

Untersuchung der Transformation von organischen Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung – Analytische und experimentelle Konzepte und Herausforderungen

Arne Wick (Wick@bafg.de), Thomas A. Ternes (Ternes@bafg.de), Bundesanstalt für Gewässerkunde Koblenz

Zusammenfassung

Die biologische Abwasserreinigung ist eine bedeutende Quelle von Transformationsprodukten mit zumeist unbekanntem (öko-)toxikologischen Risikopotential. Dennoch ist immer noch sehr wenig über die Abbauprozesse bekannt, wodurch die Vorhersage der Abbauprozesse von Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung stark limitiert ist. Vor diesem Hintergrund wird in diesem Artikel ein Konzept zur Untersuchung der Transformation von organischen Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung vorgestellt. Dabei werden insbesondere auch die damit verbundenen analytischen und experimentellen Herausforderungen und Grenzen aufgezeigt. Der Fokus liegt auf Erfahrungen und Ergebnissen, die im Rahmen der Promotion von Arne Wick hinsichtlich der Untersuchung der Transformation des Opiumalkaloids Codein gewonnen wurden.

1. Einleitung

Über 10.000 verschiedene organische Substanzen wie Arzneistoffe, Inhaltsstoffe von Körperpflegemitteln und Biozide werden regelmäßig im häuslichen Bereich verwendet. Die meisten Substanzen gelangen nach ihrer Verwendung in das kommunale Abwasser. Erst während der letzten 10-15 Jahren führte die rasante Weiterentwicklung analytischer Detektionsmethoden und ein verstärktes Problembewusstsein zum Nachweis vieler dieser abwasserbürtigen anthropogenen Mikroverunreinigungen (sogenannte neuartige Spurenstoffe) in der Umwelt [1]. Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass eine konventionelle biologische Abwasserreinigung in kommunalen Kläranlagen keine ausreichende Barriere für die Emission dieser Stoffe in Oberflächengewässer darstellt [2; 3]. Eine genaue Kenntnis des Umweltverhaltens neuartiger organischer Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung ist für eine Risikobewertung unerlässlich. Insbesondere hinsichtlich des (biologischen) Abbaus von Mikroverunreinigungen stellen konventionelle Kläranlagen mit Nitrifikation und Denitrifikation aber immer noch eine Art Black Box dar. So führt der Abbau oftmals nicht zu einer vollständigen Elimination der Ausgangsverbindung im Sinne einer Mineralisation, sondern zur Bildung von Transformationsprodukten (TPs), deren Identität und Risikopotential weitestgehend unbekannt sind [4; 5]. Die unter aeroben Bedingungen gebildeten TPs sind häufig deutlich polarer als die Ausgangsverbindungen und können bis ins Grund- und Trinkwasser vordringen [6; 7]. Die Identifizierung von TPs und Abbauprozessen sowie der Nachweis der TPs in Umweltproben sind daher wichtige neue Herausforderungen im Bereich der

Umweltchemie. Im Folgenden wird dazu ein umfassendes Untersuchungskonzept vorgestellt (Abb. 1).

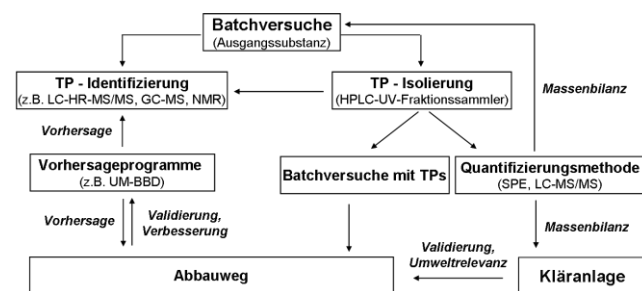


Abb. 1: Grundlegendes Konzept zur Identifizierung der Transformationsprodukte und Abbauprozesse von organischen Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung.

2. Identifizierung von Transformationsprodukten

2.1 Durchführung von Batchversuchen

Batchversuche bieten die Möglichkeit, die Bildung von TPs unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen nachzuvollziehen. Für die Untersuchung der aeroben Transformation in der Nitrifikation wird Klärschlamm aus dem nitrifizierenden Teil einer Belebung entnommen und möglichst schnell homogen abgefüllt. Eine Verdünnung des Klärschlammes mit Kläranlagenablauf verhindert einen zu raschen Abbau leicht abbaubarer Substanzen und verringert den Einfluss von Sorption an Klärschlamm. Durch das gleichzeitige Einleiten von Luft und CO₂ ist es möglich, aerobe Bedingungen und einen neutralen pH-Wert über die gesamte Versuchsdauer zu garantieren (Abb. 2) [8]. Zur Identifizierung von TPs müssen Ausgangskonzentrationen verwendet werden, die deutlich über realen Umweltkonzentrationen liegen (mittlerer µg/L-Bereich). Die Proben werden zur Bestimmung der Ausgangskonzentration direkt nach der Dotierung und anschließend in zunehmenden Zeitabständen entnommen. Mit Hilfe von autoklavierten oder sterilfiltrierten Kontrollansätze kann der abiotische Abbau der Substanzen vom biologischen Abbau unterschieden werden. Abbaureaktionen nach der Probenahme müssen durch Filtration und ggf. durch Säurezugabe und Einfrieren unterbunden werden. Bei einer Säurezugabe ist allerdings zu beachten, dass diese bei bestimmten Substanzen auch zu abiotischen Transformationsreaktionen führen kann. Auf der anderen Seite kommt es zum Beispiel beim Abbau des Opiumalkaloids Codein zur Bildung von TPs, die nur durch Säurezugabe in wässriger Lösung stabil bleiben [9].

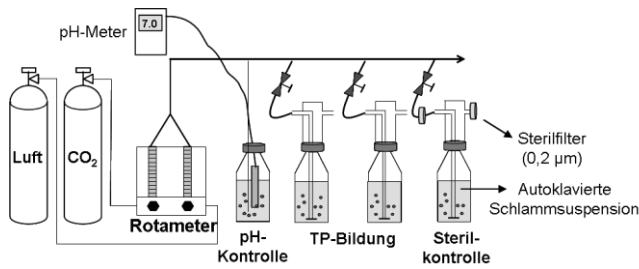


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Batchversuchs zur Untersuchung der Bildung von Transformationsprodukten von organischen Mikroverunreinigungen unter aeroben Bedingungen in Kontakt mit verdünntem Klärschlamm aus der Nitrifikation.

2.2 Isolierung und Strukturaufklärung

Die Bildung von TPs lässt sich z.B. durch Messungen mit HPLC-UV und LC Tandem MS nachvollziehen. Durch die Bestimmung der exakten Masse mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HR-MS) und Untersuchung der MS-Fragmentierungsmuster (MSn) können Strukturvorschläge erarbeitet werden. Abbauvorhersageprogramme wie das UMBBD Pathway Prediction System sind ein geeignetes Mittel, um die Suche nach Strukturvorschläge zu unterstützen [10]. Auf der Basis der Strukturvorschläge können, sofern verfügbar, kommerziell erhältliche Referenzstandards erworben werden, um zu einer eindeutigen Identifizierung der TPs zu gelangen. Darüber hinaus bieten Referenzstandards die Möglichkeit, den weiteren Abbauweg aufzuklären (siehe Abschnitt 3) sowie die TPs in Umweltproben zu quantifizieren und Massenbilanzen zu erstellen (siehe Abschnitt 4). Oftmals stehen jedoch keine kommerziellen Referenzstandards zur Verfügung, so dass diese durch chemische Synthesen oder direkt aus den Batchexperimenten gewonnen werden müssen. Letzteres erfordert die Dotierung von Konzentrationen im mittleren bis hohen mg/L-Bereich. Die Verwendung hoher Konzentrationen kann allerdings insbesondere bei Bioziden und Antibiotika zur Inhibierung der Transformation führen. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass sich die Zusammensetzung der TPs verändert, wenn die Substanz nicht mehr co-metabolisch, sondern ggf. als Energie- und/oder Kohlenstoffquelle genutzt werden kann. Dennoch ist es häufig die einzige Möglichkeit, die TPs in ausreichender Menge zu generieren und z.B. mit Hilfe von HPLC-UV-Messungen bereits eine semiquantitative Bilanzierung vorzunehmen. Die TPs können anschließend durch Gefrier-trocknung aufkonzentriert werden und dann mittels einer geeigneten semipräparativen HPLC-Trennmethode unter Verwendung eines Fraktionssammlers isoliert werden. Die aufwendige Isolierung der TPs bietet den Vorteil, dass die chemische Struktur auch durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt werden kann. Mehrere Beispiele belegen, dass eine eindeutige Identifizierung von TPs erst durch die Kombination verschiedener unabhängiger Techniken wie z.B. der NMR und Massenspektrometrie möglich ist [6; 7; 9]. So wies beispielsweise die hochaufgelöste massenspektrometrische Untersuchung von TP 332 (Abb. 3) des Opiumalkaloids Codein aufgrund der exakten Masse und der zwei-

fachen Wasserabspaltung im MS²-Spektrum bereits darauf hin, dass das Molekül mindestens zwei Hydroxylgruppen mit abspaltbaren Wasserstoffatomen in α -Stellung enthält. Die genaue Position der Hydroxylgruppen konnte aber erst durch 1D- und 2D-NMR-Untersuchungen identifiziert werden. Auch andere Analysetechniken wie Deuterium-Austausch-Experimente [11], GC-MS-Messungen [12] und spezifische Derivatisierungsreaktionen [13] können wertvolle Strukturinformationen liefern, um die Identifizierung abzusichern.

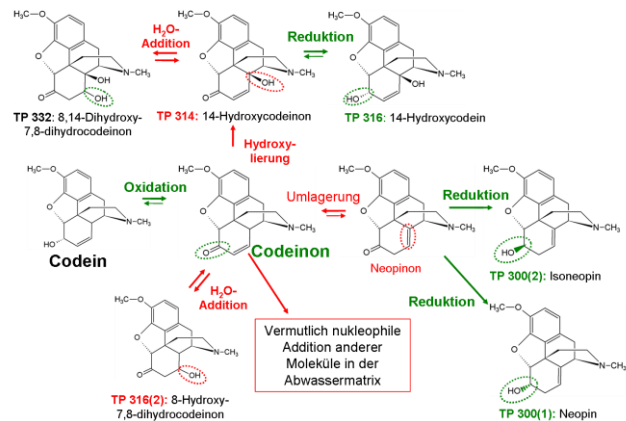


Abb. 3: Aerobes Abbauweg von Codein in Kontakt mit Belebtschlamm aus der Nitrifikation. Biologische enzymkatalysierte Reaktionen sind grün und abiotische Reaktionen sind rot markiert.

3. Aufklärung der Abbauwege

Die Identifizierung der Abbauwege ist entscheidend für ein besseres Verständnis und damit auch für eine erfolgreichere Vorhersage der Transformationsprozesse in der biologischen Abwasserreinigung. Stehen ausreichende Mengen an isolierten TPs zur Verfügung, können diese individuell in Batchexperimenten eingesetzt und damit der Abbauweg schrittweise nachvollzogen werden. Abiotische Abbauprozesse können einen signifikanten Einfluss auf die Abbauwege haben und sollten durch die Verwendung von Sterilkontrollen von biologisch katalysierten Reaktionen unterschieden werden. Zum Beispiel weist das durch eine enzymatische Oxidation aus dem Codein entstehende Codeinon durch die Bildung eines α,β -ungesättigten Ketons eine hohe chemische Reaktivität auf (Abb. 3) [9]. Die β -Position von Codeinon ist einem nukleophilen Angriff durch Wasser und sehr wahrscheinlich auch durch diverse nukleophile Matrixkomponenten ausgesetzt. Des Weiteren steht Codeinon im chemischen Gleichgewicht mit Neopinon, dessen Doppelbindung im Vergleich zu Codeinon verschoben ist. Diese chemischen TPs werden wiederum alle biologisch, u.a. durch eine enzymatische Reduktion der Ketogruppe zurück zum Alkohol, weiter transformiert.

Momentan ist die Vorhersage von Abbauwegen in Umweltkompartimenten für Mikroverunreinigungen nur sehr begrenzt möglich. Dies ist u.a. dadurch begründet, dass die bisher vorliegenden Erkenntnisse oftmals auf Versuchen mit Bakterienkulturen beruhen und die Testsubstanz als alleinige

Kohlenstoff- und Energiequelle zugeführt wurde. Durch die Untersuchung der individuellen Abbauege von Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur im Rahmen der zuvor beschriebenen Batchexperimente könnten in Zukunft mehr Informationen über strukturspezifische Abbauege gewonnen werden und in Vorhersagemodelle einfließen. Auf diese Weise konnten z.B. bereits wertvolle Erkenntnisse zur Transformation von Substanzen mit Amidgruppen gewonnen werden [14]. Auch die Ergebnisse hinsichtlich des Abbaueges von Codein ließen sich auf andere Opiumalkaloide (Morphin, Dihydrocodein und Hydrocodon) übertragen [9].

4. Bilanzierung von Transformationsprodukten in Batch- und Umweltproben

Die Entwicklung einer sensitiven analytischen Methode, mit der die identifizierten TPs in Spurenkonzentrationen quantifiziert werden können, ist ein weiterer wichtiger Schritt bei der Untersuchung der Transformationen von Mikroverunreinigungen. Die Bilanzierung der TPs in Zu- und Ablaufproben von Kläranlagen zeigt, inwiefern die relevanten TPs erfasst wurden und die Erkenntnisse aus den Batchversuchen auf natürliche Umweltsysteme übertragbar sind. Eine nicht geschlossene Massenbilanz kann auf eine partielle Mineralisierung oder Assimilation, aber auch auf die Bildung weiterer unbekannter und nicht detektierter TPs hindeuten. Im Falle des Codeins lag die Massenbilanz sowohl in den Batchversuchen als auch in den untersuchten Kläranlagen bei etwa 20-40% [9]. Die Ergebnisse von DOC-Messungen, die begleitend zu den Batchversuchen mit Codein durchgeführt wurden, wiesen darauf hin, dass die restlichen 60-80% nicht mineralisiert oder assimiliert werden. Vielmehr kommt es vermutlich aufgrund der Reaktivität der α,β -ungesättigten Ketogruppe des TPs Codeinon zur Bildung zahlreicher nicht detektierbarer TPs. Sofern verfügbar und durchführbar, sind Batchversuche mit radioaktiv-markierten Substanzen die Methode der Wahl, um die Lücke in Massenbilanzen von Batchexperimenten zu schließen. Insbesondere bei sorbierenden Testsubstanzen ist die Verwendung radioaktiv-markierter Substanzen oft unerlässlich, um auch die gebundenen nicht-extrahierbaren Rückstände zu erfassen [15].

5. Schlussfolgerungen

Mit Hilfe von Batchversuchen und der Kombination verschiedener analytischer Techniken zur Strukturaufklärung ist es möglich, die Transformationsprodukte und Abbauege von organischen Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung zu identifizieren. Dabei ergeben sich aber insbesondere folgende Herausforderungen:

- Die Identifizierung von TPs ist sehr zeitaufwendig und erfordert oftmals die Kombination verschiedener moderner analytischer Techniken. Bisher fehlen eindeutige Identifizierungsregeln analog der etablierten Quantifizierungsregeln.
- Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Batchversuchen auf die Kläranlage ist limitiert und muss durch

Messungen und Bilanzierungen in der Kläranlage verifiziert werden.

- Die Vorhersagbarkeit der Transformationsprozesse für eine effizientere Strukturaufklärung ist derzeit noch sehr stark eingeschränkt. Zukünftig können weitere systematische Abbaustudien mit strukturell ähnlichen Substanzen dazu beitragen, die Vorhersagbarkeit zu erhöhen.
- Die für die Transformation von organischen Mikroverunreinigungen in der biologischen Abwasserreinigung verantwortlichen Mikroorganismen und Enzyme und das ökotoxikologische Potential der TPs sind weitestgehend unbekannt und bedürfen einer verstärkten Untersuchung.

6. Literatur

- [1] Richardson, S.D., 2007. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 79, 4295-4324.
- [2] Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, H., 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 393A-399A.
- [3] Ternes, T.A., Joss, A. (ed.), 2007. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing, London, UK.
- [4] Helbling, D.E., Hollender, J., Kohler, H.-P.K., Singer, H., Fenner, K., 2010a. High-throughput identification of microbial transformation products of organic micropollutants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6621-6627.
- [5] Kosjek, T., Heath, E., Petrović, M., Barceló, D., 2007. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends Anal. Chem.* 26, 1076-1085.
- [6] Kormos, J.L., Schulz, M., Wagner, M., Ternes, T.A., 2009. Multistep approach for the structural identification of biotransformation products of iodinated X-ray contrast media by liquid chromatography/hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Anal. Chem.* 81, 9216-9224.
- [7] Prasse, C., Wagner, M., Schulz, R., Ternes, T.A., 2011. Biotransformation of the antiviral drugs acyclovir and penciclovir in activated sludge treatment. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2761-2769.
- [8] Wick, A., Fink, G., Joss, A., Siegrist, H., Ternes, T.A., 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Wat. Res.* 43, 1060-1074.
- [9] Wick, A., Wagner, M., Ternes, T.A., 2011. Elucidation of the transformation pathway of the opium alkaloid codeine in biological wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3374-3385.
- [10] Ellis, L.B., Wackett, L.P., 2012. Use of the University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database for study of microbial degradation. *Microbial Informatics and Experimentation* 2:1, 1-10.
- [11] Scheurer, M., Godejohann, M., Wick, A., Happel, O., Ternes, T.A., Brauch, H.J., Ruck, W.K., Lange, F.T., 2011. Structural elucidation of main ozonation products of the

artificial sweeteners cyclamate and acesulfame. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 1107-1118.

[12] McDowell, D.C., Huber, M.M., Wagner, M., von Gunten, U., Ternes, T.A., 2005. Ozonation of carbamazepine in drinking water: identification and kinetic study of major oxidation products. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8014-8022.

[13] Zimmermann, S.G., Schmukat, A., Schulz, M., Benner, J., Von Gunten, U., Ternes, T.A., 2012. Kinetic and mechanistic investigations of the oxidation of tramadol by ferrate and ozone. *Environ. Sci. Technol.* 46, 876-884.

[14] Helbling, D.E., Hollender, J., Kohler, H.-P.K., Fenner, K., 2010b. Structure-based interpretation of biotransformation pathways of amide-containing compounds in sludge-seeded bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6628-6635.

[15] Prasse, C., Löffler, D., Ternes, T.A., 2009. Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. *Chemosphere* 77, 1321-1325.

Korrespondenzadresse:

Dr. Arne Wick

Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG)

Am Mainzer Tor 1

56068 Koblenz

Tel.: 0261/1306-5408, Fax: 0261/1306-5363