag, 1998.

91. Zimmermann, *Photometrische und analytische Untersuchungen zum Verhalten einiger chlorierter Phenole in wässriger Lösung. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.* 1993.
92. Specht, O., *Oxidative Abwasserreinigung mit Fenton's Reagenz: Verfahrensentwicklung bis zur technischen Anwendungsreife. Dissertation, Technische Universität München.* 1995.
93. Suty, H., *Applications of Advanced Oxidation Process: present and future.* CUTEC-Serial Publication, 2003. **57**: p. 57-66.
94. Leitzke, A., *Mechanistische und kinetische Untersuchungen zur Ozonolyse von organischen Verbindungen in wässriger Lösung, in Fakultät für Naturwissenschaften.* 2003, Universität Duisburg-Essen (Standort Duisburg): Duisburg. p. 185.
95. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **123**(1): p. 291-298.
96. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells.* Experimental Cell Research, 1988. **175**(1): p. 184-191.
97. *DIN EN ISO 10993-5: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität* 2009.
98. Deborde, M., et al., *Oxidation of bisphenol A by ozone in aqueous solution.* Water Research, 2008. **42**(16): p. 4299-4308.
99. Gabriel, F.L.P., et al., *ipso-substitution: A general biochemical and biodegradation mechanism to cleave alpha-quaternary alkylphenols and bisphenol A.* Chemistry & Biodiversity, 2007. **4**(9): p. 2123-2137.
100. Gozmen, B., et al., *Indirect electrochemical treatment of bisphenol a in water via electrochemically generated Fenton's reagent.* Environmental Science & Technology, 2003. **37**(16): p. 3716-3723.
101. Huang, Q.G. and W.J. Weber, *Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: Efficacy, products, and pathways.* Environmental Science & Technology, 2005. **39**(16): p. 6029-6036.
102. Ike, M., et al., *Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A.* Environmental Toxicology, 2002. **17**(5): p. 457-461.

103. Inoue, M., et al., *Degradation of bisphenol A using sonochemical reactions*. Water Research, 2008. **42**(6-7): p. 1379-1386.
104. Irmak, S., O. Erbatur, and A. Akgerman, *Degradation of 17beta-estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques*. Journal of Hazardous Materials, 2005. **126**(1-3): p. 54-62.
105. Lee, J.M., M.S. Kim, and B.W. Kim, *Photodegradation of bisphenol-A with TiO<sub>2</sub> immobilized on the glass tubes including the UV light lamps*. Water Research, 2004. **38**(16): p. 3605-3613.
106. Liu, J.H., et al., *Screening estrogenic oxidized by-products by combining ER binding and ultrafiltration*. Environmental Toxicological and Pharmacology, 2005. **20**(2): p. 269-278.
107. Ohko, Y., et al., *Degradation of bisphenol A in water by TiO<sub>2</sub> photocatalyst*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(11): p. 2365-2368.
108. Zhan, M.J., et al., *Photochemical transformation of bisphenol A promoted by nitrate ions*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2006. **76**(1): p. 105-112.
109. Andreozzi, R., et al., *Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity*. Water Research, 2002. **36**(11): p. 2869-2877.
110. Chiron, S., C. Minero, and D. Vione, *Photodegradation processes of the Antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters*. Environmental Science & Technology, 2006. **40**(19): p. 5977-5983.
111. Doll, T.E. and F.H. Frimmel, *Removal of selected persistent organic pollutants by heterogeneous photocatalysis in water*. Catalysis Today, 2005. **101**(3-4): p. 195-202.
112. Gebhardt, W. and H.F. Schroder, *Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation*. Journal of Chromatography, A, 2007. **1160**(1-2): p. 34-43.
113. Ju, C. and J.P. Uetrecht, *Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **288**(1): p. 51-56.

114. Kosjek, T., et al., *Identification of carbamazepine's UV degradation products*. Poster.
115. Lam, M.W. and S.A. Mabury, *Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters*. *Aquatic Sciences*, 2005. **67**(2): p. 177-188.
116. Marco-Urrea, E., et al., *Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus Trametes versicolor*. *Water Research*, 2009. **In Press**.
117. An, T.C., et al., *Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water*. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2010. **94**(3-4): p. 288-294.
118. Calza, P., et al., *Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008. **22**(10): p. 1533-1552.
119. Cardoza, L.A., et al., *Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems*. *Water Air and Soil Pollution*, 2005. **161**(1-4): p. 383-398.
120. Dewitte, B., et al., *Ozonation of ciprofloxacin in water: HRMS identification of reaction products and pathways*. *Environmental Science & Technology*, 2008. **42**(13): p. 4889-4895.
121. Hu, L.H., L. H., et al., *Oxidation of Antibiotics during Water Treatment with Potassium Permanganate: Reaction Pathways and Deactivation*. *Environmental Science & Technology*, 2011. **45**(8): p. 3635-3642.
122. Mella, M., E. Fasani, and A. Albini, *Photochemistry of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)quinoline-3-carboxylic acid (= ciprofloxacin) in aqueous solutions*. *Helvetica Chimica Acta*, 2001. **84**(9): p. 2508-2519.
123. Paul, T., M.C. Dodd, and T.J. Strathmann, *Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: Transformation products and residual antibacterial activity*. *Water Research*, 2010. **44**(10): p. 3121-3132.

124. Schmitt-Kopplin, P., et al., *Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase*. Journal of Chromatography A, 1999. **837**(1-2): p. 253-265.
125. Tiefenbacher, E.M., et al., *Photodegradation of Some Quinolones Used as Antimicrobial Therapeutics*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994. **83**(4): p. 463-467.
126. Torniainen, K., C.-P. Askolin, and J. Mattinen, *Isolation and structure elucidation of an intermediate in the photodegradation of ciprofloxacin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **16**: p. 439-445.
127. Torniainen, K., et al., *Structure elucidation of a photodegradation product of ciprofloxacin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997. **15**(7): p. 887-894.
128. Turiel, E., G. Bordin, and A.R. Rodriguez, *Study of the evolution and degradation products of ciprofloxacin and oxolinic acid in river water samples by HPLC-UV/MS/MS-MS*. Journal of Environmental Monitoring, 2005. **7**(3): p. 189-195.
129. Wang, P., Y.-L. He, and C.-H. Huang, *Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation*. Water Research, 2010. **44**: p. 5989-5998.
130. Connors, T.A., et al., *Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide*. Biochemical Pharmacology, 1974. **23**(1): p. 115-29.
131. Lunn, G., et al., *Degradation and disposal of some antineoplastic drugs*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1989. **78**(8): p. 652-9.
132. Niemeyer, U. and e. al, *Degradation products of cyclophosphamide synthesis and structural studies*. Phosphorus Sulfur and Silicon, 1996. **109-110**: p. 473-476.
133. Przybylski, M., et al., *Mass-Spectrometric Characterization of Activated N-(2-Chloroethyl)Amido Oxazaphosphorine Derivatives*. Biomedical Mass Spectrometry, 1977. **4**(4): p. 209-215.

134. Sottani, C., et al., *Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(17): p. 2645-59.
135. Aguera, A., et al., *Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(7): p. 908-915.
136. Bartels, P., et al. *Ökotoxikologische aspekte am beispiel des photochemisches abbaus von Diclofenac*. in *Arzneimittelrückstände im wasser u abwasser-Wo besteht handlungsbedarf in der region*. 2007. Magdeburger.
137. Calza, P., et al., *Photocatalytic degradation study of diclofenac over aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions*. Applied Catalysis B-Environmental, 2006. **67**(3-4): p. 197-205.
138. Hartmann, J., et al. *Eliminierung von Pharmaka aus dem wasser*. in *Arzneimittelrückstände im wasser u abwasser-Wo besteht handlungsbedarf in der region*. 2007. Magdeburg.
139. Hofmann, J., et al., *Degradation of diclofenac in water by heterogeneous catalytic oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Applied Catalysis B-Environmental, 2007. **70**(1-4): p. 447-451.
140. Kosjek, T., E. Heath, and B. Kompare, *Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(4): p. 1379-1387.
141. Kosjek, T., et al., *The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation products in wastewater*. Journal of Chromatography A, 2008. **1215**(1-2): p. 57-63.
142. Perez-Estrada, L.A., et al., *Photo-fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(21): p. 8300-8306.
143. Poiger, T., H.R. Buser, and M.D. Muller, *Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001. **20**(2): p. 256-263.

144. Sein, M.M., et al., *Oxidation of diclofenac with ozone in aqueous solution*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(17): p. 6656-6662.
145. Vogna, D., et al., *Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone*. Water Research, 2004. **38**(2): p. 414-422.
146. Kallenborn, R., S. Valdersnes, and L.K. Sydnes, *Identification of several Tonalide (R) transformation products in the environment*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2006. **86**(7): p. 461-471.
147. Caviglioli, G., et al., *Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002. **30**(3): p. 499-509.
148. Mendez-Arriaga, F., S. Esplugas, and J. Gimenez, *Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton*. Water Research, 2010. **44**(2): p. 589-595.
149. Benner, J. and T.A. Ternes, *Ozonation of Metoprolol: Elucidation of Oxidation Pathways and Major Oxidation Products*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(14): p. 5472-5480.
150. Peake, B. and R. Braund, *Environmental Aspects of the Disposal of Pharmaceuticals in New Zealand*. Chemistry in New Zealand, 2009. **4**(58).
151. Sein, M.M., et al., *Oxidation of some typical wastewater contaminants (tributyltin, clarithromycin, metoprolol and diclofenac) by ozone*. Water Science and Technology, 2009. **59**(8): p. 1479-1485.
152. Song, W.H., et al., *Free radical destruction of beta-blockers in aqueous solution*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(4): p. 1256-1261.
153. Jeong, J., et al., *Degradation mechanisms and kinetic studies for the treatment of X-ray contrast media compounds by advanced oxidation/reduction processes*. Water Research, 2010. **44**(15): p. 4391-4398.
154. Perez, S., et al., *Elucidation of phototransformation reactions of the X-ray contrast medium iopromide under simulated solar radiation using UPLC-ESI-QqTOF-MS*. Journal of Mass Spectrometry, 2009. **44**(9): p. 1308-1317.

155. Perez, S., et al., *Structural characterization of metabolites of the X-ray contrast agent iopromide in activated sludge using ion trap mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(6): p. 1866-1874.
156. Schulz, M., et al., *Transformation of the X-ray contrast medium iopromide in soil and biological wastewater treatment*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(19): p. 7207-7217.
157. Steger-Hartmann, T., et al., *Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (ultravist), a widely used iodinated X-ray contrast medium*. Water Research, 2002. **36**(1): p. 266-274.
158. Brix, R., et al., *Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity*. Journal of Mass Spectrometry, 2009. **44**(3): p. 330-337.
159. Chen, C.-Y., *The Oxidation of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Aqueous Solution by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Photolysis*. Water Air & Soil Pollution, 2010. **209**: p. 411-417.
160. Abellan, M.N., W. Gebhardt, and H.F. Schroder, *Detection and identification of degradation products of sulfamethoxazole by means of LC/MS and -MSn after ozone treatment*. Water Science and Technology, 2008. **58**(9): p. 1803-1812.
161. Hu, J., et al., *Quantitative structure-activity relationship model for prediction of genotoxic potential for quinolone antibacterials*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(13): p. 4806-12.
162. Marciocha, D., et al., *Oxidation of sulfamethoxazole by UVA radiation and modified Fenton reagent: toxicity and biodegradability of by-products*. Water Science and Technology, 2009. **60**(10): p. 2555-2562.
163. Trovo, A.G., et al., *Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation*. Water Research, 2009. **43**(16): p. 3922-3931.
164. Yargeau, V., et al., *Impact of degradation products of sulfamethoxazole on mammalian cultured cells*. Environmental Toxicology, 2008. **23**(4): p. 492-498.
165. Zhou, W. and D.E. Moore, *Photochemical Decomposition of Sulfamethoxazole*. International Journal of Pharmaceutics, 1994. **110**(1): p. 55-63.

166. Linden, K.G. and M.J. Watts, *Photooxidation and subsequent biodegradability of recalcitrant tri-alkyl phosphates TCEP and TBP in water*. Water Research, 2008. **42**(20): p. 4949-4954.
167. Petrovic, M., et al., *Evidencing Generation of Persistent Ozonation Products of Antibiotics Roxithromycin and Trimethoprim*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(17): p. 6808-6815.
168. Vieira, K.M., C.C. Nascentes, and R. Augusti, *Ozonation of Ethinylestradiol in Aqueous-Methanolic Solution: Direct Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010. **21**(5): p. 787-794.
169. MKULNV (Ministerium für Klimaschutz, U., Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen), *Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben Elimination von Arzneimitteln und organischen Spurenstoffen: Entwicklung von Konzeptionen und innovativen, kostengünstigen Reinigungsverfahren Vergabenummer 08-058/1 Bezug: IV-7-042 600 001F - Schlussbericht Phase 1 „Elimination von Arzneimittelrückständen in kommunalen Kläranlagen“*.
170. Haiß, A. and K. Kümmerer, *Biodegradability of the x-ray contrast compound amidotrizoic acid. Identification of aerobic degradation products and effects against sewage sludge microorganisms*. Chemosphere, 2006. **62**: p. 294-302.
171. Chang, Y.S., et al., *Triclosan susceptibility and co-metabolism - A comparison for three aerobic pollutant-degrading bacteria*. Bioresource Technology, 2011. **102**(3): p. 2206-2212.
172. Baycan, N., F. Sengul, and E. Thomanetz, *AOX formation and elimination in the oxidative treatment of synthetic wastewaters in a UV-free surface reactor*. Environmental Science Pollution Research International, 2005. **12**(3): p. 153-8.
173. Harmon, R.C., et al., *Characterization of a novel model for investigation of radiocontrast nephrotoxicity*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2009. **24**(3): p. 763-768.
174. Humes, H.D., D.A. Hunt, and M.D. White, *Direct toxic effect of the radiocontrast agent diatrizoate on renal proximal tubule cells*. American Journal of Physiology, 1987. **252**(2): p. F246-F255.
175. Hegde, R.N., et al., *Electro-oxidation of atenolol at a glassy carbon electrode*. International Journal of Electrochemical Science, 2008. **3**(3): p. 302-314.

176. Joss, A., C. Abegglen, and H. Siegrist, *Spurenstoffe eliminieren – Kläranlagentechnik*. Eawag.
177. Fraysse, B. and J. Garric, *Prediction and experimental validation of acute toxicity of beta-blockers in Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005. **24**(10): p. 2470-2476.
178. Cheong, H.I., et al., *In vitro cytotoxicity of eight beta-blockers in human corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell lines: Comparison with epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts*. Toxicology in Vitro, 2008. **22**(4): p. 1070-1076.
179. Telez, M., et al., *In vitro and in vivo evaluation of the antihypertensive drug atenolol in cultured human lymphocytes: effects of long-term therapy*. Mutagenesis, 2000. **15**(3): p. 195-202.
180. Wu, M.H., et al., *Effects of chronic bisphenol A exposure on hepatic antioxidant parameters in medaka (Oryzias latipes)*. Toxicological and Environmental Chemistry, 2011. **93**(2): p. 270-278.
181. Zhang, H., et al., *Assessing the combination effects of environmental estrogens in fish*. Ecotoxicology, 2010. **19**(8): p. 1476-1486.
182. Golub, M.S., et al., *Bisphenol A: Developmental Toxicity from Early Prenatal Exposure*. Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology, 2010. **89**(6): p. 441-466.
183. Schrank, S.G., et al., *Generation of endocrine disruptor compounds during ozone treatment of tannery wastewater confirmed by biological effect analysis and substance specific analysis*. Water Science and Technology, 2009. **59**(1): p. 31-38.
184. Richard, J., et al., *Toxicity of four micropollutants before and after oxidative waste water treatment*. eingereicht bei: Journal of Toxicology, 2011.
185. Ferrari, B., et al., *Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?* Environmental Toxicology and Chemistry, 2004. **23**(5): p. 1344-1354.
186. Ferrari, B., et al., *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003. **55**(3): p. 359-370.

187. Parolini, M., et al., *Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures*. *Chemosphere*, 2011. **84**(1): p. 91-100.
188. Triebkorn, R., et al., *Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(4): p. 1405-1416.
189. Burhenne, J., et al., *Photolytic Degradation of Fluoroquinolone Carboxylic Acids in Aqueous Solution. Part I: Primary Photoproducts and Half-Lives*. *Environmental Sciences & Pollutant Research*, 1997. **4**(1): p. 10-15.
190. de Witte, B., *Advanced oxidation of quinolone antibiotics in water by ozone and the peroxone process*. PhD Thesis, 2010. **Ghent University, Belgium**.
191. Ysern, P., et al., *Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones*. *Mutagenesis*, 1990. **5**(1): p. 63-66.
192. Gurbay, A., et al., *Ciprofloxacin-induced cytotoxicity and apoptosis in HeLa cells*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2005. **15**(5): p. 339-342.
193. Kummerer, K., A. Al-Ahmad, and V. Mersch-Sundermann, *Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test*. *Chemosphere*, 2000. **40**(7): p. 701-710.
194. Hernando, M.D., et al., *Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture*. *Chemosphere*, 2007. **68**(4): p. 724-730.
195. Tuerk, J., et al., *Chemical and toxicological evaluation of by-products during oxidative treatment of waste water treatment plant effluents*. *Ozone-Science & Engineering*, 2011.
196. Hartmann, A., et al., *Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999. **36**(2): p. 115-119.

197. Prival, M.J. and E. Zeiger, *Chemicals mutagenic in Salmonella typhimurium strain TA1535 but not in TA100*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1998. **412**(3): p. 251-260.
198. Hallare, A.V., H.R. Kohler, and R. Triebkorn, *Development toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvents, DMSO*. Chemosphere, 2004. **56**(7): p. 659-666.
199. Rizzo, L., et al., *Degradation of diclofenac by TiO<sub>2</sub> photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays*. Water Research, 2009. **43**(4): p. 979-988.
200. Filby, A.L., et al., *Effects of Advanced Treatments of Wastewater Effluents on Estrogenic and Reproductive Health Impacts in Fish*. Environmental Science & Technology, 2010. **44**(11): p. 4348-4354.
201. Lang, R. and R. Reimann, *Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. 1. Communication - examination for the induction of gene-mutations using the ames salmonella microsome test and the HGPRT test in V79 cells*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1993. **21**(3): p. 272-304.
202. Reimann, R., S. Kalweit, and R. Lang, *Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids .2. Communication: Examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1996. **28**(2): p. 133-144.
203. Siddique, Y.H., T. Beg, and M. Afzal, *Genotoxic potential of ethinylestradiol in cultured mammalian cells*. Chemico-Biological Interactions, 2005. **151**(2): p. 133-141.
204. Dussault, E.B., et al., *Chronic Toxicity of the Synthetic Hormone 17 alpha-Ethinylestradiol to Chironomus tentans and Hyalella azteca*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008. **27**(12): p. 2521-2529.
205. Hashimoto, S., et al., *Effects of Ethinylestradiol on Medaka (Oryzias latipes) as Measured by Sperm Motility and Fertilization Success*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009. **56**(2): p. 253-259.

206. Salierno, J.D. and A.S. Kane, *17 alpha-Ethinylestradiol alters Reproductive Behaviors, Circulating Hormones, and Sexual Morphology in Male Fathead Minnows (Pimephales promelas)*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009. **28**(5): p. 953-961.
207. Schreurs, R., et al., *Examination of the in vitro (anti) estrogenic, (anti) androgenic and (anti)dioxin-like activities of tetralin, indane and isochroman derivatives using receptor-specific bioassays*. Toxicology Letters, 2005. **156**(2): p. 261-275.
208. Schreurs, R., et al., *Transcriptional activation of estrogen receptor ER alpha and ER beta by polycyclic musks is cell type dependent*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2002. **183**(1): p. 1-9.
209. Api, A.M. and R.H.C. San, *Genotoxicity tests with 6-acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline and 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta-gamma-2-benzopyra n*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1999. **446**(1): p. 67-81.
210. Mohr, S., et al., *Toxic and Accumulative Potential of the Antifouling Biocide and TBT Successor Irgarol on Freshwater Macrophytes: A Pond Mesocosm Study*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(17): p. 6838-6843.
211. Fernandez-Alba, A.R., et al., *Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays*. Analytica Chimica Acta, 2002. **456**(2): p. 303-312.
212. Okamura, H., et al., *Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment*. Water Research, 2000. **34**(14): p. 3523-3530.
213. Okamura, H., et al., *Phytotoxic effects of antifouling compounds on nontarget plant species*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2003. **71**(5): p. 881-886.
214. Huggett, D.B., et al., *Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002. **43**(2): p. 229-235.
215. Dzialowski, E.M., P.K. Turner, and B.W. Brooks, *Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in Daphnia magna*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006. **50**(4): p. 503-510.

216. van den Brandhof, E.J. and M. Montforts, *Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010. **73**(8): p. 1862-1866.
217. vom Eyser, C., et al., *Chemical and biological evaluation of transformation products from ofloxacin degradation via ozonation and UV-oxidation*. eingereicht bei: Water Research, 2011.
218. Trisciuglio, D., et al., *Phototoxic effect of fluoroquinolones on two human cell lines*. *Toxicology in Vitro*, 2002. **16**(4): p. 449-456.
219. Itoh, T., et al., *Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2006. **603**(2): p. 135-144.
220. McQueen, C.A., et al., *Study of potential invitro and invivo Genotoxicity in Hepatocytes of Quinolone Antibiotics*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991. **111**(2): p. 255-262.
221. Bezwada, P., L.A. Clark, and S. Schneider, *Intrinsic cytotoxic effects of fluoroquinolones on human corneal keratocytes and endothelial cells*. *Current Medical Research and Opinion*, 2008. **24**(2): p. 419-424.
222. Scuderi, A.C., et al., *In vitro toxicity of netilmicin and ofloxacin on corneal epithelial cells*. *Cornea*, 2003. **22**(5): p. 468-472.
223. Tsai, T.H., W.L. Chen, and F.R. Hu, *Comparison of fluoroquinolones: cytotoxicity on human corneal epithelial cells*. *Eye*, 2010. **24**(5): p. 909-917.
224. Pocostales, J.P., et al., *Degradation of Ozone-Refractory Organic Phosphates in Wastewater by Ozone and Ozone/Hydrogen Peroxide (Peroxone): The Role of Ozone Consumption by Dissolved Organic Matter*. *Environmental Science & Technology*, 2010. **44**(21): p. 8248-8253.
225. Reemtsma, T.R., T., J. Lingott, and S. Roegler, *Determination of 14 monoalkyl phosphates, dialkyl phosphates and dialkyl thiophosphates by LC-MS/MS in human urinary samples*. *Science of the Total Environment*, 2011. **409**(10): p. 1990-1993.
226. Follmann, W. and J. Wober, *Investigation of cytotoxic, genotoxic, mutagenic, and estrogenic effects of the flame retardants tris-(2-chloroethyl)-phosphate (TCEP) and tris-(2-chloropropyl)-phosphate (TCPP) in vitro*. *Toxicology Letters*, 2006. **161**(2): p. 124-134.

227. Baran, W., J. Sochacka, and W. Wardas, *Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions*. Chemosphere, 2006. **65**(8): p. 1295-1299.
228. Dirany, A., et al., *Study of the toxicity of sulfamethoxazole and its degradation products in water by a bioluminescence method during application of the electro-Fenton treatment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(2): p. 353-360.
229. Escher, B.I., et al., *In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(9): p. 3090-3100.
230. Wammer, K.H., et al., *Changes in antibacterial activity of triclosan and sulfa drugs due to photochemical transformations*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006. **25**(6): p. 1480-1486.
231. Gaggi, C., et al., *Toxicity and Hazard Ranking of S-Triazine Herbicides using Microtox(R), 2 Green Algal Species and a Marine Crustacean*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995. **14**(6): p. 1065-1069.
232. Arufe, M.I., et al., *Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (Sparus aurata L.) larvae: a comparison with the Microtox test*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004. **59**(2): p. 209-216.
233. Plhalova, L., et al., *Comparison of Terbutryn Acute Toxicity to Danio rerio and Poecilia reticulata*. Acta Veterinaria Brno, 2010. **79**(4): p. 593-598.
234. Moretti, M., et al., *In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage*. Toxicology in Vitro, 2002. **16**(1): p. 81-88.
235. Velisek, J., et al., *Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (Cyprinus carpio L.)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010. **73**(3): p. 384-390.
236. Villarini, M., et al., *In vitro genotoxicity of terbutryn evaluated by the alkaline single-cell microgel-electrophoresis "comet" assay*. Cell Biology and Toxicology, 2000. **16**(5): p. 285-292.
237. Balk, F. and R.A. Ford, *Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB - II. Effect assessment and risk characterisation*. Toxicology Letters, 1999. **111**(1-2): p. 81-94.

238. Seinen, W., et al., *AHTN and HHCB show weak estrogenic - but no uterotrophic activity*. Toxicology Letters, 1999. **111**(1-2): p. 161-168.
239. Chen, X., Richard, J., Liu, Y., Dopp, E., Tuerk, J., Bester, K., *Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment* Water Research, 2011.
240. Zuckerbraun, H.L., et al., *Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro*. European Journal of Oral Sciences, 1998. **106**(2): p. 628-636.
241. Farre, M., et al., *Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of Vibrio fischeri*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**(8): p. 1999-2007.
242. Ensley, H.E., et al., *Toxicity and Metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic Angiosperm Lemna-Gibba*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1994. **13**(2): p. 325-331.
243. Foran, C.M., E.R. Bennett, and W.H. Benson, *Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan*. Marine Environmental Research, 2000. **50**(1-5): p. 153-156.
244. Ishibashi, H., et al., *Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka Oryzias latipes and induction of hepatic vitellogenin*. Aquatic Toxicology, 2004. **67**(2): p. 167-179.
245. Raut, S.A. and R.A. Angus, *Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, Gambusia affinis*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010. **29**(6): p. 1287-1291.
246. Altenburger, R., et al., *Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to Vibrio fischeri: Mixtures composed of similarly acting chemicals*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000. **19**(9): p. 2341-2347.
247. Altenburger, R., H. Walter, and M. Grote, *What contributes to the combined effect of a complex mixture?* Environmental Science & Technology, 2004. **38**(23): p. 6353-6362.
248. Porsbring, T., et al., *Mixture Toxicity from Photosystem II Inhibitors on Microalgal Community Succession is predictable by Concentration Addition*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010. **29**(12): p. 2806-2813.

249. McLafferty, F.W., *Wiley Registry of Mass Spectral Data*. Vol. 9. Edition. 2009: John Wiley & Sons.
250. Oberacher, H., W. Weinmann, and S. Dresen, *Quality evaluation of tandem mass spectral libraries*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(8): p. 2641-2648.
251. Weinmann, W., et al., *Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching*. Journal of Chromatography A, 2001. **926**(1): p. 199-209.
252. Rösner, P., *Mass Spectra of Designer Drugs*. 2011, Weinheim: Wiley-VCH.
253. Parr, M.K., G. Opfermann, and W. Schänzer, *Mass Spectra of Physiologically Active Substances including drugs, steroid hormones, and endocrine disruptors*. 2011, Weinheim: Wiley-VCH.
254. Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, A.u.A.e.V., *22. Leistungsvergleich kommunaler Kläranlagen 2009*. 2009.