



Aktivität von östrogen und androgen aktiven Substanzen während und nach der Ozonung von Krankenhausabwasser

Linda Gehrmann¹ (gehrmann@iuta.de), Fabian Itzel¹ (itzel@iuta.de), Kevin S. Jewell² (Jewell@bafg.de), Thomas A. Ternes² (Ternes@bafg.de), Torsten C. Schmidt³ (torsten.schmidt@uni-due.de), Jochen Türk¹ (tuerk@iuta.de)

¹ Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA), Bliersheimer Str. 58-60, 47229 Duisburg

² Bundesanstalt für Gewässerkunde, Am Mainzer Tor 1, 56068 Koblenz

³ Instrumentelle Analytische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 5, 45141 Essen

Zusammenfassung

Der hier dargestellte Workflow, bei dem die instrumentelle Analytik mit einem Bioassay kombiniert wird, ermöglicht ein gezielteres Vorgehen für die Aufklärung der Zusammenhänge in Umweltproben. Durch die Auftrennung anti-östrogen aktiver Proben einer vierten Reinigungsstufe mittels HPLC-Fraktionierung und die Analyse der weiterhin aktiven Fraktionen mittels hochauflösender Massenspektrometrie konnte der Prozess der Ozonung als vierte Reinigungsstufe näher untersucht und das Flammschutzmittel TCEP als eine beteiligte Substanz in diesem Prozess identifiziert werden.

Einleitung

Organische Spurenstoffe gelangen hauptsächlich durch Kläranlagen in die Umwelt, da sie dort nur unzureichend eliminiert werden [1-3]. Erst durch die Installation einer sogenannten vierten Reinigungsstufe können organische Spurenstoffe besser eliminiert werden, wobei sich insbesondere die Kombination der Ozonung und der Behandlung mit Aktivkohle als besonders effektiv herausgestellt hat [4, 5]. Da unter dem Begriff organische Spurenstoffe eine Vielzahl verschiedener Stoffklassen zusammengefasst wird, werden auch die unterschiedlichsten Effekte auf die Gewässer und die dort lebenden aquatischen Organismen beobachtet.

Zur Untersuchung dieser Auswirkungen und zur Optimierung und Neu-Entwicklung von Reinigungsverfahren werden aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der organischen Spurenstoffe die verschiedensten Messverfahren angewendet. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen zwischen instrumenteller Analytik, z.B. Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS), und biologischen Testsystemen, z. B. Toxizitätsassay mittels Leuchtbakterien. Bei der instrumentellen Analytik stehen dabei die Einzelstoffe im Vordergrund, die in ein Gewässer eingeleitet werden, während die biologischen Tests die Wirkung solcher Substanzen auf die aquatischen Organismen abbilden. In der Regel werden diese Analysetechniken zwar anhand der gleichen Originalproben aber getrennt in den Disziplinen der Biologie und der Chemie und somit oft auch in unterschiedlichen Laboren durchgeführt. Dies führt in beiden Fällen jeweils zu unbeantworteten Fragen. Werden Substanzen durch die instrumentelle Analytik nachgewiesen, ist oft unklar, ob diese in der gefundenen Konzentration relevant für das Gewässer sind und wie sie Organismen schädigen. Wird eine Wirkung auf Organismen nachgewiesen,

stellt sich hingegen die Frage, welche Substanz in welcher Konzentration diesen Effekt verursacht hat.

Kombiniert man jedoch beide analytischen Ansätze in einem gemeinsamen Workflow und nutzt die Vorteile beider Methoden aus, so ist es möglich, Synergien zu generieren und zu einer umfassenderen Bewertung und Einschätzung der Proben und somit des Gewässers zu kommen. Die Identifizierung wirksamer Stoffe durch die Kombination von wirkungsbezogener und instrumenteller Analytik wird unter dem Begriff „Effekt dirigierte Analytik“ (EDA) zusammengefasst [6, 7].

Methodisches Vorgehen

Ein möglicher Workflow ist im Folgenden anhand eines unerwarteten östrogenen Effektes nach der Ozonung in einer Krankenhaus-Kläranlage dargestellt.

Hintergrund dieser Untersuchung war die Beobachtung, dass an zwei europäischen Kläranlagen, die ausschließlich Abwasser von Krankenhäusern behandeln, ein unerwarteter Anstieg der östrogenen Aktivität nach Ozonung beobachtet wurde. Dieser Effekt wurde mittels A-YES, eines Rezeptor-Gen-Assays auf Basis von *Arxula adenivorans* Hefezellen, beobachtet, konnte jedoch auch bei intensiveren Untersuchungen mittels weiterer Testsysteme (YES und CALUX Testsysteme) nicht aufgeklärt werden. Da es sich bei der östrogenen Aktivität um eine Wechselwirkung von agonistischen (Rezeptoraktivierung) und antagonistischen (Rezeptorblockierung) Effekten handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der agonistische Effekt vor der Ozonung von antagonistischen Effekten überlagert wird und dieses Verhältnis durch die Ozonung umgekehrt wird. Der antagonistische Effekt konnte durch den gleichen Bioassay parallel erfasst werden. Hierzu wurde eine definierte Menge eines agonistisch aktiven Standards (Bsp. 17 β -Estradiol) zu den Proben gegeben. Wird der zu erwartende Effekt unterschritten, entspricht dieser Betrag der antagonistischen Aktivität. Um andere Einflüsse wie Toxizität weitestgehend ausschließen zu können, werden bei allen Tests generell Wachstumskontrollen zu jeder Probe durchgeführt.

Für den kombinierten Ansatz wurden die Proben mit einer erhöhten anti-östrogenen (antagonistischen) Aktivität nach Ozonung dann zunächst mit der instrumentellen Analysetechnik der HPLC in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Anschließend wurden alle Fraktionen erneut auf ihre anti-östrogene Aktivität untersucht, um den Effekt näher einzu-

grenzen. Die Ergebnisse für die gemessene Aktivität der einzelnen Fraktionen sind für eine Probe beispielhaft in Abbildung 1 gezeigt.

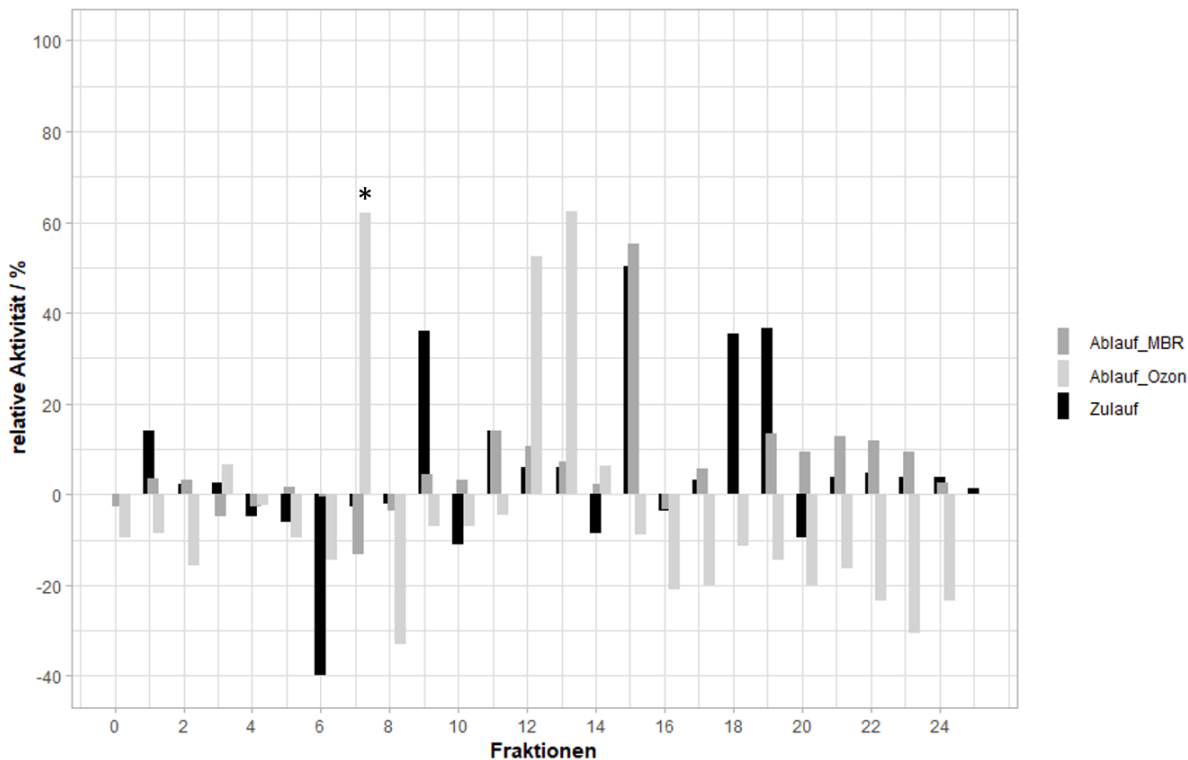


Abb. 1. Ergebnisse der Fraktionierung von Abwasserproben nach einzelnen Behandlungsstufen aus der Kläranlage Marien-Hospital. Entnommen aus [8]. Gekennzeichnete Fraktion 7(*) enthält identifizierte Substanz TCEP. Die Ordinate skaliert die anti-östrogene (antagonistische) Aktivität.

Die Abbildung zeigt, dass sich die Effekt-verursachenden Substanzen durch die Chromatographie der HPLC auftrennen und in einzelnen Fraktionen sammeln lassen. Außerdem ist zu erkennen, dass die Effekte im Zulauf der Kläranlage (Fraktion Nr. 9, 18, 19) im Membranbioreaktor (MBR), der ersten Reinigungsstufe, abgebaut werden. Es wird jedoch auch deutlich, dass nach Ozonung in Fraktion 7 ein Effekt detektiert werden konnte. Dies kann zum einen darauf hindeuten, dass Substanzen während der Ozonung umgewandelt werden und erst dann eine anti-östrogene Aktivität hervorrufen. Zum anderen wäre es denkbar, dass maskierende Stoffe abgebaut und somit effektauslösende Substanzen an den Rezeptor des Biotests binden können.

Der wesentliche Vorteil dieser Auftrennung ist jedoch auch die Eingrenzung der relevanten Fraktionen der Gesamtprobe, so dass für eine anschließende sogenannte Non-Target Analytik mittels hochauflösender Massenspektrometrie durch Zusammenführen der Informationen des biologischen Tests und der instrumentellen Analysedaten die detektierten Signale der HRMS (Features) priorisiert und nicht relevante Peaks aussortiert werden können.

Dies konnte durch einen eigens programmierten Algorithmus der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) erreicht werden,

welcher die Features in aktiven Proben, nicht aktiven Proben und den Blindwertproben miteinander vergleicht und somit die Anzahl an potentiell relevanten Signalen deutlich reduziert. Auf diese Weise war es möglich, die Anzahl der Signale der HRMS von ca. 8000 auf 32 zu reduzieren. Da ein Abgleich mit Datenbanken aufgrund von uneinheitlichen Datenformaten zum größten Teil manuell erfolgen muss, ist die Identifizierung der Features sehr zeitaufwendig. Die Fraktionierung erlaubt eine Priorisierung auf relevante Features in Kombination mit der Peakintensität (als Annäherung für die relativen Konzentrationsunterschiede). Die Peakintensität wäre sonst als alleiniges Priorisierungskriterium nur sehr begrenzt einsetzbar.

Durch die Kombination mit der wirkungsbezogenen Analytik werden jedoch zunächst die Features (chromatographische Peaks und Massenspektren) aufgelistet, die nur in der aktiven Fraktion vorkommen, sodass auch relevante Features mit einer geringeren Intensität betrachtet werden. Gleichzeitig werden auch Features mit einer hohen Intensität, die auch in nicht aktiven Fraktionen vorkommen und somit nicht relevant für den Effekt sind, aus der Betrachtung eliminiert. Durch die Kombination mit der wirkungsbezogenen Analytik ist es somit möglich, relevante Features besser und schneller zu identifizieren und den Aufwand bei der Auswertung von HRMS-Daten deutlich zu reduzieren.

Durch dieses Vorgehen konnte in diesem Projekt das Flamm- schutzmittel TCEP als eine anti-östrogen relevante Substanz, welche zu der Aktivität der Fraktion beiträgt, identifiziert werden. Da TCEP als Standard erhältlich ist, konnte außerdem der Nachweis erbracht werden, dass TCEP in den einge- setzten Bioassays tatsächlich eine anti-östrogene Wirkung hervorruft. Somit konnte TCEP als Effekt verursachende Substanz nachgewiesen werden.

Schlußfolgerungen

Aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels von agonistischen und antagonistischen Effekte bei der östrogenen Aktivität und der Vielzahl von Substanzen in Abwässern ist es jedoch wahrscheinlich, dass TCEP nicht alleine für die beobachtete Aktivität verantwortlich ist. Hier besteht noch wesentlicher Forschungsbedarf, um weitere Substanzen auf- zuklären und somit das Verhalten und Zusammenspiel dieser Substanzen in Mischungen besser zu verstehen.

Der hier dargestellte Workflow ermöglicht jedoch ein gezielteres und kombiniertes Vorgehen für diese Aufklärung und ist dadurch zeit- und kostensparender. Eine weitere viel- versprechende Möglichkeit für diesen Workflow ist die Kombination mit der Hochleistungsdünnschichtchromato- graphie (HPTLC). Dabei wird die Probe auf der Dünn- schichtchromatographie-Platte aufgetrennt und der Bioassay direkt auf der Platte durchgeführt. Aktive Substanzen können dann direkt auf der Platte als klassische Banden identifiziert werden. Anschließend werden diese Banden extrahiert und in der HRMS untersucht.

Literatur

1. Morasch, B., et al., Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: Micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010. 29(8): p. 1658-1668.
2. Rechenberg, B., Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern. Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge. Schriftenreihe "Position", Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 2015.
3. Valitalo, P., et al., Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents. *Water Research*, 2016. 88: p. 740-749.
4. Tuerk, J., et al., Efficiency, costs and benefits of AOPs for removal of pharmaceuticals from the water cycle. *Water Science and Technology*, 2010. 61(4): p. 985-993.
5. Sperlich, A. und R. Gnirß, Forschungsergebnisse zur weitergehenden Abwasserreinigung (Teil 2), in *wwt-online*. 2016.
6. Muschket, M., et al., Identification of Unknown Antiandrogenic Compounds in Surface Waters by Effect-Directed Analysis (EDA) Using a Parallel Fractionation Approach. *Environmental Science & Technology*, 2018. 52(1): p. 288-297.
7. Brack, W., et al., Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments--An in-depth overview. *Science of the Total Environment*, 2016. 544: p. 1073-118.
8. Itzel, F., et al., Comprehensive analysis of antagonistic endocrine activity during ozone treatment of hospital wastewater. *Science of the Total Environment*, 2018. 624: p. 1443-1454.

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. Linda Gehrmann
Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA)
Bliersheimer Str. 58-60
47229 Duisburg
Telefon: 02065/418-215
Fax: 02065/418-211
Email: gehrmann@iuta.de
Internet: www.iuta.de