

Universität Stuttgart

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft

Inbetriebnahme der Ozonanlage mit nachgeschalteter Sandfiltration auf der Kläranlage Tübingen

– Abschlussbericht –

Juni 2025

Kompetenzzentrum Spurenstoffe Baden-Württemberg

Eine Kooperation von

DWA Landesverband Baden-Württemberg • Hochschule Biberach • Universität Stuttgart

Abschlussbericht

zum Forschungsvorhaben

„Inbetriebnahme der Ozonanlage mit nachgeschalteter Sandfiltration auf der Kläranlage Tübingen“

UM-Vorhabensnummer: 495/2021

Gefördert vom



Baden-Württemberg
Ministerium für Umwelt, Klima
und Energiewirtschaft

Verbundpartner:

	
Kommunale Servicebetriebe Tübingen	Kompetenzzentrum Spurenstoffe Baden-Württemberg

AutorInnen:

KomS: Katrin Merkler, Daniel Bogenrieder, Vera Kohlgrüber

Stuttgart, im Juni 2025

Zitierung:

Merkler, K., Bogenrieder, D., Kohlgrüber, V. (2025): Inbetriebnahme der Ozonanlage mit nachgeschalteter Sandfiltration auf der Kläranlage Tübingen – Abschlussbericht, gefördert vom Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
Einleitung	6
1 Ozonanlage auf der Kläranlage Tübingen.....	8
1.1 Verfahrensschema	8
1.1.1 Ozondosierung und Anlagenbetrieb.....	9
2 Untersuchungskonzept.....	10
2.1 Probenahmestrategie	10
2.2 Analysen	10
3 Untersuchungsergebnisse.....	14
3.1 Abwassermenge.....	14
3.1.1 Gesamtabwassermenge der Kläranlage	14
3.1.2 Durchflussmenge Ozonanlage	15
3.2 Anlagenbetrieb	16
3.3 Standardanalytik.....	19
3.3.1 CSB und AFS.....	19
3.3.2 Phosphorelimination.....	20
3.5 Spurenstoffelimination	22
3.5.1 Biologische Stufe	22
3.5.2 Ozonstufe.....	23
3.5.3 Sandfilter	24
3.5.4 Gesamtelimination	25
3.6 Vergleichsmessungen Spurenstoffliste A	26
4 Fazit	35
Literaturverzeichnis.....	37
Anhang	38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Verfahrensschema der Ozonanlage auf der Kläranlage Tübingen.....	8
Abbildung 3-1:	Tageswerte der mittleren Zulaufabwassermenge zur KA Tübingen [m³/h].....	14
Abbildung 3-2:	Stundenwerte der Durchflussmenge des Rohabwassers durch die Ozonanlage [m³/h]	15
Abbildung 3-3:	Vergleichsmessungen zum ΔSAK_{254} bei den sechs Spurenstoffbeprobungen.	16
Abbildung 3-4:	Betriebsdaten zur Ozonproduktion und SAK_{254} während der Probenahme 4	18
Abbildung 3-5:	Betriebsdaten zur Ozonproduktion und SAK_{254} während der Probenahme 5	18
Abbildung 3-6:	Konzentrationen des CSB und AFS im Kläranlagenzulauf [mg/L].....	19
Abbildung 3-7:	Konzentrationen des CSB und AFS im Kläranlagen- bzw. Sandfilterablauf [mg/L]..	19
Abbildung 3-8:	Konzentrationen des Gesamtphosphors und Orthophosphats im Kläranlagenzulauf [mg/L].	20
Abbildung 3-9:	Konzentrationen des Gesamtphosphors und Orthophosphats im Kläranlagen- bzw. Sandfilterablauf [mg/L].	20
Abbildung 3-10:	Ergebnisse der Phosphonat-Messungen.....	21
Abbildung 3-11:	Spurenstoffelimination in der biologischen Stufe der Kläranlage	22
Abbildung 3-12:	Spurenstoffelimination in der Ozonstufe der Kläranlage in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis [mg O ₃ / mg DOC]	23
Abbildung 3-13:	Mittlere Spurenstoffelimination im Sandfilter (inkl. Minima und Maxima)	24
Abbildung 3-14:	Spurenstoffelimination über die gesamte Kläranlage in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis [mg O ₃ / mg DOC]	25
Abbildung 3-15:	Zulaufkonzentrationen der untersuchten Stoffe vor und nach dem Ausbau der Kläranlage (dargestellt ist der Median sowie die Höchst- und Tiefstwerte der sechs Messkampagnen).....	27
Abbildung 3-16:	Ablaufkonzentrationen der untersuchten Stoffe vor und nach dem Ausbau der Kläranlage (dargestellt ist der Median sowie die Höchst- und Tiefstwerte der jeweils drei Messkampagnen).....	28
Abbildung 3-18:	Erreichte Eliminationen der Humanarzneimittel durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.	29
Abbildung 3-19:	Erreichte Eliminationen der synthetischen Komplexbildner, der perfluorierten Verbindungen, der synthetischen Duftstoffe, der Flammschutzmittel, der synthetischen Süßstoffe und von Melamin durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.	31
Abbildung 3-20:	Erreichte Eliminationen der Röntgenkontrastmittel, Pestizide, Estrogene und Industriechemikalien durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.....	31
Abbildung 3-21:	Eliminationen der sieben BW Substanzen und deren Mittelwert unterteilt in den Anteil der Elimination der biologischen Stufe und den Anteil der Ozonung mit anschließendem Sandfilter nach dem Ausbau der Kläranlage. Im Vergleich dazu die erreichten Eliminationen vor dem Ausbau.	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Anlagendaten der Ozonanlage	9
Tabelle 2.1:	Probenahmen im Rahmen des Untersuchungszeitraums	10
Tabelle 2.2:	Analysierte Spurenstoffe.	11
Tabelle 2.3:	Analysierte Spurenstoffe für die Vergleichsmessungen (KomS Liste A)	12
Tabelle 2.4:	Abwasserproben für die weitere Analytik durchgeführt wurde.....	13
Tabelle 3.1:	Durchflussmengen an den Probenahmetagen	15
Tabelle 3.2:	Betriebseinstellungen im Untersuchungszeitraum	16
Tabelle 3.3:	Übersicht der Messkampagnen zur Vergleichsmessung vor und nach dem Ausbau	26
Tabelle 3.4:	Kläranlagen- und Untersuchungsdaten der Messkampagnen zur Vergleichsmessung vor und nach dem Ausbau	26
Tabelle 3.5:	Kategorisierung der untersuchten Spurenstoffe innerhalb der Stoffgruppen nach ihrer Elimination in den Vergleichsmessungen.	34

Einleitung

Seit einigen Jahren sind Spurenstoffe ein bedeutendes Thema der Gewässerökologie. Unter dem Begriff Spurenstoffe, werden synthetische, organische Stoffe zusammengefasst, deren Konzentrationen im Wasser oder Abwasser im Bereich von Nano- bis Mikrogramm pro Liter vorliegen.

Auf der Kläranlage Tübingen wurde im Jahr 2021 eine Ozonanlage zur gezielten Spurenstoffelimination in Betrieb genommen. Im Rahmen des Forschungsprojektes „Inbetriebnahme der Ozonanlage mit nachgeschalteter Sandfiltration auf der Kläranlage Tübingen“ sollen die Effekte der großtechnischen Ozonanlage auf die Spurenstoffe im Ablauf dargestellt werden. Außerdem werden durch das vorgestellte Analyseprogramm konkret die folgende Fragestellungen beantwortet:

- Wie hoch ist die Spurenstoffentnahme auf der Kläranlage vor und nach Inbetriebnahme der großtechnischen Ozonanlage?
- Wie hoch ist die Spurenstoffentnahme in der großtechnischen Kläranlage in Abhängigkeit der Ozondosis in gO_3/gDOC ?
- Wie hoch ist die Abnahme der Gesamtkeimzahl im Ablauf der Kläranlage nach Inbetriebnahme der großtechnischen Ozonanlage? (siehe Anhang)
- Welchen Effekt hat die großtechnische Ozonanlage und der folgende Sandfilter auf Antibiotikaresistente Bakterien (ARB)? (siehe Anhang)

Dieser Abschlussbericht fasst die im Rahmen des Projektes erlangten Erkenntnisse zur Spurenstoffelimination auf der Kläranlage Tübingen zusammen. Die Bearbeitung des Projektes erfolgte in Zusammenarbeit mit den Kommunalen Servicebetrieben der Stadt Tübingen und wurde vom Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg gefördert.

Die mikrobiologische Bewertung der Reduktionseffizienz von unerwünschten mikrobiologischen Kontaminanten wurde durch das Karlsruher Institut für Technologie (KIT) am Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG) durchgeführt. Die Ergebnisse sind diesem Bericht angehängt.

Der Zweckverband Landeswasserversorgung wurde im Rahmen des Projektes mit Untersuchungen zur Entstehung von Transformationsprodukten bei der Ozonung in Form eines Non-Target-Screening der Abwasserproben beauftragt. Der Untersuchungsbericht ist diesem Bericht angehängt.

Parallel zum hier berichteten Forschungsprojekt wurde das Vorhaben „Wissenschaftliche Begleituntersuchungen zum Ausbau der Kläranlage Tübingen mit einer 4. Reinigungsstufe auf Basis einer Ozonierung in Kombination mit einem Sandfilter“ durch die Universität Tübingen durchgeführt. Im Rahmen dieses Projektes wurden in zwei Phasen die Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Tübingen auf die stoffliche Belastung und Gewässergüte des

Vorfluters (hier: Neckar) untersucht. Die Messungen vor Ausbau der Kläranlage fanden dabei 2018 / 2019 und die Messungen nach Ausbau 2023 / 2024 statt. Die Ergebnisse sind im Rahmen des Abschlussberichtes veröffentlicht (Peschke et al., 2024).

Die Projektergebnisse wurden 2025 im Rahmen der 7th International Conference on Advanced Oxidation Processes präsentiert. Abstract und Poster der Konferenzteilnahme sind dem Bericht angehängt (Bogenrieder, 2025).

1 Ozonanlage auf der Kläranlage Tübingen

1.1 Verfahrensschema

Die Kläranlage Tübingen ist auf 137.500 Einwohnerwerte (EW) ausgelegt, wobei die mittlere Belastung im Jahr 2021 bei 105.000 EW lag. Die maximale Zuflussmenge bei Regenwetter beträgt 1.300 L/s. Die biologisch gereinigte Jahresabwassermenge beträgt etwa 13,4 Mio. m³. Die Verfahrenstechnik umfasst eine mechanische Stufe, bestehend aus einem Rechen, Sandfang und Vorklärbecken, eine biologische Stufe aus einer zwei-straßigen vorgeschalteten Denitrifikation und Nitrifikation und eine chemische Stufe aus Vor- und Nachfällung zur Phosphorelimination. Seit Juli 2021 ist die großtechnische Ozonanlage mit nachgeschalteter Sandfiltration betriebsbereit. Das Verfahrensschema der Anlage ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

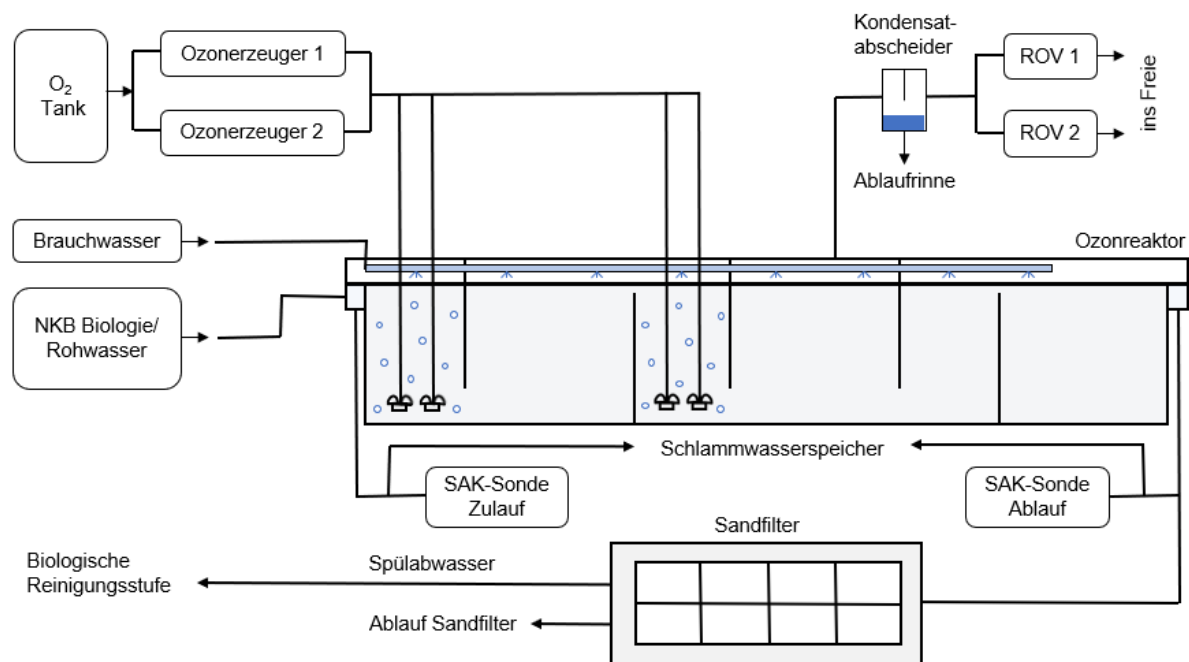


Abbildung 1-1: Verfahrensschema der Ozonanlage auf der Kläranlage Tübingen

Das nachgeklärte Abwasser wird vom Rohwasserpumpwerk mit einem maximalen Durchfluss von 700 L/s in den Reaktor gefördert (Teilstrombehandlung). In diesem wird das, aus Sauerstoff in Ozongeneratoren erzeugte Ozon eingetragen. Der Sauerstoff wird in einem Sauerstofftank flüssig gelagert und gelangt über eine Verdampfungsstation gasförmig zur Einsatzgasaufbereitung. Von dieser wird das Einsatzgas in die Ozongeneratoren geleitet. Zum Zeitpunkt der Beprobungen im Rahmen der Untersuchungen liefen die Ozonerzeuger abwechselnd mit einer maximalen Ozonproduktion von 10 kg/h. Über die Gasverteilung wird das Einsatzgas dem Reaktor zugeführt. Der Ozonreaktor umfasst ein Gesamtvolumen von 1.460 m³ mit einer Wassertiefe von 6,2 m. Die Aufenthaltszeit des Abwassers im Ozonreaktor beträgt bei maximalen Volumenstrom 60 Minuten und bei Trockenwetterabfluss 90 Minuten.

Der Ozoneintrag erfolgt in den Reaktorkammern 1 und 3 über insgesamt vier Eintragsstränge. Jeder Kammer sind dabei zwei Eintragsstränge zugeordnet. Pro Eintragskammer ist je ein Diffusorfeld vorhanden, welche unabhängig voneinander ansteuerbar sind. Insgesamt verfügt die Ozonanlage über 124 Diffusoren, von denen 68 Teil des ersten und 56 Teil des zweiten Diffusorfeldes sind. An der Reaktordecke sind Düsen angebracht, über die Brauchwasser eingespritzt werden kann, sollte es zur Schaumbildung im Reaktor kommen. Diese Maßnahme war auf der Kläranlage Tübingen bisher nicht notwendig.

Um zu vermeiden, dass Ozon in die Umwelt gelangt wird die Abluft aus dem Reaktor über Verdichter abgesaugt und den Restozonvernichtern zugeführt. In den Restozonvernichtern wird das ggfs. in der Abluft enthaltene Restozon in Sauerstoff umgewandelt und anschließend der Umgebungsluft zugeführt.

Das nach der Ozonung gereinigte Abwasser fließt hydraulisch zur nachgeschalteten Sandfiltration. Vor dem Sandfilter wird als Fällmittel Eisenchloridsulfat zur Phosphorelimination dosiert. Anschließend passiert das zu reinigende Abwasser den nachgeschalteten Mehrschicht-Sandfilter aus Quarzsand und Anthrazit mit einem maximalen Zulauf von 700 L/s. Die acht Filterzellen besitzen eine Filtrationsfläche von je 32 m². Die Filterzellen werden einmal am Tag rückgespült und das Spülwasser ins Vorklärbecken geleitet. Der Ablauf des Sandfilters wird in den Neckar unterhalb des ca. ein Kilometer entfernten Wehres eingeleitet.

In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Daten der Ozonanlage bezüglich der Ozonproduktion aufgelistet.

Tabelle 1.1: Anlagendaten der Ozonanlage

Bezeichnung	Min.	Max.
Nominelle Ozonproduktion pro Ozongenerator	ca. 0,3 kg/h	10 kg/h
Nominelle Ozonkonzentration	ca. 3 Gew.-%	9,5 Gew.-%
Nomineller Gasfluss pro Ozongenerator	ca. 10 kg/h	105,3 kg/h
Nomineller Gasfluss gesamte Ozonanlage	ca. 10 kg/h	210,5 kg/h
Durchfluss Reaktor	ca. 414 m ³ /h	2.880 m ³ /h

1.1.1 Ozondosierung und Anlagenbetrieb

Die Ozondosierung kann grundsätzlich konstant, volumenproportional oder anhand der prozentualen Änderung des spektralen Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 254 nm (SAK₂₅₄) erfolgen. Auf der Kläranlage Tübingen erfolgt die Dosierung über die SAK₂₅₄-Absorbanzabnahme. Der Ozonbedarf wird über einen wählbaren Grundozonbedarf unter Einfluss der Korrektur über den Δ SAK₂₅₄-Regler und der Korrektur über den Restozonregler ermittelt.

Über Messonden des Herstellers „Hach“ wird der spektrale Absorptionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 254 nm im Zu- und Ablauf des Ozonreaktors erfasst und somit der Δ SAK₂₅₄ ermittelt. Entsprechend der eingestellten Korrekturfaktoren wird die Dosierung angepasst, sodass im Optimalfall ein möglichst konstanter Wert für den Δ SAK₂₅₄ erreicht werden kann.

2 Untersuchungskonzept

2.1 Probenahmestrategie

Es wurden im Zulauf der Kläranlage, im Ablauf der Nachklärung bzw. dem Zulauf zur Ozonanlage, im Ablauf der Ozonanlage und im Ablauf des Sandfilters jeweils fünf durchflussproportionale 48h-Mischproben entnommen. Dabei erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Werktagen jeweils eine 24h-Mischprobe, die anschließend zu einer 48h-Mischprobe vereinigt wurden. Die Probenahmen fanden an Tagen mit Trockenwetterzufluss statt. Äußere, witterungsbedingte Einflüsse, wie beispielsweise Regenwetter oder Schmelzwasser könnten andernfalls die Messungen und ihre Vergleichbarkeit beeinflussen. Es wurden bei zwei unterschiedlichen Sollwerteinstellungen für den ΔSAK_{254} (30% und 40%) Proben gezogen. Über den Ozoneintrag, die behandelte Abwassermenge und die im Labor gemessene Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) wurde die spezifische Ozonkonzentration ($\text{mg O}_3/\text{mg DOC}$) ermittelt. Bei der ersten Probenahme handelt es sich um eine Stichprobe, welche sich jedoch als ungeeignet für die Bewertung der Spurenstoffelimination herausgestellt hat und daher im Folgenden nicht mit betrachtet wird. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Einstellungen während der Beprobungen aufgelistet.

Tabelle 2.1: Probenahmen im Rahmen des Untersuchungszeitraums

Probenahmedatum	Bezeichnung	Sollwert ΔSAK_{254}	Sonde ΔSAK_{254}	Photometer ΔSAK_{254}	Spez. Ozonkonz. [$\text{mg O}_3/\text{mg DOC}$]
25.01.2022	PN1	40	49	43	0,8
18. – 19.04.2022	PN2	40	45	44	0,59
02. – 03.05.2022	PN3	30	34	38	0,56
09. – 10.05. 2022	PN4	30	40	38	0,51
26. – 27.07.2022	PN5	30	31	36	0,49
17. – 18.10.2022	PN6	40	38	45	0,65

2.2 Analysen

Da mit dem Betrieb eines Verfahrens zur Spurenstoffelimination primär darauf abgezielt wird, gelöste Spurenstoffe aus dem Abwasser zu entfernen, wurden die Proben vor der Analyse durch das zuständige Analysenlabor des Instituts für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Universität Stuttgart filtriert. Hierfür wurden Cellulose-Nitrat-Filter mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ verwendet.

Es wurden u.a. Laboranalysen des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB), Gesamtphosphor (P_{ges}), Orthophosphat ($\text{PO}_4\text{-P}$) und SAK_{254} durchgeführt. Im Rahmen der Überprüfung der Spurenstoffeliminationsleistung wurden die Substanzen der Spurenstoffliste B-2017 des

KomS analysiert. Alle untersuchten Substanzen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Die sieben Substanzen, die in Baden-Württemberg laut Arbeitspapier des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg für den Nachweis der Einhaltung einer ausreichenden Spurenstoffeliminationsleistung herangezogen werden, sind entsprechend markiert und werden in diesem Bericht als 7 BW Substanzen betitelt.

Tabelle 2.2: *Analysierte Spurenstoffe.*

Stoffgruppe	Einzelsubstanz	BG _{Ablauf} [µg/l]
Korrosionsschutzmittel	1H-Benzotriazol *	0,05
	4H+5H Benzotriazol *	0,05
Humanarzneimittel	Candesartan	0,05
	Carbamazepin *	0,025
	Diclofenac *	0,025
	Hydrochlorothiazid *	0,05
	Ibuprofen	0,025
	Irbesartan *	0,05
	Metoprolol *	0,025
	Sulfamethoxazo	0,025

*Substanzen, die in Baden-Württemberg zur Beurteilung der Spurenstoffelimination herangezogen werden (7 BW Substanzen) (Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UMBW), 2018).

Im Rahmen der Vergleichsmessungen wurden zusätzlich jeweils drei Probenahmen vor und nach dem Ausbau der Kläranlage durchgeführt. Diese Proben wurden auf eine erweiterte Auswahl an Substanzen analysiert, um die Auswirkungen der Ozonung und des Sandfilters auf die Spurenstoffkonzentrationen im Abwasser zu bewerten. Hierbei wurden die Substanzen der KomS Liste A untersucht. Eine Auflistung der Stoffe und deren Stoffgruppe findet sich in Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Analysierte Spurenstoffe für die Vergleichsmessungen (KomS Liste A)

Stoffgruppe	Einzelsubstanz	BG _{Ablauf} [µg/l]
Arzneimittelwirkstoffe und Metabolite	Ibuprofen, Metoprolol, Carbamazepin, Diclofenac, Sulfamethoxazol, Metabolit 10,11-Dihydro-10-hydroxy-carbamazepin (DHH)	0,025
	Metformin, Gabapentin, Erythromycin A, Dehydrato-Erythromycin A, Clarithromycin, Clarithromycin, Ciprofloxacin, Azithromycin, Hydrochlorothiazid, Candesartan, Irbesartan, Bezafibrat,	0,05
	Guanylharnstoff	0,25
Röntgenkontrastmittel	Amidotrizoesäure, Iohexol, Iomeprol, Iopromid, Iopamidol	0,05
Estrogene	17-alpha-Ethinylestradiol, 17-beta-Estradiol, Estron	0,001
Pestizide	Carbendazim, Mecoprop, DEET, Terbutryn	0,025
Korrosionsschutzmittel	Benzotriazol, Σ 4- und 5-Methylbenzotriazol	0,05
Synthetische Komplexbildner	EDTA, NTA	1,0
	DTPA	3,0
Perfluorierte Tenside	PFBA, PFOA, PFBS, PFOS	0,005
Synthetische Duftstoffe	AHTN, HHCB	0,02
Flammschutzmittel	TCEP, TCPP	0,05
Synthetische Süßstoffe	Acesulfam, Cyclamat	0,025
	Sucralose	0,01
Weitere Chemikalien	Melamin	0,1

Zusätzlich zu den Messungen der Spurenstoffe wurde auch die Entstehung von Transformationsprodukten im Rahmen eines Non-Target-Screenings untersucht. Für das Non-Target-Screening wurden Abwasserproben der in Tabelle 2.4 dargestellten Tage verwendet. Die Ergebnisse der Non-Target-Untersuchungen sind im Anhang zu finden.

Ebenfalls wurden an einzelnen Probenahmetagen Messungen von fakultativ-pathogenen Bakterien (FPB) und relevanten Antibiotikaresistenzgenen (ARG) durchgeführt. Tabelle 2.4

zeigt für welche Probenahmetage FPB und ARG bestimmt wurden. Die Ergebnisse der Analytik sind im Anhang dargestellt.

An drei Probenahmetagen (vgl. Tabelle 2.4) wurden die Proben zudem auf Phosphonate untersucht. Es wurden zwei Stoffe (5-ethyl-2-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl dimethyl phosphonate P-oxide (CAS-Nr.: 41203-81-0, hier abgekürzt als MDPO) und Bis[(5-ethyl-2-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl] methyl phosphonate P,P'-dioxide (CAS-Nr.: 42595-45-9, hier abgekürzt als BMPD) untersucht. Die Analytik fand mittels anreicherungsfreier LC-MS statt. Quantifizierung im Sinne der Angabe von µg/L o.ä. konnte aus analytischer Sicht nicht erfolgen. Deshalb wurden relative Messwerte bezogen auf den Zulauf angegeben. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.3.2 dargestellt.

Tabelle 2.4: Abwasserproben für die weitere Analytik durchgeführt wurde

Probenahmedatum	Bezeichnung	Sollwert Δ SAK ₂₅₄	Non-Target-Screening	Untersuchung FPB und ARG	Phosphonate	Spez. Ozonkonz. [mg O ₃ / mg DOC]
25.01.2022	PN1	40		X		0,8
18. – 19.04.2022	PN2	40			X	0,59
02. – 03.05.2022	PN3	30		X		0,56
09. – 10.05. 2022	PN4	30	X			0,51
26. – 27.07.2022	PN5	30	X	X	X	0,49
17. – 18.10.2022	PN6	40	X	X	X	0,65

3 Untersuchungsergebnisse

3.1 Abwassermenge

3.1.1 Gesamtabwassermenge der Kläranlage

In Abbildung 3-1 ist die Gesamtabwassermenge des Zulaufs zur KA Tübingen im Untersuchungszeitraum vom 01.01.2022 bis 23.10.2022 dargestellt.

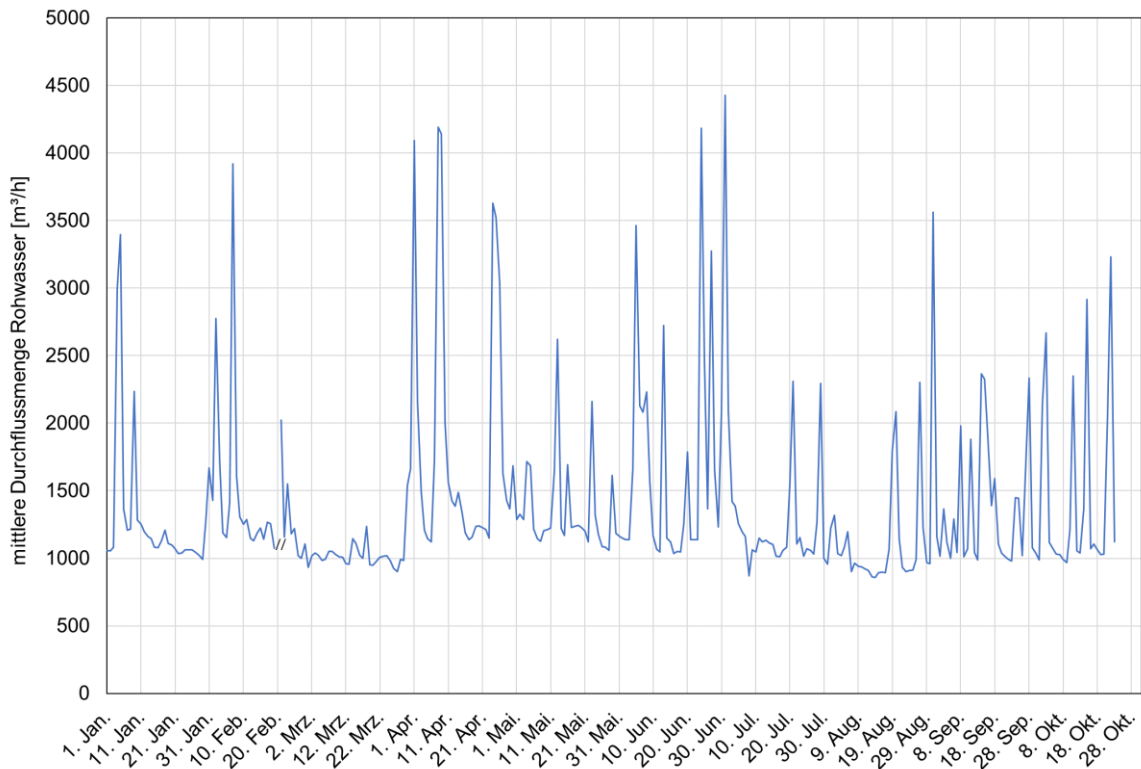


Abbildung 3-1: Tageswerte der mittleren Zulaufabwassermenge zur KA Tübingen [m³/h]

Insgesamt wurde in diesem Zeitraum eine Abwassermenge von 9.919.947 m³ behandelt. Die Ozonanlage auf der KA Tübingen ist als Teilstromverfahren ausgelegt. D.h. es wird nur ein Teil des biologisch behandelten Abwassers auch über die Ozonanlage geleitet. Die Durchflussmenge der Ozonanlage ist im Kapitel 3.1.2 dargestellt.

3.1.2 Durchflussmenge Ozonanlage

In Abbildung 3-2 ist die Durchflussmenge des Rohabwassers über die Ozonanlage im Untersuchungszeitraum vom 01. Januar bis 23. Oktober 2022 dargestellt.

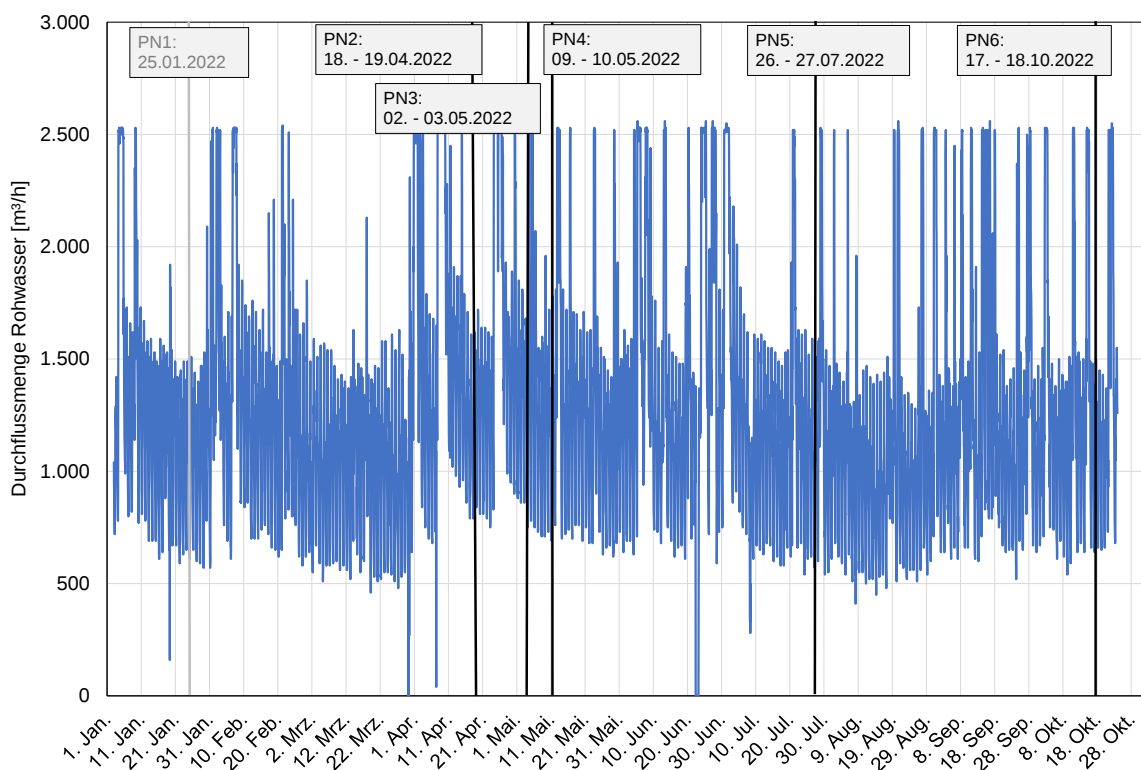


Abbildung 3-2: Stundenwerte der Durchflussmenge des Rohabwassers durch die Ozonanlage [m³/h]

Der durchschnittliche Rohwasserdurchfluss betrug 1.279 m³/h. Insgesamt wurde im genannten Zeitraum eine Abwassermenge von 9.019.940 m³ behandelt. Bezogen auf den Gesamtzufluss der Kläranlage (vgl. Abbildung 3-1) wurde somit ein Abwasseranteil von 91 % einer weitergehenden Abwasserreinigung unterzogen. Die Probenahmen wurden bevorzugt an Trockenwettertagen durchgeführt. In Tabelle 3.1 sind die Durchflussmengen an den einzelnen Probenahmetagen aufgelistet. Im Durchschnitt betrug die behandelte Abwassermenge an den Probenahmetagen 57.000 m³/48h.

Tabelle 3.1: Durchflussmengen an den Probenahmetagen

Probenahmedatum	Bezeichnung	Sollwert Δ SAK ₂₅₄	Spez. Ozonkonz. [mg O ₃ / mg DOC]	Durchflussmenge [m³/48h]
18. – 19.04.2022	PN2	40	0,55	59.180
02. – 03.05.2022	PN3	30	0,56	64.600
09. – 10.05.2022	PN4	30	0,51	58.150
26. – 27.07.2022	PN5	30	0,49	49.960
17. – 18.10.2022	PN6	40	0,65	51.760

3.2 Anlagenbetrieb

In Tabelle 3.2 sind die Betriebseinstellungen während des Untersuchungszeitraums vom 01. Januar bis 23. Oktober 2022 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Betriebseinstellungen im Untersuchungszeitraum

Datum	Betriebsart	Grund- OZON- bedarf	ΔSAK_{254}	$\text{SAK}_{\text{Korr, min}}$	$\text{SAK}_{\text{Korr, max}}$	$\text{RO}_{\text{Korr, min}}$	$\text{RO}_{\text{Korr, max}}$
01.01.2022	SAK ₂₅₄ -Absorbanz	5	40	50	125	75	125
21.04.2022		5	30	50	150	75	125
11.05.2022		4	30	50	150	75	125
08.06.2022	Durchflussprop. 3,0 mg O ₃ /L	-	-	-	-	-	-
07.07.2022	Durchflussprop. 2,5 mg O ₃ /L	-	-	-	-	-	-
14.07.2022	SAK ₂₅₄ Absorbanz	4	30	50	150	75	125
29.08.2022		4	40	50	150	75	125

Abgesehen vom 08.06. – 14.07.2022 erfolgte die Regelung durchgehend über die SAK₂₅₄-Absorbanzabnahme. Zu Beginn der Inbetriebnahme war jedoch aufgrund eines Drifts in den Sondenmesswerten keine langfristige verlässliche Regelung über den ΔSAK_{254} möglich, weshalb die Anlage in genannten Zeitraum auf eine volumenproportionale Steuerung umgestellt wurde. Durch Vergleichsmessungen seitens des Sondenherstellers und der regelmäßigen Reinigung der Messsonden wurde der Sondendrift minimiert. In Abbildung 3-3 sind Vergleichsmessungen der Sondenmesswerte mit den Labormesswerten des SAK₂₅₄ und des ΔSAK_{254} an den 6 Probenahmetagen dargestellt.

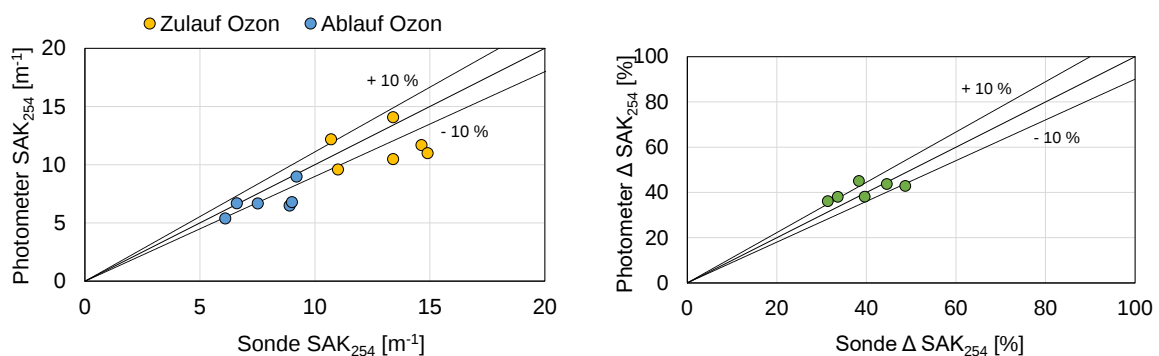


Abbildung 3-3: Vergleichsmessungen zum ΔSAK_{254} bei den sechs Spurenstoffbeprobungen.

Die Sondenwerte lagen im Vergleich zu den Laborwerten insbesondere im Ablauf der Ozonanlage deutlich höher, wodurch häufig ein höherer realer ΔSAK_{254} -Wert erzielt wurde als gefordert. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit gut kalibrierter und aufeinander abgestimmter Messsonden für die Regelung nach ΔSAK_{254} -Absorbanz. Bereits kleine Abweichungen können zu größeren Abweichungen im ΔSAK_{254} führen und die Ozondosierung beeinflussen.

Um die Komplexität der Regelung des Ozoneintrages zu verdeutlichen, werden in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 zwei Beispiele anhand der Probenahmetage 4 und 5 dargestellt. An beiden Tagen ist ein Sollwert des ΔSAK_{254} von 30 % eingestellt. Bei Probenahme 4 liegt der tatsächliche Wert jedoch bei 40 %. Die Anlage arbeitet bereits im Bereich der minimal möglichen Ozonproduktion von 3,125 kg/h, wodurch eine weitere Reduktion zur Einhaltung des Sollwertes nicht möglich war. Dieses Problem trat auch bei den Probenahmen 2 und 3, wenn auch in geringerem Umfang, auf.

Aus diesem Grund wurde am 11. Mai der Grundozonbedarf von 5 kg/h auf 4 kg/h reduziert. Durch die neue Einstellung ergab sich eine minimal mögliche Ozonproduktion von 2,5 kg/h. Das steile Absinken der Messwerte der Zulaufsonde nach PN4 ist durch die Reinigung der Sonde bedingt. Am 13. Mai stiegen die Messwerte der Sonde im Ablauf stark an, sodass der ΔSAK_{254} kurz in den negativen Wertebereich sank und die Anlage am Maximum Ozon produzierte. Es liegt zudem sowohl ein Drift der Sonden im Zu- als auch im Ablauf vor.

Im Gegensatz zu PN2, PN3 und PN4, schwankt die Ozonproduktion bei PN5 angepasst an den SAK_{254} -Rückgang zwischen 2,5 kg/h und 4,5 kg/h und die Anlage hält den Sollwert mit einer geringen Abweichung ein. Auch bei dieser Einstellung ist zwei Mal eine kürzere Stagnation der Ozonproduktion bei dem Mindestozonbedarf zu erkennen. Am 29. Juli wurde hingegen das durch die Regelung zulässige Maximum der Ozonanlage erreicht und der ΔSAK_{254} sank aufgrund der Unterdosierung unter den Sollwert.

Am 24. Juli ist die Anlage für einen Tag ausgefallen. Bei Trockenwetter arbeitet in den Nachtstunden aufgrund des reduzierten Durchflusses meistens nur eine Pumpe. Durch das Zuschalten der zweiten Pumpe bei steigendem Durchfluss kommt es zu einem hydraulischen Stoß, sodass kurzzeitig der Wasserspiegel am Auslauf sinkt und vermehrt Ozon austritt. Als Folge dessen schaltet sich die Anlage aus Sicherheitsgründen ab. Durch das Heben der Wassertiefe im Ablauf des Reaktors Ende August konnte das Problem behoben werden.

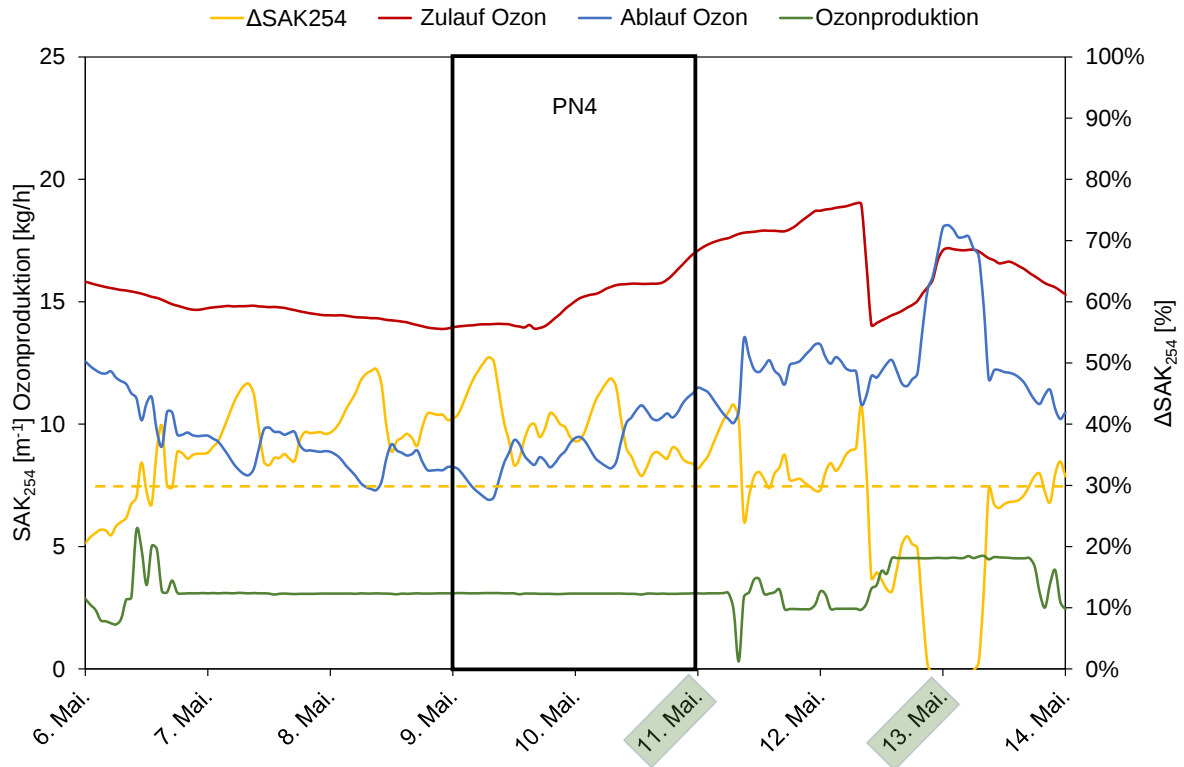


Abbildung 3-4: Betriebsdaten zur Ozonproduktion und SAK_{254} während der Probenahme 4

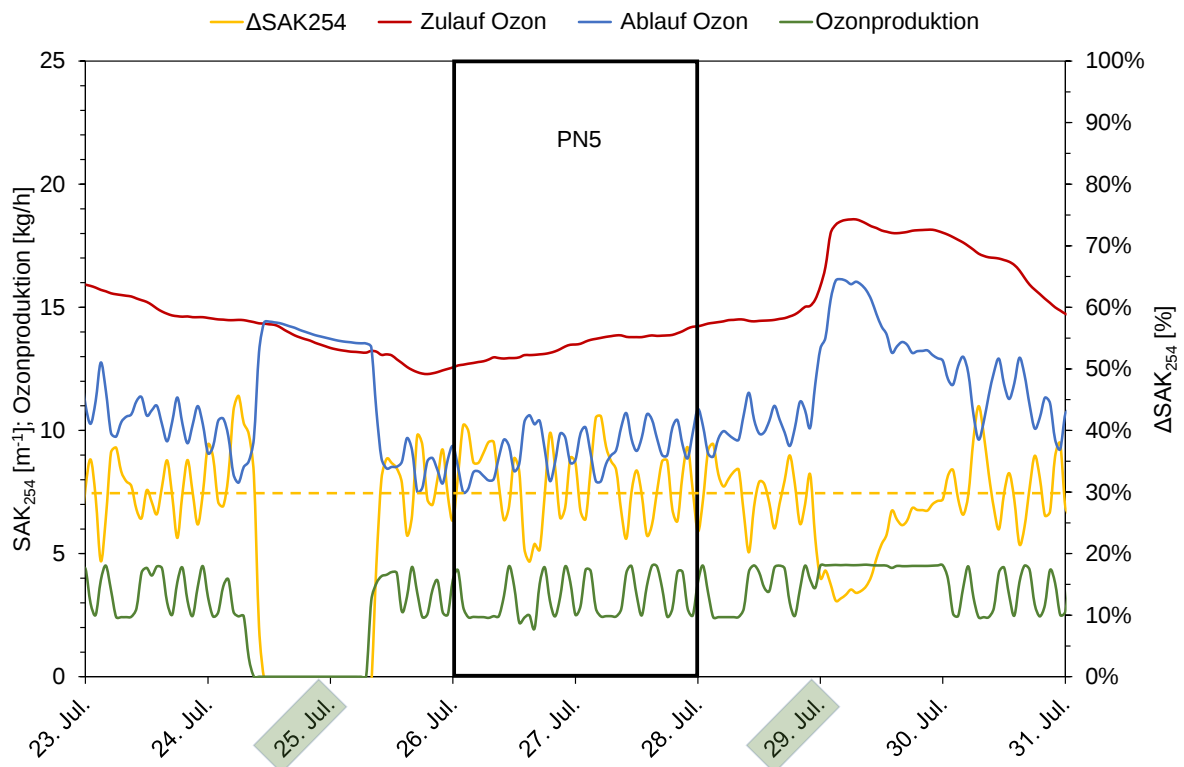


Abbildung 3-5: Betriebsdaten zur Ozonproduktion und SAK_{254} während der Probenahme 5

3.3 Standardanalytik

3.3.1 CSB und AFS

In Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7 ist die Konzentration des chemischen Sauerstoffbedarfs und der abfiltrierbaren Stoffe im Zulauf und Ablauf der Kläranlage bzw. des Sandfilters dargestellt.

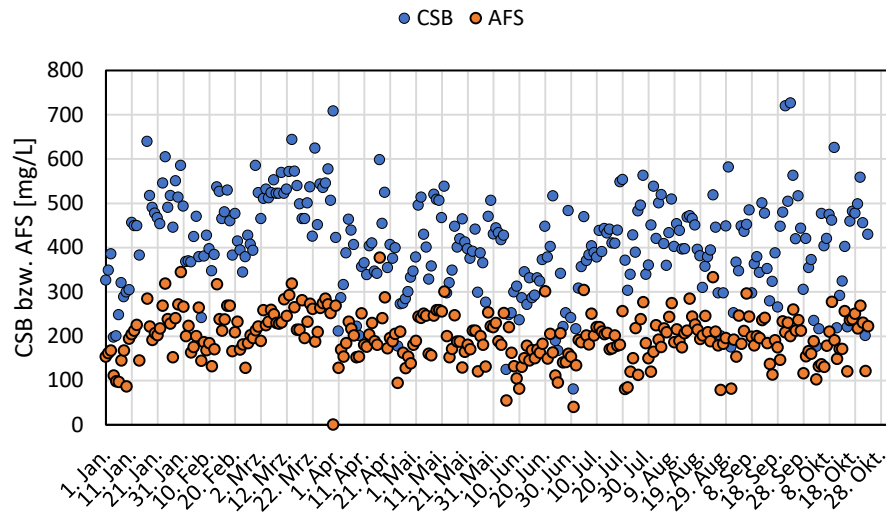


Abbildung 3-6: Konzentrationen des CSB und AFS im Kläranlagenzulauf [mg/L]

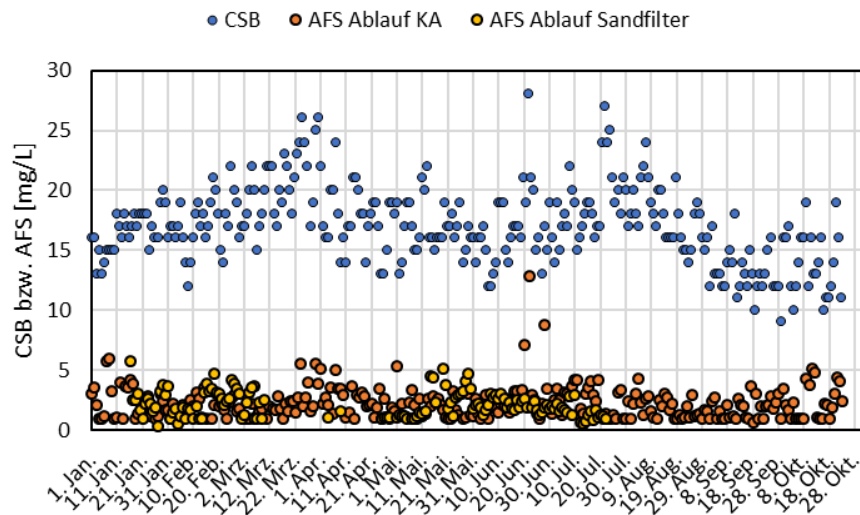


Abbildung 3-7: Konzentrationen des CSB und AFS im Kläranlagen- bzw. Sandfilterablauf [mg/L]

Im Mittel betrug die CSB-Konzentration im Zulauf 410 mg/L. Im Ablauf der Kläranlage konnte der CSB auf 17 mg/L reduziert werden. Im Ablauf des Sandfilters lag die CSB-Konzentration bei 12 mg/L. Auch die AFS-Werte wurden von 198 mg/L im Zulauf der Kläranlage auf 2,24 mg/L im Kläranlagenablauf bzw. 2,14 mg/L im Ablauf des Sandfilters reduziert.

3.3.2 Phosphorelimination

In Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 ist die Konzentration des Gesamtphosphors und des Orthophosphats im Zulauf und Ablauf der Kläranlage dargestellt.

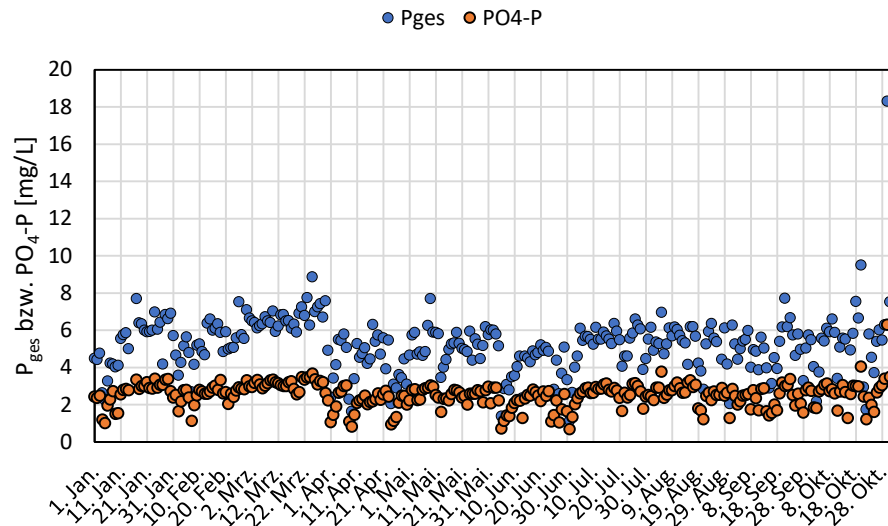


Abbildung 3-8: Konzentrationen des Gesamtphosphors und Orthophosphats im Kläranlagenzulauf [mg/L].

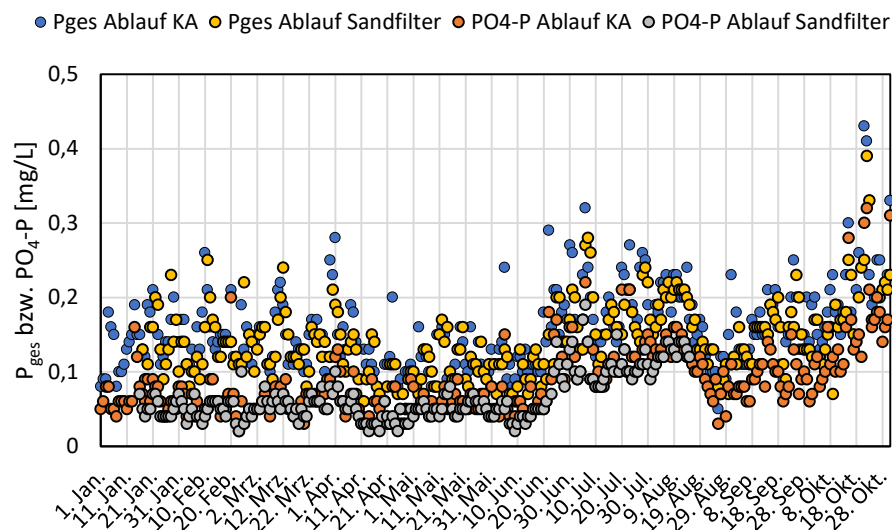


Abbildung 3-9: Konzentrationen des Gesamtphosphors und Orthophosphats im Kläranlagen- bzw. Sandfilterablauf [mg/L].

Die Gesamtphosphorkonzentration im Kläranlagenzulauf betrug durchschnittlich 5,15 mg/L. Die Konzentration des Gesamtphosphors im Ablauf der Kläranlage lag im Mittel bei 0,15 mg/L, wodurch im Mittel eine Elimination von 97 % über die gesamte Kläranlage erfolgte. Im Ablauf des Sandfilters liegen durchschnittlich ähnliche Konzentrationen von 0,14 mg/L vor.

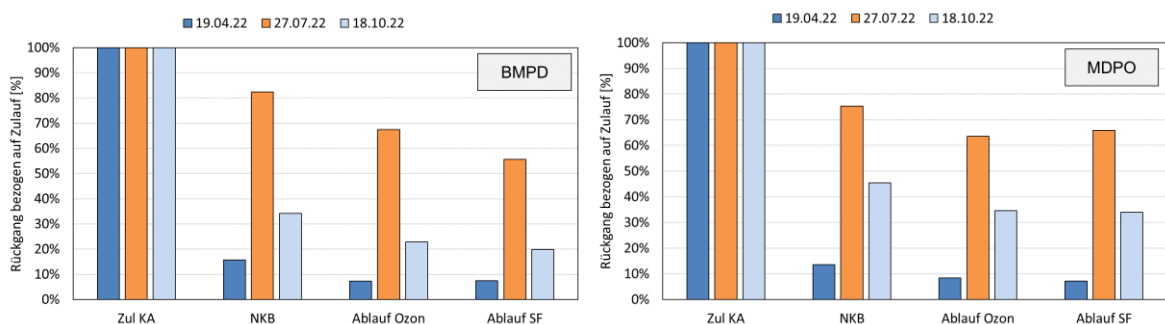
Die Zulaufkonzentration des Orthophosphats lag bei 2,51 mg/L. Im Ablauf der Kläranlage wurden Konzentrationen von 0,08 mg/L festgestellt, was ebenfalls einer Elimination von durchschnittlich 97 % entspricht. Im Ablauf des Sandfilters lag die mittlere Orthophosphat-

Konzentration bei 0,07 mg/L. Somit wären auch die zukünftig geltenden verschärften Ablaufkonzentrationen für Gesamtphosphor und Orthophosphat eingehalten (LUBW, 2021).

In der wasserrechtlichen Genehmigung wurde ein Grenzwert für P_{ges} von 0,3 mg/l in der 24h-Mischprobe festgeschrieben. Dieser konnte mit Ausnahme von drei Tagen Ende Oktober eingehalten werden (21.10.2022: 0,39 mg/l; 22.10.2022: 0,33 mg/l; 31.10.2022: 0,33 mg/l). Der Grund für die Überschreitungen liegt an einer unerwarteten hohen Zulaufkraft an einzelnen Tagen mit Spitzen bis 465 kg/d (im Vergleich zu einem Mittelwert der letzten 5 Jahren von 165 kg/d). Die Steuerung der Fällmitteldosierung war sowohl in der Biologie als auch am Sandfilter nicht auf diese hohen Werte ausgerichtet. Dementsprechend wurde nicht genügend Fällmittel zugegeben.

An drei Probenahmetagen wurden zudem die Phosphonate (5-ethyl-2-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl dimethyl phosphonate P-oxide (CAS-Nr.: 41203-81-0, hier abgekürzt als MDPO) und Bis[(5-ethyl-2-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl] methyl phosphonate P,P'-dioxide (CAS-Nr.: 42595-45-9, hier abgekürzt als BMPD) untersucht. Die Ergebnisse sind als relative Messwerte bezogen auf den Zulauf angegeben. Durch den Prozess der Abwasserreinigung ist eine Verringerung der Phosphonate erkennbar. Den größten Effekt hat dabei die mechanisch-biologische Stufe. Dieser Effekt variiert jedoch stark zwischen den Probenahmen, sodass Verringerungen auf ca. 15 % (PN1) und > 80 % (PN 2) festgestellt werden konnten. Durch die Ozonung mit nachgeschalteter Sandfiltration findet eine weitere Reduktion der untersuchten Phosphonate statt.

Abbildung 3-10: Ergebnisse der Phosphonat-Messungen



3.5 Spurenstoffelimination

3.5.1 Biologische Stufe

In Abbildung 3-11 ist die Spurenstoffelimination in der biologischen Stufe der Kläranlage für die einzelnen Probenahmen dargestellt.

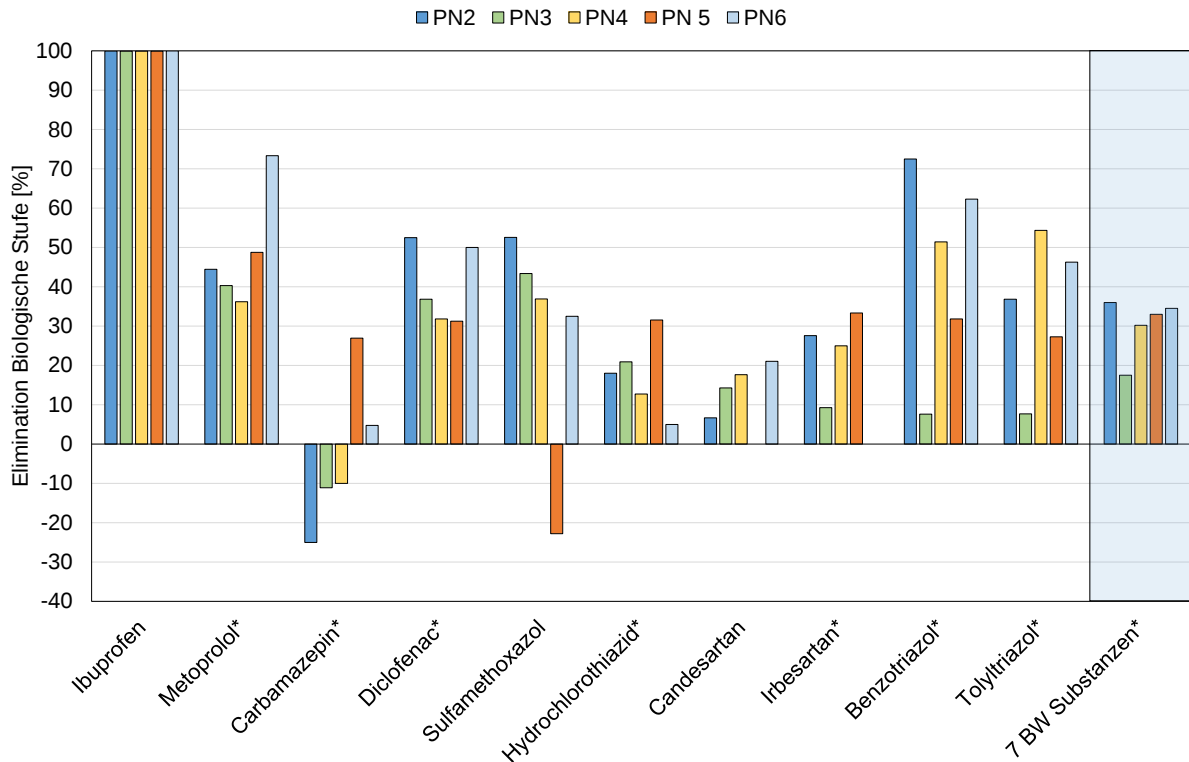


Abbildung 3-11: Spurenstoffelimination in der biologischen Stufe der Kläranlage

Ibuprofen ist sehr gut biologisch abbaubar und lag bei allen Probenahmen im Ablauf der Nachklärung unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,025 µg/l. Bei allen anderen Substanzen sind Schwankungen in der Elimination feststellbar.

Für Carbamazepin wurde in den Probenahmen 2 bis 4 eine negative Elimination berechnet, welche jedoch im Rahmen der Messunsicherheit der Spurenstoffanalytik liegt. Carbamazepin ist tendenziell nicht gut biologisch abbaubar. Es ist davon auszugehen, dass keine Elimination dieser Substanz während den betroffenen Probenahmen stattfand.

Für Sulfamethoxazol wurde bei Probenahme 5 eine negative Elimination ermittelt, dessen Ursache unklar ist, welche jedoch ebenfalls im Rahmen der Messunsicherheit der Spurenstoffanalytik liegt.

Insbesondere während Probenahme 3 wurde eine wesentlich geringere Elimination der Substanzen Irbesartan, Benzotriazol und Tolyltriazol festgestellt. Während PN 3 wurde die höchste Abwassermenge behandelt, sodass teilweise niedrigere Zulaufkonzentrationen vorliegen als in den anderen Beprobungen. Entsprechend fällt daher auch die Elimination geringer aus. Zudem unterliegen auch die Zulaufkonzentrationen der Korrosionsschutzmittel starken Schwankungen im Kläranlagenzulauf.

Die 7 BW Substanzen (*) wurden im Mittel zu 30 % biologisch abgebaut, wobei bei PN3 mit einer Elimination von 18 % aus genannten Gründen die niedrigste Elimination vorlag.

3.5.2 Ozonstufe

In Abbildung 3-12 ist die Spurenstoffelimination der Einzelsubstanzen in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis dargestellt.

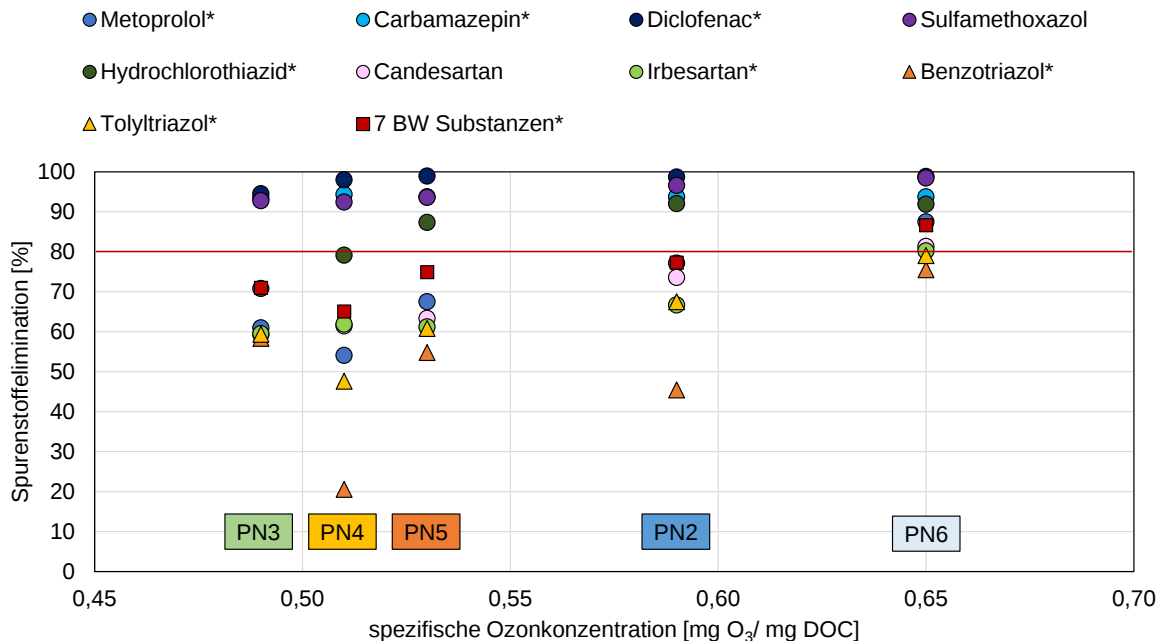


Abbildung 3-12: Spurenstoffelimination in der Ozonstufe der Kläranlage in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis [mg O₃/ mg DOC]

Die Probenahmen 2 und 6 wurden bei einem Δ SAK₂₅₄-Sollwert von 40 % durchgeführt, die Probenahmen 3 bis 5 bei 30 %. Entsprechend lag bei den Probenahmen 2 und 6 mit 0,59 und 0,65 mgO₃/mg DOC eine höhere spezifische Ozondosis vor als bei den Probenahmen 3 bis 5 mit 0,49 bis 0,53 mg O₃/ mg DOC.

Die Substanz Ibuprofen wurde in der biologischen Stufe der Kläranlage bereits bis unterhalb der Bestimmungsgrenze abgebaut, weshalb keine Elimination in der Ozonstufe stattfand.

Die Substanz Carbamazepin wurde unabhängig von der Ozondosis zu etwa 94 % eliminiert. Auch die Substanz Diclofenac wurde weitestgehend unabhängig von der Ozondosis zu durchschnittlich 98 % eliminiert.

Bei den Substanzen Sulfamethoxazol, Hydrochlorothiazid, Candesartan und Irbesartan ist eine Steigerung der Elimination mit zunehmender Ozondosis zu erkennen.

Die Elimination der Substanzen Metoprolol, Benzotriazol und Tolyltriazol unterliegt stärkeren Schwankungen. Insbesondere während Probenahme 4 wurden die beiden Korrosionsschutzmittel zu lediglich 21 % bzw. 48 % eliminiert, während in anderen Probenahmen die Elimination zwischen 59 % und 79 % lag. Dennoch ist tendenziell eine Steigerung der Elimination durch höhere Ozondosen ersichtlich.

Die mittlere Elimination der 7 BW Substanzen betrug bei den beiden Einstellungen im Mittel 82 % bzw. 70 %. Durch die Steigerung des ΔSAK_{254} -Sollwertes um 10 Prozentpunkte konnte die Spurenstoffelimination somit um 12 Prozentpunkte gesteigert werden.

3.5.3 Sandfilter

In Abbildung 3-13 ist die mittlere Spurenstoffelimination aller 48h-Mischproben im Sandfilter dargestellt.

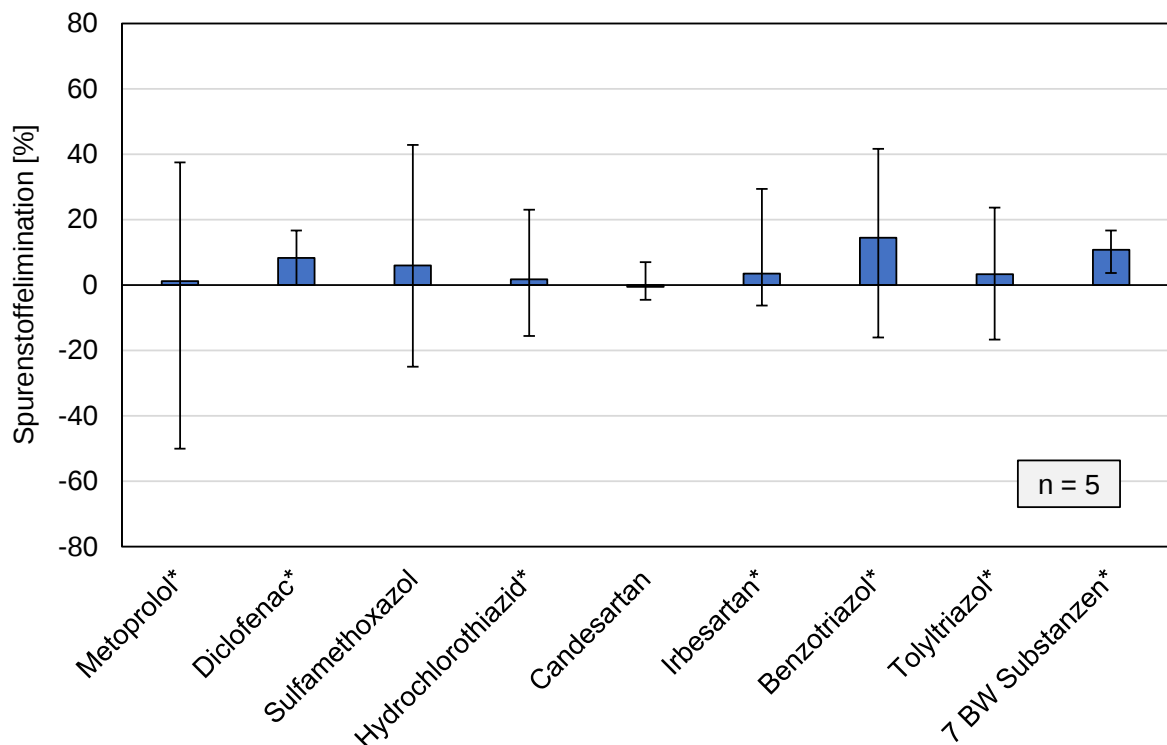


Abbildung 3-13: Mittlere Spurenstoffelimination im Sandfilter (inkl. Minima und Maxima)

Die Substanzen Ibuprofen und Carbamazepin wurden bereits durch die biologische Behandlung bzw. die Ozonung bis unterhalb der Bestimmungsgrenze eliminiert und sind daher nicht in dem Diagramm dargestellt. Grundsätzlich konnte keine relevante Spurenstoffelimination durch die Sandfiltration festgestellt werden. Häufige negative Eliminationen liegen im Rahmen der Messunsicherheit der Analysemethodik und Probenahmestrategie.

3.5.4 Gesamtelimination

In Abbildung 3-14 ist die Spurenstoffelimination der Einzelsubstanzen in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis über die gesamte Kläranlage dargestellt.

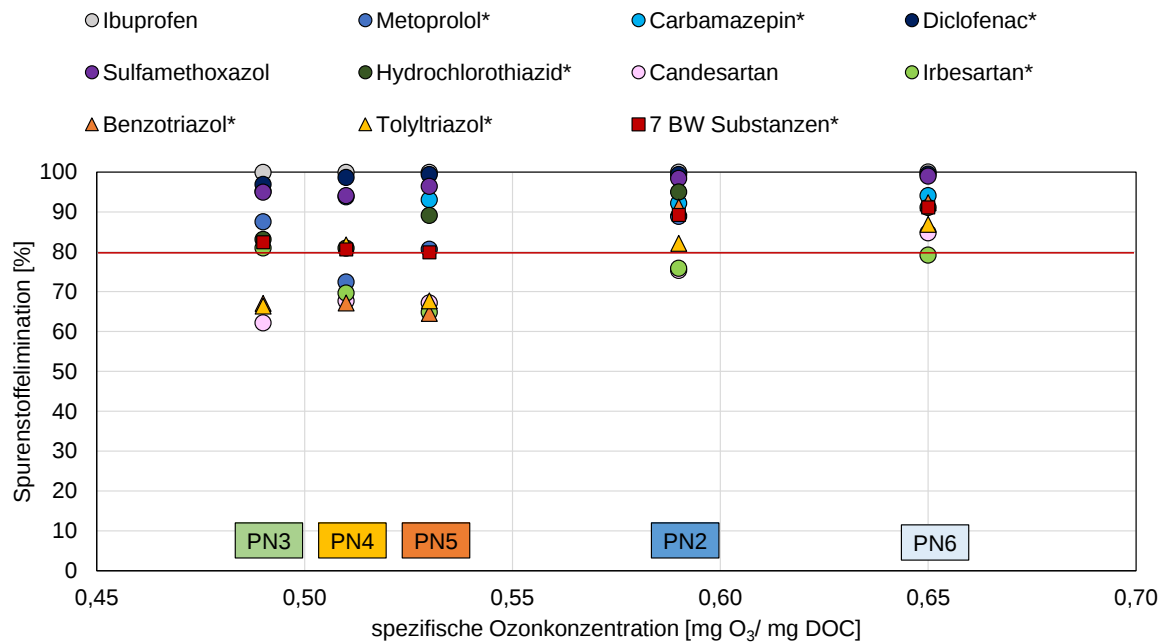


Abbildung 3-14: Spurenstoffelimination über die gesamte Kläranlage in Abhängigkeit der spezifischen Ozondosis [mg O₃/ mg DOC]

Die Einhaltung der geforderten 80 %-igen Elimination der 7 BW Substanzen ist bei allen getesteten Ozondosen gegeben.

3.6 Vergleichsmessungen Spurenstoffliste A

Um den Effekt der Ozonung mit nachgeschaltetem Sandfilter auf die Konzentration der Spurenstoffe auf der Kläranlage genauer zu untersuchen, wurden außerdem weitere Messungen der KomS Spurenstoffliste A durchgeführt. Dafür wurden je drei Probenahmen vor dem Ausbau der Kläranlage und weitere drei Probenahmen nach dem Ausbau durchgeführt. Es wurden 72-Stunden Mischproben je im Zulauf der Kläranlage im Ablauf der Nachklärung, im Ablauf des Ozonreaktors und im Ablauf des Sandfilters genommen. Bei der dritten Probenahme nach dem Ausbau 2024 konnte auf Grund der Wetterbedingungen lediglich eine 48-Stunden Mischprobe genommen werden. Die Daten der Messkampagnen für die Vergleichsmessungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Weiterhin sind in Tabelle 3.4 die Rahmenbedingungen der Messkampagnen und der Umfang der Untersuchungen aufgelistet.

Tabelle 3.3: Übersicht der Messkampagnen zur Vergleichsmessung vor und nach dem Ausbau

Messkampagne	Datum	Uhrzeit	Probenart	Probenahmestelle KA
2018-1	10.07. – 12.07.	0 ⁰⁰ - 24 ⁰⁰	72 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA
2018-2	20.11. – 22.11.	0 ⁰⁰ - 24 ⁰⁰	72 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA
2019-1	14.05. – 16.05.	0 ⁰⁰ - 24 ⁰⁰	72 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA
2023-1	30.05. – 01.06.	0 ⁰⁰ - 24 ⁰⁰	72 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA
2024-1	07.05. – 09.05.	0 ⁰⁰ - 24 ⁰⁰	72 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA
2024-2	21.09. – 22.09.	8 ⁰⁰ - 8 ⁰⁰	48 h-Mischprobe	Zulauf, Ablauf NKB, Ablauf Ozonung, Ablauf KA

Tabelle 3.4: Kläranlagen- und Untersuchungsdaten der Messkampagnen zur Vergleichsmessung vor und nach dem Ausbau

Messkampagne	Ozondosis [mg/L]	Wetter	Zulauf Kläranlage [m³/h]	Untersuchungsumfang
2018-1	-	TW	1.059	Liste A
2018-2	-	TW	927	Liste A
2019-1	-	TW	1.056	Liste A
2023-1	2,32	TW	1.213	Liste A
2024-1	2,28	Nachlauf/TW	1.440	Liste A
2024-2	2,01	TW	1.364	Liste A

Während der Zulauf der Kläranlage bei den Vergleichsmessungen vor dem Ausbau der Kläranlage bei Trockenwetter zwischen 927 m³/h (2018-2) und 1.059 m³/h (2018-1) lag, waren die Zulaufmengen bei den Vergleichsmessungen nach dem Ausbau wetterbedingt höher zwischen 1.213 m³/h (2023-1) und 1.440 m³/h (2024-1), wobei der Zulauf bei letzterer Mischprobe noch teilweise als Regennachlauf kategorisiert ist. Bei den Vergleichsmessungen nach dem Ausbau wurden Ozondosen zwischen 2,01 mg/L (2024-2) und 2,32 mg/L (2023-1) eingesetzt.

In Abbildung 3-15 sind die Ergebnisse der Spurenstoffkonzentrationen der Vergleichsmessungen im Zulauf der Kläranlage dargestellt. Für die meisten der untersuchten Stoffe liegen die Zulaufkonzentrationen vor und nach dem Ausbau auf demselben Niveau. Insbesondere die Humanarzneimittel weisen nur geringfügige Abweichungen auf. Für die untersuchten Röntgenkontrastmittel und Benzotriazole zeigt sich tendenziell eine leichte Verringerung der Konzentrationen zwischen den Messkampagnen vor und nach dem Ausbau, das auf den Verdünnungseffekt durch die höheren Abwassermengen im Jahr 2023/24 zurückzuführen sein kann. Einige der untersuchten Stoffe, insbesondere aus den Gruppen der Pestizide und der perfluorierten Verbindungen lagen sowohl vor dem Ausbau wie auch danach bereits im Zulauf der Kläranlage nur im Bereich ihrer Bestimmungsgrenze oder darunter vor. Die Konzentrationsunterschiede in den Zulaufproben führen dazu, dass die Ergebnisse der Eliminationen vor und nach dem Ausbau für manche Spurenstoffe nur bedingt vergleichbar sind.

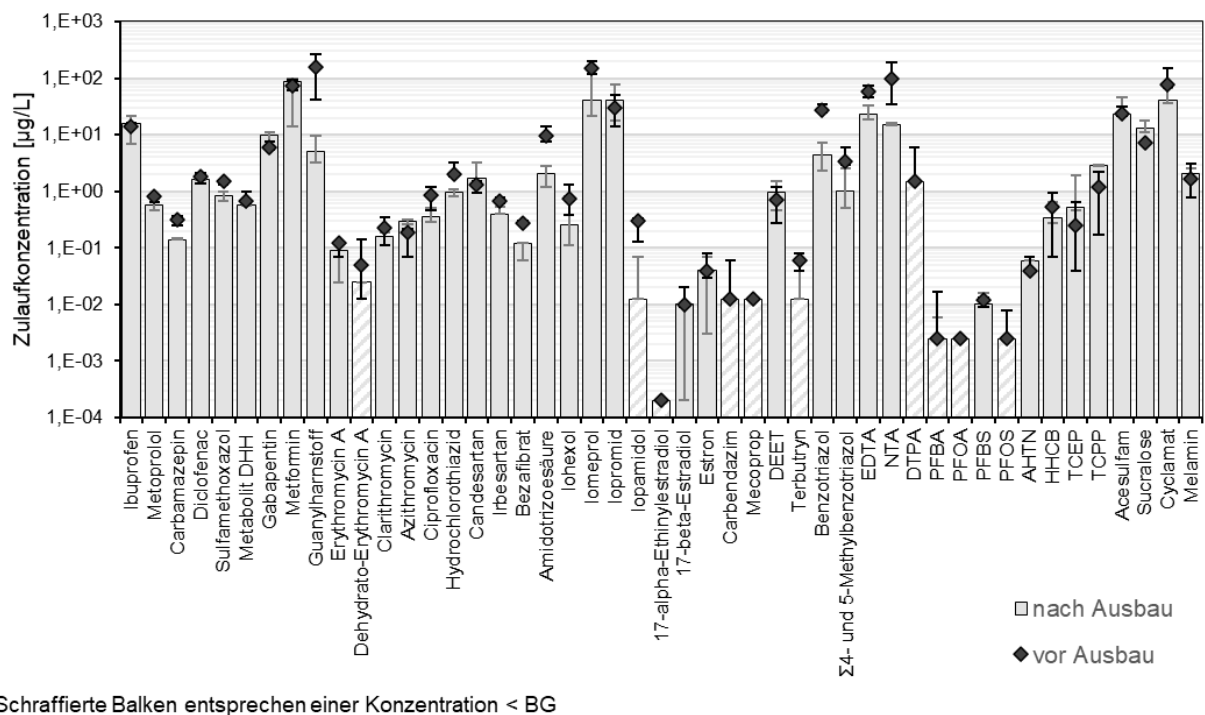


Abbildung 3-15: Zulaufkonzentrationen der untersuchten Stoffe vor und nach dem Ausbau der Kläranlage (dargestellt ist der Median sowie die Höchst- und Tiefstwerte der sechs Messkampagnen)

In Abbildung 3-16 sind die Ablaufkonzentrationen der Kläranlage vor und nach dem Ausbau dargestellt. Bei den Konzentrationen vor dem Ausbau handelt es sich dabei um den Ablauf des Nachklärbeckens der mechanisch-biologischen Behandlung. Die Konzentrationen nach dem Ausbau beziehen sich auf den Ablauf des Sandfilters im Anschluss an die Ozonbehandlung. In der Gruppe der Humanarzneimittel wurde nach dem Ausbau für jeden untersuchten Stoff eine Verringerung der Konzentration festgestellt. Bei den Stoffen, die bereits vor dem Ausbau bis unter ihre Bestimmungsgrenze abgebaut werden konnten, entsprechen die Konzentrationen nach dem Ausbau der Kläranlage auch denjenigen vor dem Ausbau. Das ist unter anderem für Ibuprofen oder 17-alpha-Ethinylestradiol der Fall.

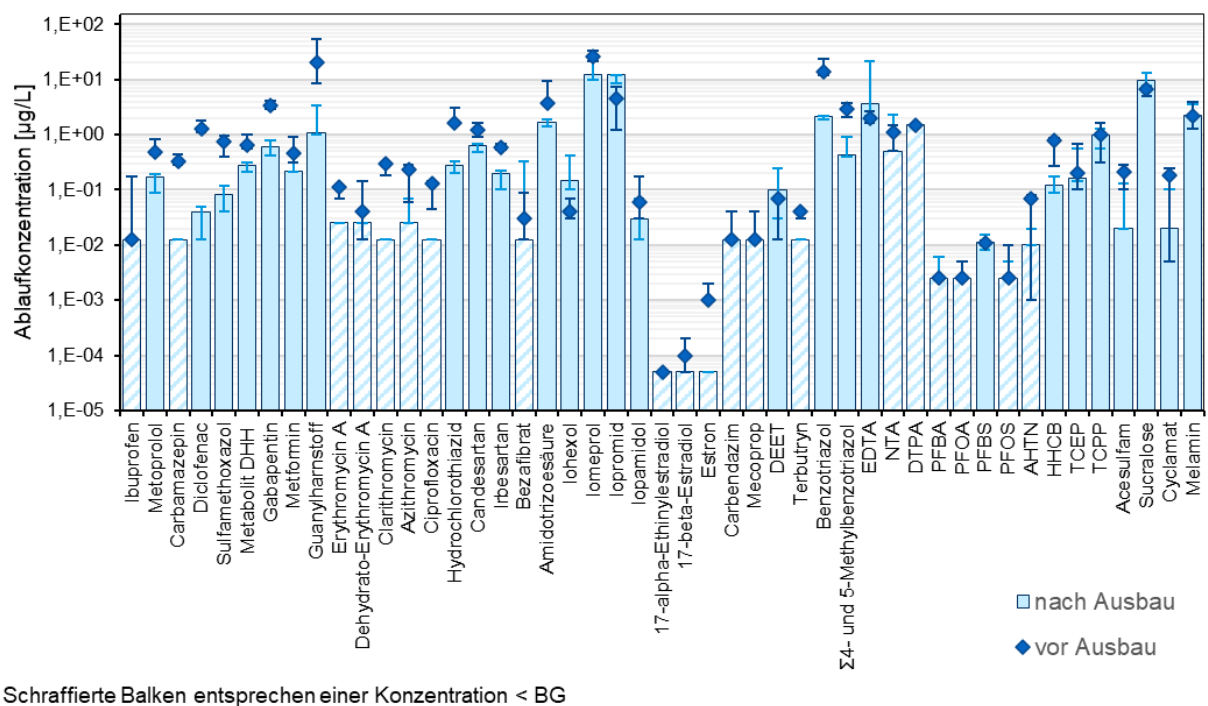


Abbildung 3-16: Ablaufkonzentrationen der untersuchten Stoffe vor und nach dem Ausbau der Kläranlage (dargestellt ist der Median sowie die Höchst- und Tiefstwerte der jeweils drei Messkampagnen)

Aus den dargestellten Konzentrationen lassen sich die Eliminationen für die Humanarzneimittel ermitteln (Abbildung 3-17). Im Vergleich zu den Eliminationen vor dem Ausbau zeigt sich für fast alle untersuchten Humanarzneimittel eine bessere Elimination durch die Ozonung. Aus der Gruppe der Humanarzneimittel wurde Ibuprofen schon vor der Nachrüstung bis unter die Bestimmungsgrenze biologisch abgebaut. Die Substanzen Erythromycin A, Clarithromycin und Azithromycin, für bei denen vor dem Ausbau keine Verringerung der Konzentration festgestellt wurde, konnten in den Vergleichsmessungen nach dem Ausbau bis unter die Bestimmungsgrenze eliminiert werden. Dehydrato-Erythromycin A lag in allen Vergleichsmessungen nach dem Ausbau im Zulauf bereits unter der Bestimmungsgrenze vor.

Die Eliminationen der Spurenstoffe aus den Gruppen der Röntgenkontrastmittel, Estrogene, Pestizide und Triazole sind in Abbildung 3-19 dargestellt. Die Röntgenkontrastmittel wurden

nach dem Ausbau allgemein weniger gut entfernt als bei den Vergleichsmessungen vor dem Ausbau. Zurückzuführen ist das auf die deutlich schlechtere mechanisch-biologische Entfernung dieser Substanzen zum Zeitpunkt der Messungen nach dem Ausbau, die unter anderem auf die Rahmenbedingungen der Messkampagnen zurückzuführen ist. Diese Auswirkungen werden im Folgenden detaillierter erläutert.

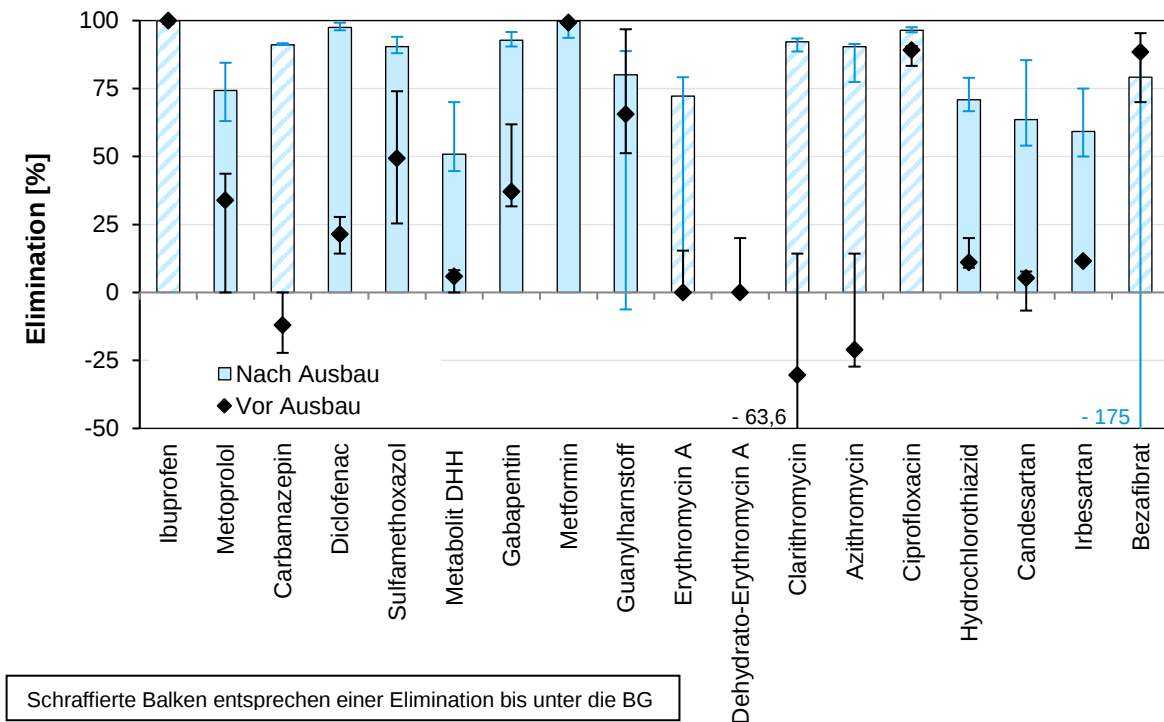


Abbildung 3-17: Erreichte Eliminationen der Humanarzneimittel durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.

Die untersuchten Estrogene werden vor und nach dem Ausbau der Kläranlage bis unter die Bestimmungsgrenze entfernt. Terbutryn lag bei zwei der drei und Carbendazim und Mecropop bei allen drei Messkampagnen nach dem Ausbau bereits in der Zulaufprobe unterhalb der Bestimmungsgrenze vor; daher ist eine Auswertung nicht möglich. Die Triazole zeigen eine bessere Elimination nach dem Ausbau der Kläranlage. Sie werden nach dem Ausbau im Median zu über 50 % entfernt.

Alle weiteren untersuchten Spurenstoffe aus den Gruppen der der synthetischen Komplexbildner, der perfluorierten Verbindungen, der synthetischen Duftstoffe, der Flamschutzmittel, der synthetischen Süßstoffe und weiterer Spurenstoffe sind in Abbildung 3-18 dargestellt.

Die synthetischen Komplexbildner EDTA und NTA werden dabei bereits durch die mechanisch-biologische Behandlung der Kläranlage zu über 90 % entfernt, während vor und nach dem Ausbau für DTPA keine Elimination erzielt werden konnte. Für die vier untersuchten perfluorierten Verbindungen konnten vor und nach dem Ausbau im Median ebenfalls keine Eliminationen ermittelt werden.

Die untersuchten synthetischen Duftstoffe (AHTN und HHCB)) und Flammschutzmittel (TCEP und TCPP) zeigen in den Vergleichsmessungen eine deutlich bessere Entfernung durch die zusätzliche Ozonung. In jeder der drei Messungen werden die vier Spurenstoffe zwischen 57 % (TCPP, 2023-1) und 83 % (AHTN, 2023-1 und 2024-2) eliminiert. AHTN wird dabei bis unter die Bestimmungsgrenze entfernt.

Acesulfam und Cyclamat, aus der Gruppe der Süßstoffe werden sowohl vor wie auch nach dem Ausbau zu über 99 % eliminiert und für Sucralose zeigt sich eine verbesserte Elimination durch die weitergehende Reinigungsstufe.

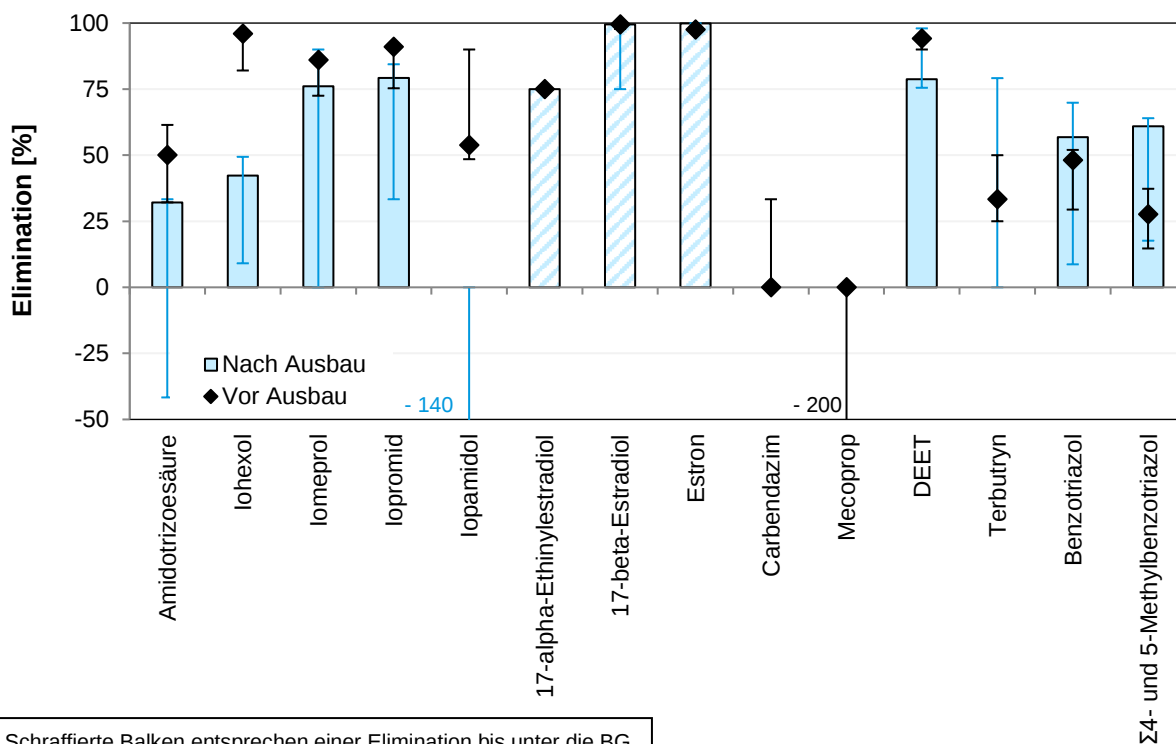


Abbildung 3-19: Erreichte Eliminationen der Röntgenkontrastmittel, Pestizide, Estrogene und Industriechemikalien durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.

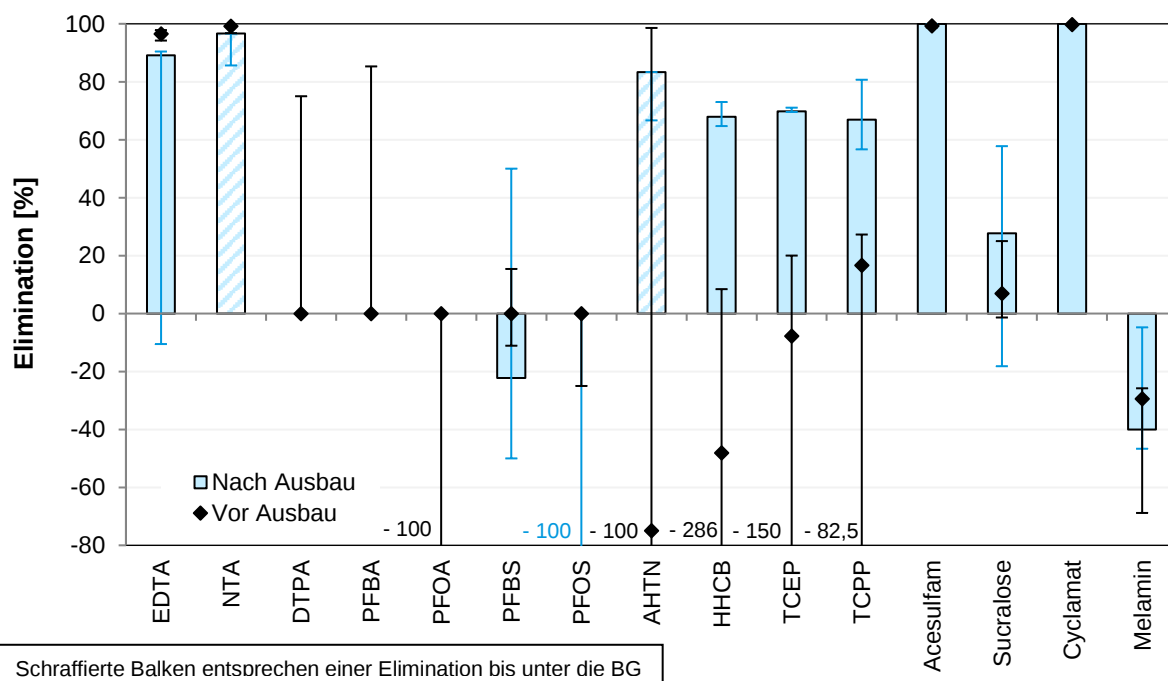


Abbildung 3-18: Erreichte Eliminationen der synthetischen Komplexbildner, der perfluorierten Verbindungen, der synthetischen Duftstoffe, der Flamschutzmittel, der synthetischen Süßstoffe und von Melamin durch Ozonung und Sandfilter in den Jahren 2023 und 2024 im Vergleich zu den Eliminationen der Vergleichsmessungen vor dem Ausbau im Median.

Die teilweise großen Schwankungen zwischen Median, Minimal- und Maximalwert der ermittelten Eliminationen für die Spurenstoffe dieser Stoffgruppen in Abbildung 3-18 lassen sich auf die sehr niedrigen Konzentrationen im Zulauf für diese Stoffe und die damit verbundene allgemeine Unsicherheit der analytischen Bestimmung zurückführen. Auch die in dargestellten negativen Eliminationen für PFBS und Melamin sind auf diese Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Im Rahmen der Vergleichsmessungen wurde auch ermittelt welchen Anteil die nachgerüstete Ozonung mit anschließender Sandfiltration an der Gesamtelimination für die Spurenstoffe ausmacht. Dafür ist die Elimination nach dem Ausbau in Abbildung 3-20 aufgeteilt in den Anteil der biologischen Stufe und den Anteil der zusätzlichen Stufe durch Ozonung und Filter. Aufgeführt sind dabei die sieben Spurenstoffe, die in Baden-Württemberg zur Bewertung der Spurenstoffelimination herangezogen werden (BW Substanzen) sowie deren Mittelwert. Zum Vergleich ist für diese Spurenstoffe außerdem die Elimination vor dem Ausbau dargestellt.

Für alle sieben BW Substanzen kann durch den Ausbau eine deutlich höhere Elimination erreicht werden als allein durch die biologische Stufe. Die mittlere Elimination für alle sieben BW Substanzen der drei Vergleichsmessungen lag bei 75 % (2023-1), 78 % (2024-1) und 56 % (2024-2). Diese Eliminationen sind ausschließlich durch die zusätzliche Ozonung und Sandfiltration erreicht, da aus den Spurenstoffkonzentrationen der biologischen Stufe für die Vergleichsmessungen keine mittlere Elimination berechnet werden konnten.

Für Carbamazepin und Diclofenac wurde in jeder der drei Vergleichsmessungen nach dem Ausbau und für Metoprolol bei einer der Vergleichsmessung eine Elimination von über 80 % erreicht.

Vergleicht man die Eliminationen vor dem Ausbau mit den Eliminationen nach dem Ausbau werden für alle sieben Stoffe bessere Eliminationen erreicht. Außerdem ist zu erkennen, dass die Eliminationen der biologischen Stufe nach dem Ausbau deutlich niedriger als dieselben Eliminationen vor dem Ausbau sind. Das lässt darauf schließen, dass die Bedingungen für die Probenahmen vor und nach dem Ausbau unterschiedlich waren und in der biologischen Stufe der Kläranlage zum Zeitpunkt der Probenahmen nach dem Ausbau weniger effektiv Spurenstoffe abgebaut wurden. Das erklärt auch, wieso für manche der Spurenstoffe (vor allem aus den Stoffgruppen der Röntgenkontrastmittel und der Komplexbildner) bei den Vergleichsmessungen vor dem Ausbau bessere Eliminationen erreicht werden. Diese Schwankungen in der biologischen Stufe können zukünftig jedoch durch die bedarfsgerechte Dosierung des Ozons in der weitergehenden Reinigungsstufe ausgeglichen werden. Die bei den Vergleichsmessungen nach dem Ausbau eingesetzten Ozondosen waren vergleichsweise gering und durch höhere Ozondosen können, wie in Kapitel 3.5 erläutert, bessere Spurenstoffeliminationen erreicht werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass unter normalen Bedingungen und mit bedarfsgerechten Ozondosen davon ausgegangen werden kann, dass durch die Nachrüstung der Kläranlage zuverlässig Eliminationen der BW Substanzen von über 80 % erreicht werden.

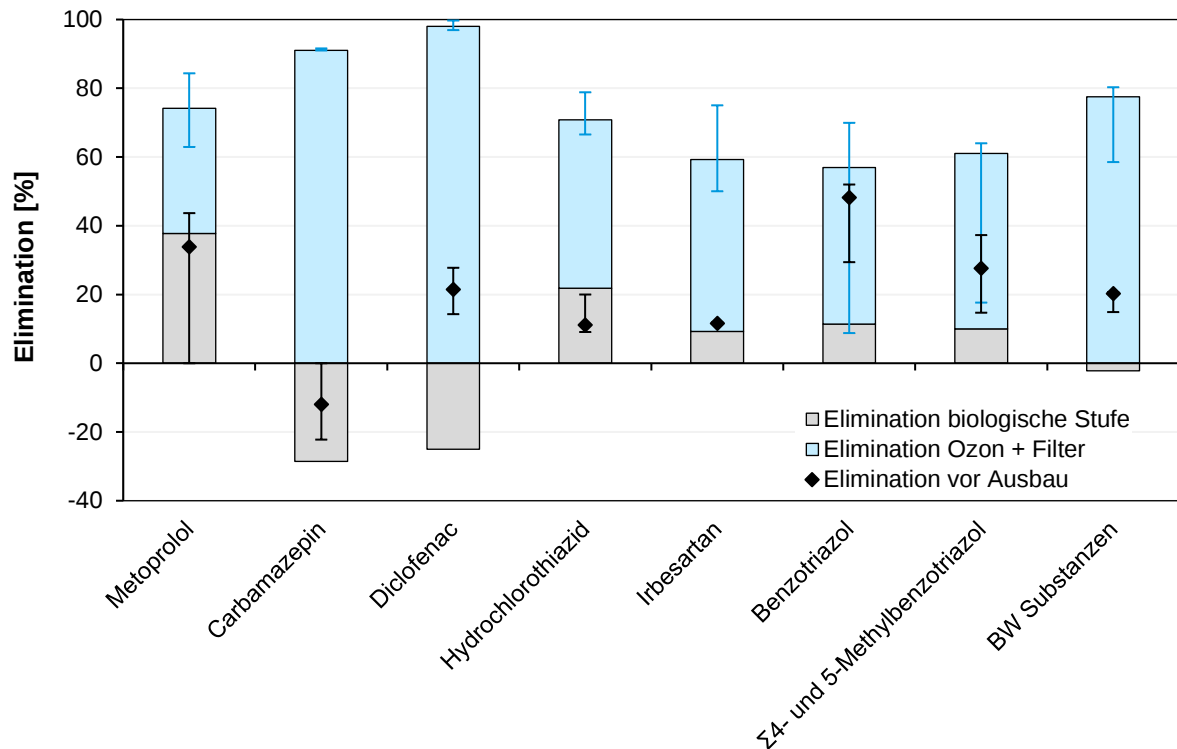


Abbildung 3-20: Eliminationen der sieben BW Substanzen und deren Mittelwert unterteilt in den Anteil der Elimination der biologischen Stufe und den Anteil der Ozonung mit anschließendem Sandfilter nach dem Ausbau der Kläranlage. Im Vergleich dazu die erreichten Eliminationen vor dem Ausbau.

Entsprechend der durchgeführten Vergleichsmessungen lassen sich die 47 untersuchten Spurenstoffe danach kategorisieren, ob und wie sich ihre Elimination durch die Nachrüstung der Kläranlage verändert. In Tabelle 3.5 sind alle untersuchten Spurenstoffe aufgeführt und dabei farblich hervorgehoben welcher Kategorie sie zugehörig sind. Für die grün hervorgehobenen Substanzen konnte durch die Vergleichsmessungen eine deutliche Verbesserung der Elimination durch die Nachrüstung gezeigt werden. Die gelb hervorgehobenen Spurenstoffe werden bereits durch die mechanisch-biologische Kläranlage zu über 80 % eliminiert und für die rot hervorgehobenen Stoffe war in den Vergleichsmessungen auch nach der Inbetriebnahme der Ozonung mit Sandfiltration keine Elimination größer 25 % möglich. Alle weiteren Substanzen lagen entweder bei den Vergleichsmessungen bereits in der Zulaufprobe nicht vor oder erzielten nicht auswertbare Eliminationen.

Insbesondere die Humanarzneimittel werden durch die Nachrüstung sehr effektiv entfernt. Ibuprofen, Metformin, Gabapentin und Ciprofloxacin werden bereits durch die mechanisch-biologische Behandlung der Kläranlage zu über 80 % eliminiert. Mit Ausnahme von Dehydrato-Erythromycin A und Bezafibrat, die nicht auswertbar waren, werden alle weiteren untersuchten Humanarzneimittel durch die zusätzliche Ozonung und Sandfiltration deutlich besser entfernt.

Auch bei den untersuchten Korrosionsschutzmitteln, synthetischen Duftstoffen und Flammenschutzmitteln ist ebenfalls eine Verbesserung der Entfernung durch die Nachrüstung der Kläranlage zu erkennen.

Insgesamt werden 20 der untersuchten Spurenstoffe durch die Nachrüstung besser entfernt als vorher. Weitere 10 Stoffe werden schon vor der Ozonung zu über 80 % entfernt. Nur eine der untersuchten Substanzen (PFBS) zeigt eine Gesamtelimination unter 25 % trotz der Nachrüstung der Kläranlage. Alle weiteren untersuchten Spurenstoffe sind nicht auswertbar.

Tabelle 3.5: Kategorisierung der untersuchten Spurenstoffe innerhalb der Stoffgruppen nach ihrer Elimination in den Vergleichsmessungen.

- Deutlich höhere Elimination durch Ozon + Filter ■ mechanisch-biologische Elimination > 80 %
■ Gesamtelimination mit Ozon + Filter < 25 % ■ Nicht auswertbar

Stoffgruppe	Elimination der Einzelsubstanzen
Arzneimittelwirkstoffe und Metabolite	Ibuprofen, Metoprolol, Carbamazepin, Diclofenac, Sulfamethoxazol, Metabolit DHH, Metformin, Gabapentin, Guanylharnstoff, Erythromycin A, Dehydrato-Erythromycin A, Clarithromycin, Ciprofloxacin, Azithromycin, Hydrochlorothiazid, Candesartan, Irbesartan, Bezafibrat,
Röntgenkontrastmittel	Amidotrizoesäure, Iohexol, Iomeprol, Iopromid, Iopamidol
Estrogene	17-alpha-Ethinylestradiol, 17-beta-Estradiol, Estron
Pestizide	Carbendazim, Mecoprop, DEET, Terbutryn
Korrosionsschutzmittel	Benzotriazol, Σ 4- und 5-Methylbenzotriazol
Synthetische Komplexbildner	EDTA, NTA, DTPA
Perfluorierte Tenside	PFBA, PFOA, PFBS, PFOS
Synthetische Duftstoffe	AHTN, HHCB
Flammschutzmittel	TCEP, TCPP
Synthetische Süßstoffe	Acesulfam, Cyclamat, Sucralose
Weitere Chemikalien	Melamin

Mit den Ergebnissen der Vergleichsmessungen der Spurenstoffliste A lässt sich somit feststellen, dass für die überwiegende Menge der auswertbaren Spurenstoffe eine deutliche Verbesserung der Elimination durch den Ausbau der Kläranlage erreicht werden und damit auch deutlich niedrigere Konzentrationen im Ablaufwasser vorliegen und in den Neckar geleitet werden. Die Ergebnisse legen außerdem nahe, dass die Ozonung mit anschließender Sandfiltration ein breites Spektrum an Spurenstoffen aus unterschiedlichen Stoffgruppen effektiv entfernen kann.

4 Fazit

Bei der minimalen untersuchten Ozondosis von 0,49 mg O₃/ mg DOC konnte die vom UMBW geforderte Elimination der 7 BW Substanzen von mindestens 80 % eingehalten werden. Eine Erhöhung der Ozondosis auf 0,59 mg O₃/ mg DOC bis 0,65 mg O₃/ mg DOC führte zu einer Erhöhung der Gesamtelimination um ca. 10 Prozentpunkte. Es muss untersucht werden, ob eine Reduktion der Ozondosis auf < 0,49 mg O₃/ mg DOC ausreichend für die geforderte Spurenstoffelimination wäre.

Die Regelung nach SAK₂₅₄-Absorbanz erfordert eine intensive Anlagenbetreuung, insbesondere bezüglich der Reinigung und Wartung der notwendigen Messsonden. Zudem ist eine Optimierung der Regelung in Zusammenarbeit mit den an Planung und Bau beteiligten Akteuren ratsam, da die Anlage im aktuellen Betriebszustand einen relativ engen Regelbereich aufweist und häufig an die Grenzen der im Rahmen der Regelung minimal bzw. maximal möglichen Ozonproduktion stößt.

Im Ergebnis kann festgehalten werden, dass durch den Betrieb der Anlage eine deutliche Verbesserung der Ablaufwerte zu erkennen ist. In Bezug auf die Anforderungen laut Wasserrechtlicher Genehmigung vom September 2018 lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Die 4. Reinigungsstufe kann mit einem Abfluss von bis zu 700 l/s (bzw. 2520 m³/h) betrieben werden.
- Der Grenzwert für P_{ges} (=0,3 mg/l) in der 24h-MP im Ablauf des Filters wurde bis auf den Zeitraum von drei Tagen mit stark erhöhter Zulaufkraft Ende Oktober eingehalten
- Der Grenzwert für P_{ges} (=1,0 mg/l) in der 24h-MP im Ablauf der Kläranlage wurde eingehalten.
- Der Zielwert für P_{ges} (=0,25 mg/l) in der 24h-MP (Jahresmittelwert) im Ablauf der Kläranlage kann Stand Oktober 2022 eingehalten werden.
- Der Zielwert von 80% für die mittlere Spurenstoffelimination der 7 BW Substanzen wurde während der letzten 6 Probennahmen erreicht.

Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Ergebnissen der Vergleichsmessungen der Stoffliste A. Diese 47 Spurenstoffen wurde je dreimal vor dem Ausbau und dreimal nach dem Ausbau analysiert. In den Ergebnissen zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Spurenstoffelimination durch die Nachrüstung der Kläranlage durch Ozonung mit anschließendem Sandfilter. Für die sieben BW Substanzen konnte im Mittel eine Entfernung von 78 % erzielt werden und damit deutlich mehr, als vor dem Ausbau (20 % im Mittelwert für die BW Substanzen). Insgesamt 20 der untersuchten Spurenstoffe zeigen eine bessere Elimination durch den Ausbau, weitere 8 Stoffe werden in der Kläranlage schon mechanisch-biologisch zu über 80 % eliminiert und nur eine der auswertbaren Substanzen (PFBS) zeigte in den Vergleichsmessungen eine Elimination von unter 25 %. Die Ozonung mit anschließender Sandfiltration auf der Kläranlage Tübingen ist somit ein geeignetes Verfahren, um Spurenstoffe aus unterschiedlichen Stoffgruppen effektiv zu entfernen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden ergänzend Abwasserproben mittels Non-Target-Screening analysiert, um Transformationsprodukte zu identifizieren. Unter den bekannten Stoffen waren überwiegend Arzneimittel und Arzneimittelmetaboliten zu finden. Der detaillierte Untersuchungsbericht ist diesem Bericht angehängt (Anhang1).

Die Erweiterung der Kläranlage mit einer Ozonung und Sandfiltration zeigte aus mikrobiologischer Sicht gute Reduktionsleistungen hinsichtlich fakultativ pathogener Bakterien und klinisch relevanter Antibiotikaresistenzgenen. 99,9% bis 99,99% der 19 untersuchten mikrobiologischen Parameter (fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene) konnten durch die Kläranlage zuverlässig entfernt werden. Unabhängig von den verwendeten Ozonkonzentrationen zeigte die oxidative Behandlung des Abwassers eine Reduktionsleistung von über 90%. Die detaillierten Untersuchungsergebnisse sind diesem Bericht angehängt (Anhang 2).

Literaturverzeichnis

Bogenrieder, D., Tribskorn, V., Kohlgrüber, V. (2025): Micropollutant Removal using Ozonation at the Tübingen Wastewater Treatment Plant. 7th International Conference on Advanced Oxidation Processes. 8.-10. April 2025, Frankfurt am Main.

LUBW Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (LUBW) (2021): Wirkung und Kosten von ausgewählten Maßnahmen zur Reduzierung von Phosphoreinträgen aus Kläranlagen. Ergebnisse der landesweiten Studie SLoPE zum Handlungskonzept Abwasser. <https://pd.lubw.de/10249>, zuletzt geprüft am 30.11.2022.

Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UMBW) (2018): Arbeitspapier Spurenstoffelimination auf kommunalen Kläranlagen in Baden-Württemberg. Online verfügbar unter <https://koms-bw.de/cms/content/media/2018-11-20%20Arbeitspapier%20Spurenstoffe.pdf>, zuletzt geprüft am 09.02.2022.

Peschke, K., Haasis, T., Tribskorn, R. (2024): Wissenschaftliche Begleituntersuchungen zum Ausbau der Kläranlage Tübingen mit einer 4. Reinigungsstufe auf Basis einer Ozonierung in Kombination mit einem Sandfilter. im Auftrag des Regierungspräsidiums Tübingen und der Stadt Tübingen.

Anhang

1. Bericht zu den Ergebnissen des Non-Target-Screenings
2. Bericht zu den Messungen der fakultativ-pathogenen Bakterien (FPB) und relevanten Antibiotikaresistenzgenen (ARG)
3. Spurenstoffmessdaten Liste B
4. Spurenstoffmessdaten Liste A
5. Abstract und Poster zur Vorstellung der Projektergebnisse bei der 7th International Conference on Advanced Oxidation Processes

Langenau, 20. Februar 2023



Auftraggeber

**Kompetenzzentrum Spurenstoffe Baden-Württemberg
c/o Universität Stuttgart
ISWA
Bandtäle 2
70569 Stuttgart**

**Untersuchungsbericht Non-Target-Screening
von Abwasserproben**

LW-Auftrags-Nr.	139470 (9. - 11. Mai 2022)
	141551 (26. - 27. Juli 2022)
	143943 (17. - 18. Oktober 2022)

Julia Schneidewind
Pia Leurle
Dr. Tobias Bader

Zweckverband Landeswasserversorgung
Betriebs- und Forschungslabor
Am Spitzigen Berg 1
89129 Langenau

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Aufgabenstellung	3
3	Zusammenfassung	4
4	Durchführung	5
4.1	Übersicht Proben.....	5
4.2	LC-HRMS-Methode	5
4.2.1	LC-Methodik	6
4.2.2	MS-Methodik	6
4.3	Datenauswertung	7
4.4	Priorisierung	8
4.5	Qualitätssicherung.....	9
5	Ergebnisse und Diskussion	10
5.1	Multi-Target-Screening.....	10
5.2	Prozessvergleiche	12

2 Aufgabenstellung

Die Kläranlage Tübingen wurde mit einer vierten Reinigungsstufe bestehend aus Ozonung und Sandfiltration ausgestattet. Zur Beurteilung der Effizienz wurden einige Parameter mittels Target-Analytik bestimmt (z.B. KomS-Stofflisten). Da speziell bei der Ozonung die Bildung von Transformationsprodukten bekannt ist, sollte mittels Non-Target-Screening ein gesamtheitliches Bild der Reinigungsprozesse erzeugt werden.

Ein Schema der Reinigungsstufen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die erste Probe wurde im Ablauf des Nachklärbeckens (NKB) gezogen, welches die letzte Stufe der klassischen Abwasserbehandlung darstellt. Die zweite Probe wurde im Ablauf der Ozonungsanlage (O3) entnommen, die dritte Probe im Ablauf des Sandfilters (SF). Insgesamt wurden drei Beprobungskampagnen durchgeführt (Mai, Juli und Oktober 2022).



Abbildung 1. Schema Reinigungsstufen Kläranlage Tübingen

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Prozessbewertung für a) die Ozonung (1-2), b) die Sandfiltration (2-3) sowie c) den Gesamtprozess (1-3) durchgeführt. Darüber hinaus wurde auch insgesamt nach bekannten Stoffen gescreent, da die Target-Listen naturgemäß nur eine kleine Auswahl von Spurenstoffen abdecken.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden behandelte Abwasserproben der Kläranlage Tübingen mittels Non-Target-Screening analysiert. Im ersten Schritt wurde ein Multi-Target-Screening durchgeführt, mit dem bekannte Stoffe detektiert werden können. Das Verhalten dieser Stoffe wurde über die Reinigungsstufen verfolgt.

Unter den bekannten Stoffen waren überwiegend Arzneimittel und Arzneimittelmetaboliten zu finden. Außerdem konnten Stoffe gefunden werden, welche mit Reifenabrieb in Zusammenhang gebracht werden konnten und damit Indikatoren für Straßenablauf sein können. Interessant waren verhältnismäßig hohe Signale für die Industriechemikalie Tributylphosphat, welche nur bei der Kampagne im Juli gefunden werden konnten und daher auf eine diskontinuierliche Einleitung hindeuten. Insgesamt zeigten nur wenige Stoffe eine sehr gute Eliminationsrate (z.B. Phenazon > 80 % Elimination bei allen Kampagnen) über den Gesamtprozess (Abl. NKB – Abl. SF). Der Großteil der Stoffe wies eine mittlere Eliminationsrate zwischen 30 % und 80 % auf.

Im zweiten Schritt beim Non-Target-Ansatz zeigte sich, dass die Anzahl der Features erwartungsgemäß über die Reinigungsstufen reduziert wurde. Dieses Verhalten konnte allerdings für die Summen der Peakhöhen – als Maß für die Stoffkonzentrationen - nicht immer bestätigt werden. Im negativen Messmodus war bei zwei Kampagnen ein Anstieg der Peakhöhen-summe nach dem Sandfilter zu erkennen. Dies könnte ein Hinweis auf mikrobiologische Transformation sein, da hierbei häufig Metaboliten gebildet werden, welche im negativen Messmodus erfassbar sind (Carbon- und Sulfonsäuren). Aufgrund der generell sehr geringen Anzahl an gemessenen Komponenten – analytisch: Features - ist diese Aussage statistisch aber wenig belastbar.

Zur Beurteilung der Transformationsbildung wurden die Peakhöhen aller Signale ins Verhältnis gesetzt. Generell war die Anzahl der Signale in der Kategorie Neubildung - und damit die Hinweise auf Transformation - sehr gering ausgeprägt. Die meisten Neubildungen konnten bei Kampagne 2 (Juli) gefunden werden. Bei den Kampagnen 1 und 3 wurden nur vereinzelt und mit geringen Peakhöhen Neubildungen detektiert. Allerdings ist anzumerken, dass Ozonungstransformationsprodukte häufig eine deutlich erhöhte Polarität und kleinere Massen aufweisen. Die hier genutzte Methode deckt nur einen bestimmten Polaritäts- und Massenbereich ab. Es kann daher nicht generell geschlussfolgert werden, dass kaum Transformationsprodukte gebildet werden.

Für die größten Signale, welche auch im Ablauf des Sandfilters noch vorkamen, wurden Summenformeln generiert, welche für die weitere Recherche genutzt werden können. Dabei ergaben sich erneut in einigen Fällen Hinweise auf phosphororganische Verbindungen.

4 Durchführung

4.1 Übersicht Proben

Durch den Auftraggeber wurden im Jahr 2022 mehrmals Proben nach dem Nachklärbacken (NKB), der Ozonung (O3) sowie des Sandfilters (SF) der Kläranlage Tübingen gezogen. Bei den Proben handelte es sich um 48-h-Mischproben, welche durch den Auftraggeber membranfiltriert wurden. Die Proben wurden an das Labor der Landeswasserversorgung verschickt und dort bis zur gesammelten Analyse eingefroren. Vor der Analyse wurden die Proben 1:10 mit Laborreinstwasser verdünnt. Die insgesamt neun analysierten Proben sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Probenübersicht mit Labornummern

Kampagne	Ablauf NKB	Ablauf O3	Ablauf SF
9. - 11.05.2022	139470-02	137470-03	139470-04
26. - 27.07.2022	141551-02	141551-03	141551-04
17. - 18.10.2022	143943-02	143943-03	143943-04

Die Analysen wurden im positiven Messmodus vom 25.11. bis 26.11.2022, im negativen Messmodus vom 26.11. bis zum 27.11.2022 durchgeführt. Inklusive Blindwerten wurden für die neun Proben insgesamt 72 Injektionen durchgeführt, was einer Gesamtmesszeit von ca. 44 Stunden entsprach.

4.2 LC-HRMS-Methode

Im Gegensatz zur Target-Analytik nutzt die Non-Target-Analytik mit Flüssigkeitschromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HRMS) die Signale aller detektierbarer Spezies in einem Datensatz und liefert somit ein deutlich umfangreicheres Bild der analysierten Proben. Nach der Akquisition werden aus dem dreidimensionalen Datensatz - bestehend aus Masse (m/z -Wert), Retentionszeit (RT) und Intensität (Int) - chromatographische Peaks, sog. Features, selektiert. Jedem Feature wird eine Masse (m/z), Retentionszeit sowie Intensität zugeordnet (Abbildung 2).

Die Intensität einer Verbindung verhält sich proportional zur Konzentration, jedoch kann die exakte Konzentration nur nach vorheriger Kalibration ermittelt werden. Dieser Schritt setzt jedoch die Identifikation der Verbindung und das Vorhandensein eines Referenzstandards voraus.

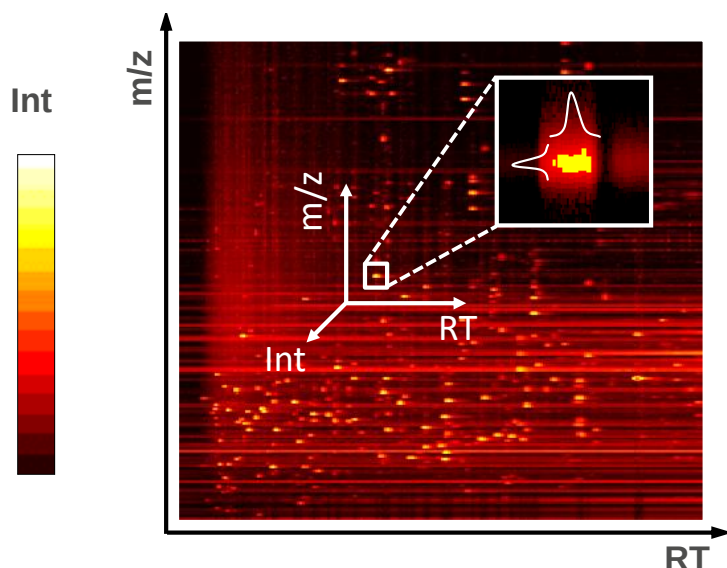


Abbildung 2. Übersicht: dreidimensionale Struktur der LC-HRMS-Daten.

Typischerweise werden mehrere tausend Signale in einem Datensatz erkannt, welche im Anschluss weiterverarbeitet werden. Es ist zu beachten, dass eine Komponente mehrere Features erzeugen kann. Bei der massenspektrometrischen Detektion lassen sich Isotopologe, Addukte oder in-source-Fragmente einer Komponente beobachten. Diese lassen sich nicht immer einfach zusammenfassen, weshalb die Anzahl an Features tendenziell höher als die tatsächliche Anzahl an Komponenten sein wird.

4.2.1 LC-Methodik

Für die Non-Target-Analytik wurde ein Flüssigkeitschromatographie-System (Nexera Prominence, Shimadzu, Nakagyoku, Kyoto, Japan) gekoppelt an ein QTOF/MS (x500R System, Sciex, Framingham, MA, USA) mit Elektrospray-Ionisation verwendet. Als Trennsäule fand eine C18-Umkehrphasen-Säule mit entsprechender Vorsäule Anwendung, welche auf 40 °C temperiert wurde. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min. Als Eluenten wurden Wasser und Acetonitril jeweils unter Zusatz von 0,1 % (v/v) Ameisensäure verwendet. Die Messung der Proben erfolgte unverdünnt, wobei 95 µL der jeweiligen Probe und 5 µL isotonenmarkierte Standards co-injiziert wurden. Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Durchführung statistischer Tests wurde jede Probe als Triplikat gemessen.

4.2.2 MS-Methodik

Die Detektion mit dem Massenspektrometer erfordert die Bildung von Ionen der organischen Spurenstoffe in der Ionenquelle. Eine vielseitig einsetzbare Ionisierungstechnik ist die Elektrospray-Ionisation (ESI), welche auch in dieser Untersuchung verwendet wurde. Je nach Moleküleigenschaft ist hierbei die Polarität für die Ionisation der Spurenstoffe von Bedeutung. Moleküle können Wasserstoffionen bei der Ionisation anlagern und damit positiv geladene

Molekülionen bilden (ESI+). Im Gegensatz dazu kann auch ein Wasserstoffion abgegeben werden, wobei ein negatives geladenes Molekülion gebildet wird (ESI-). Um ein Molekül mittels ESI zu ionisieren, sind Heteroatome (z. B. O, N, S, P) notwendig - beispielsweise lassen sich reine Kohlenwasserstoffe (wie PAK) nicht mittels ESI ionisieren und sind daher nicht messbar. Saure Komponenten, wie beispielsweise Carbon- oder Sulfonsäuren, geben leicht Protonen ab und lassen sich daher im negativen Messmodus (ESI-) erfassen. Basische Verbindungen, wie beispielsweise Amine, lagern hingegen Protonen an und lassen sich im positiven Messmodus erfassen.

Alle ionisierbaren Moleküle werden anschließend über elektrische Felder in das Massenspektrometer überführt und dort detektiert. Zu jedem Zeitpunkt des chromatographischen Laufs wird ein Massenspektrum im Bereich von 100 bis 1200 m/z (Scanrate ca. 1 Spektrum pro Sekunde) aufgezeichnet. Die Massen der Ionen werden mit einem Massefehler kleiner 10 ppm detektiert. Bei der sog. *data dependent acquisition* (DDA) werden in jedem Zyklus die 12 Massen größter Abundanz automatisiert selektiert, fragmentiert und das jeweilige Produktionsspektrum aufgezeichnet. Durch diese spezielle Technik wird gewährleistet, dass auch MS2 (oder MS/MS)-Spektren und damit Strukturinformationen von den meisten (auch unbekannten) Komponenten akquiriert werden. Zusätzlich wurde die sog. *Data independent acquisition* (DIA, Swath) verwendet, um für jede Komponente sicher Fragmentinformationen zu erhalten. Diese Informationen können im letzten Schritt zur Identifikation der Verbindung herangezogen werden und erlauben bei bereits bekannten Verbindungen eine zweifelsfreie Zuordnung mit einer ausreichenden Anzahl an Identifikationspunkten.

4.3 Datenauswertung

Jede Probe wurde dreifach mittels HPLC-HRMS analysiert (technische Replikate). Um falsch positive Befunde bei der Auswertung zu minimieren, wurde nach dem *Peak Finding* und *Peak Alignment* (MarkerView™, Sciex) jedes Feature durch zwei Integrationsalgorithmen (SciexOS™, Sciex) integriert. Neben der Response können hierdurch zahlreiche Kenngrößen wie beispielsweise Peakhöhe, Peakfläche und Peakbreite zur Korrektur partieller falsch-negativer Befunde herangezogen werden. Um potentielle falsch-positiv-Befunde zu filtern, wurden bei der Filterung weitere wichtige Kriterien festgelegt. Zum einen wurden Features, welche sich vom Blindwert nicht signifikant unterscheiden eliminiert, zum anderen mussten definierte Schwellenwerte eingehalten werden. Die Analyse von Triplikaten ermöglicht außerdem die relative Schwankung der jeweiligen Größen zu berücksichtigen und Features, welche nicht erklärbare Schwankungen aufweisen, zu eliminieren. Diverse Filterfunktionen und weitere Vergleiche wurden mit der Software Matlab R2017a (MathWorks) durchgeführt. Alle anderen Filterkriterien wurden in Vorarbeiten sorgfältig optimiert und unverändert auf diesen Datensatz angewendet. Der gesamte Weg der Datenauswertung ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

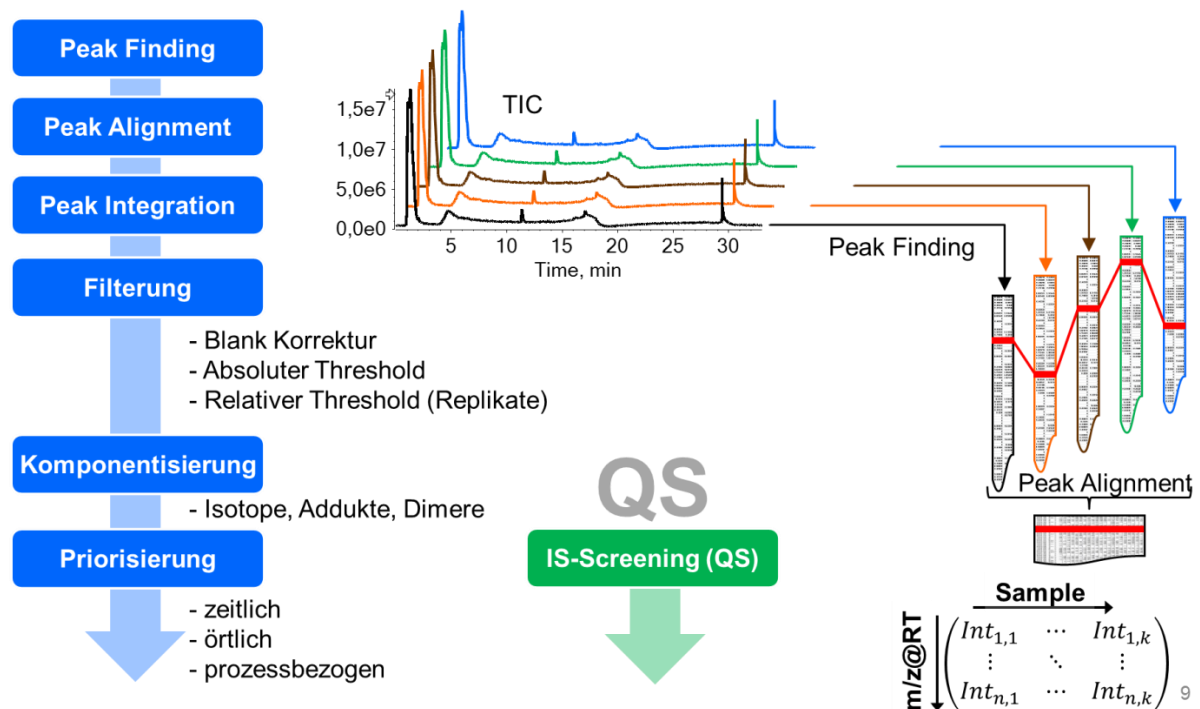


Abbildung 3. Übersicht Datenauswertung; TIC: Totalionenchromatogramm; IS: isotonenmarkierte interne Standards, QS: Qualitätssicherung.

4.4 Priorisierung

Um aus der Vielzahl der erfassten Komponenten relevante/interessante Verbindungen zu extrahieren, werden verschiedene Arten der Priorisierung herangezogen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die detektierten Features mit einer Liste von mehr als 1000 bekannten Spurenstoffen abgeglichen. Im ersten Schritt wurden Stoffe priorisiert, für welche die Masse (das m/z-Verhältnis) sowie die Retentionszeit mit den hinterlegten Stoffen übereinstimmen. Im zweiten Schritt wurden dann auch Fragmentspektren (MS/MS) zwischen Probe und Referenzstandard abgeglichen, um eine sichere Identifikation zu erreichen.

In einem zweiten Ansatz wurde - unabhängig von bekannten Stoffen - nach Unterschieden zwischen den Proben gesucht. Über sog. *fold change plots*, wurden die relative Intensitätsänderung zwischen Proben betrachtet. Um Änderungen zwischen zwei Proben (z. B. Ablauf NKB gegen Ablauf O3) gegenüberzustellen, werden die Signale über deren relative Signaländerung klassifiziert. In Abbildung 4 ist dies schematisch dargestellt. Die relative Signaländerung (auch *fold change*, *fc*) stellt das Peakhöhenverhältnis aus beiden Proben (z. B. Ablauf NKB vs. Ablauf O3) dar. Ein *fc* von 100 bedeutet, dass das Signal im Ablauf der Ozonung hundertmal intensiver als im Ablauf des Nachklärbeckens war. Beim *fc* von 0,01 trat der umgekehrte Fall ein. Da die Standardabweichung bereits bei der Featurevalidierung geprüft wurde, konnte an dieser Stelle auf den p-Wert verzichtet werden. Stattdessen wurde auf der Ordinate die absolute Signalhöhe als weiteres Priorisierungskriterium herangezogen.

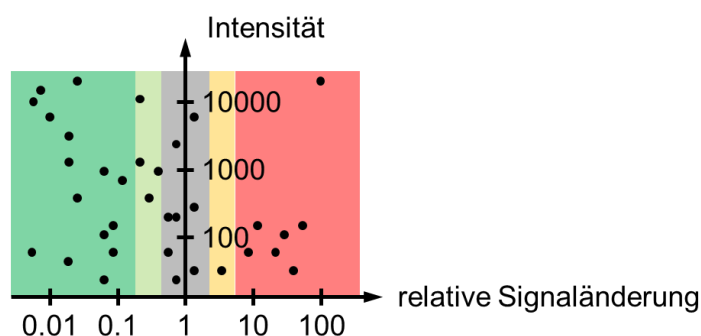


Abbildung 4. Schema zur Prozessbeschreibung mittels LC-HRMS.

Neben einer großen relativen Signaländerung (f_c) ist auch eine hohe absolute Intensität relevant, da hier die Erfolgswahrscheinlichkeit bei der Identifikation deutlich höher ist (wenig abundante Isotopologe werden ebenfalls erfasst, aussagekräftigere MS2-Spektren).

Zur Klassifizierung der Signale wurden fünf Kategorien, basierend auf den relativen Signaländerungen, definiert:

(1) Elimination	$0,0 \leq f_c < 0,2$	(dunkelgrün)
(2) Teilelimination	$0,2 \leq f_c < 0,5$	(hellgrün)
(3) Konstanz	$0,5 \leq f_c \leq 2,0$	(grau)
(4) Zunahme	$2,0 < f_c \leq 5,0$	(orange)
(5) Neubildung	$5,0 < f_c \leq \infty$	(rot)

Im Rahmen dieser Arbeit sollten v.a. mögliche Transformationsprodukte bei der Ozonung beleuchtet werden. Insgesamt sind bei den Prozessbetrachtungen daher v.a. Stoffe aus der Kategorie Neubildung und Zunahme interessant. Aber auch Stoffe der Kategorie Konstanz durchlaufen fast ungehindert den Prozess und gelangen damit in die Umwelt. Für eine kleine Featureauswahl (größte Peaks in Kategorien Konstanz, Zunahme und Neubildung) wurden daher noch Summenformeln postuliert.

4.5 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung während der LC-HRMS-Analysen wurden allen Proben isotopenmarkierte interne Standards hinzugefügt. Im positiven Messmodus wurden 9, im negativen Modus 6 interne Standards betrachtet. Hierdurch lassen sich die Stabilität der Retentionszeiten sowie der Signalintensitäten über die Messungen verfolgen und überwachen. Letztere sind vor allem bei Prozessbeschreibungen von großem Interesse, da es durch Matrixeffekte bei der Ionisierung zu Signalunterdrückung oder -verstärkung kommen könnte, was die relativen Änderungen zwischen zwei Proben verzerren könnte. Da die internen Standards allen Proben in gleicher Konzentration hinzugefügt wurden, wird im Rahmen der Prozessbeschreibung geprüft, ob diese in den Bereich der „Konstanz“ fallen und somit Matrixeffekte eine untergeordnete Rolle spielen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Multi-Target-Screening

Im ersten Schritt wurden alle detektierten Peaks mit einer internen Target-Liste abgeglichen, wobei Peaks annotiert wurden, wenn sowohl die Masse (Abweichung < 10 ppm) als auch die Retentionszeit (Abweichung < 0,5 min) mit dem Standard übereinstimmten. Im zweiten Schritt wurde dann die Übereinstimmung der MS/MS-Spektren mit der internen Datenbank geprüft. Dabei konnte der Großteil der Befunde eindeutig bestätigt werden (siehe MSMS-Match „bestätigt“ in Tabelle 2). Für wenige Stoffe wurde bei der automatischen Akquisition kein oder kein verwertbares MS/MS-Spektrum produziert, weshalb diese nur als Verdachtskandidaten angeführt werden. Wiederum konnten insgesamt sieben Stoffe widerlegt werden, da es keine Übereinstimmung bei den MS/MS-Spektren gab. In Tabelle 2 sind die Peakhöhen der Stoffe über alle Messungen dargestellt. Eine Quantifizierung war nicht Bestandteil des Auftrags.

Tabelle 2. Peakhöhenverlauf der im Multi-Target-Screening detektierten Stoffe

Name	Polarität	9. - 11.05.22			26. - 27.07.22			17. - 18.10.22			MS/MS-Match
		Abl. NKB	Abl. O3	Abl. SF	Abl. NKB	Abl. O3	Abl. SF	Abl. NKB	Abl. O3	Abl. SF	
2,4-Dimethylchinolin	ESI+	1973	1389	1339	3349	2111	2052	2222	1486	1316	bestätigt
Gabapentin	ESI+	3582	2623	2200	2002	1594	1007	2474	1397	1267	bestätigt
Phenazon	ESI+	2903	257	277	1653	235	310	1110	NaN	NaN	bestätigt
1,3-Diphenylguanidine	ESI+	344	1562	918	2815	1289	688	2635	626	512	bestätigt
4-Formylaminoantipyrine	ESI+	8648	262	318	6652	450	437	5772	NaN	NaN	Verdacht
Phenobarbital	ESI+	NaN	NaN	NaN	NaN	2911	2749	NaN	NaN	NaN	widerlegt
Lidocaine	ESI+	2377	27	NaN	5514	779	395	2593	NaN	NaN	widerlegt
4-Acetylamidoantipyrine	ESI+	3422	NaN	NaN	2893	226	210	1921	NaN	NaN	bestätigt
Sulfapyridine	ESI+	1183	NaN	NaN	1623	NaN	NaN	3451	NaN	NaN	widerlegt
rac N,O-Didesmethyl Venlafaxine	ESI+	2297	NaN	NaN	2657	NaN	NaN	1897	NaN	NaN	Verdacht
Rivastigmin	ESI+	191	1489	1353	NaN	3093	2865	NaN	1258	1237	widerlegt
Bisoprolol_M3	ESI+	3489	1907	1883	4004	2304	2273	3354	1345	1312	bestätigt
Lamotrigin	ESI+	12549	8695	9169	14824	10282	9886	11381	5210	5957	widerlegt
Tramadol	ESI+	2417	543	718	2670	758	870	2269	228	276	bestätigt
O-Desmethylvenlafaxine	ESI+	13854	285	286	15102	678	566	11619	229	176	bestätigt
Tributylphosphat	ESI+	NaN	NaN	NaN	12195	8111	8393	NaN	NaN	NaN	bestätigt
Metoprololsäure	ESI+	4833	1967	1993	3305	1805	1379	10208	1948	2114	bestätigt
Metoprolol	ESI+	8285	2984	3087	7869	3000	2958	6289	1106	1206	bestätigt
2-Phenyl-5-benzimidazolesulfonic ac	ESI+	996	495	422	2541	1404	836	658	216	286	bestätigt
Venlafaxine	ESI+	6300	1569	1643	6481	1897	1835	5115	563	791	bestätigt
Ciprofloxacin	ESI+	17404	18042	13470	12657	13217	7387	24160	19818	16322	widerlegt
Amisulpride	ESI+	7000	948	795	6224	1006	956	4893	NaN	NaN	bestätigt
Quetiapine carboxylic acid	ESI+	4597	NaN	NaN	4197	NaN	NaN	4674	NaN	NaN	bestätigt
Sitagliptin	ESI+	3222	1788	1925	3154	1765	1652	2846	1162	1032	bestätigt
Irbesartan	ESI+	431	NaN	NaN	1082	593	NaN	2724	742	NaN	bestätigt
Candesartan	ESI+	3229	1289	1349	3829	1490	1380	3027	689	808	bestätigt
Fexofenadine	ESI+	7003	1974	1881	4553	1477	1409	2773	403	502	bestätigt
Saccharin	ESI-	78050	81590	110734	89636	19154	64376	21401	22901	20197	bestätigt
Benzothiazolsulfonsäure	ESI-	9340	8735	12197	10509	4163	7080	4462	3663	3863	bestätigt
Sucralose	ESI-	3567	2945	2900	3278	3489	3569	3326	2464	2443	widerlegt
Irbesartan_446	ESI-	3852	1723	1732	3737	1547	1723	1476	454	400	bestätigt
lomeprol	ESI-	5490	4299	3933	3110	2372	2037	4099	2406	2015	bestätigt

NaN: Kein Peak detektierbar

Der Großteil der gefundenen Stoffe beschränkt sich auf Arzneimittel und Arzneimittelmetaboliten. Zwei der gefundenen Targets - [1,3-Diphenylguanidin](#) und [Benzothiazolsulfonsäure](#) - lassen sich mit Reifenabrieb in Verbindung bringen. Weiterhin konnte die Industriechemikalie

Tributylphosphat in einer der Kampagnen erfasst werden. Der Stoff gehört zu den nichthalo-genierten Organophosphaten und wird vielseitig eingesetzt (z.B. in Textil-/Papierindustrie).

Im Folgenden wurden über die Peakhöhen der Stoffe (Annahme: linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakhöhe) die Eliminationsraten berechnet (Tabelle 3). Im Fall von nicht detektieren Peaks wurde mit einer Peakhöhe von 200 cps gerechnet, welche als Art Bestimmungsgrenze gesehen werden kann. Für die widerlegten Stoffe wurden keine Raten berechnet. Es ist anzumerken, dass die Unsicherheit der hier dokumentierten Eliminationsra-ten im Vergleich zur Target-Analytik höher einzuordnen sind.

Tabelle 3. Eliminationsraten der im Multi-Target-Screening detektierten Stoffe

Name	Polarität	9. - 11.05.22		26. - 27.07.22		17. - 18.10.22		MS/MS-Match
		NKB-O3	NKB-SF	NKB-O3	NKB-SF	NKB-O3	NKB-SF	
2,4-Dimethylchinolin	ESI+	30%	32%	37%	39%	33%	41%	bestätigt
Gabapentin	ESI+	27%	39%	20%	50%	44%	49%	bestätigt
Phenazon	ESI+	91%	90%	86%	81%	82%	82%	bestätigt
1,3-Diphenylguanidine	ESI+	-354%	-167%	54%	76%	76%	81%	bestätigt
4-Formylaminoantipyrine	ESI+	97%	96%	93%	93%	97%	97%	Verdacht
Phenobarbital	ESI+							widerlegt
Lidocaine	ESI+							widerlegt
4-Acetylamidoantipyrine	ESI+	94%	94%	92%	93%	90%	90%	bestätigt
Sulfapyridine	ESI+							widerlegt
rac N,O-Didesmethyl Venlafaxine	ESI+	91%	91%	92%	92%	89%	89%	Verdacht
Rivastigmin	ESI+							widerlegt
Bisoprolol_M3	ESI+	45%	46%	42%	43%	60%	61%	bestätigt
Lamotrigin	ESI+	31%	27%	31%	33%	45%	48%	widerlegt
Tramadol	ESI+	78%	70%	72%	67%	90%	88%	bestätigt
O-Desmethylvenlafaxine	ESI+	98%	98%	96%	96%	98%	98%	bestätigt
Tributylphosphat	ESI+	n.b.	n.b.	33%	31%	n.b.	n.b.	bestätigt
Metoprololsäure	ESI+	59%	59%	45%	58%	81%	79%	bestätigt
Metoprolol	ESI+	64%	63%	62%	62%	82%	81%	bestätigt
2-Phenyl-5-benzimidazolesulfonic acid	ESI+	50%	58%	45%	67%	67%	57%	bestätigt
Venlafaxine	ESI+	75%	74%	71%	72%	89%	85%	bestätigt
Ciprofloxacin	ESI+							widerlegt
Amisulpride	ESI+	86%	89%	84%	85%	96%	96%	bestätigt
Quetiapine carboxylic acid	ESI+	96%	96%	95%	95%	96%	96%	bestätigt
Sitagliptin	ESI+	45%	40%	44%	48%	59%	64%	bestätigt
Irbesartan	ESI+	54%	54%	45%	82%	73%	93%	bestätigt
Candesartan	ESI+	60%	58%	61%	64%	77%	73%	bestätigt
Fexofenadine	ESI+	72%	73%	68%	69%	85%	82%	bestätigt
Saccharin	ESI-	-5%	-42%	79%	28%	-7%	6%	bestätigt
Benzothiazolsulfonsäure	ESI-	6%	-31%	60%	33%	18%	13%	bestätigt
Sucralose	ESI-							widerlegt
Irbesartan_446	ESI-	55%	55%	59%	54%	69%	73%	bestätigt
Iomeprol	ESI-	22%	28%	24%	35%	41%	51%	bestätigt

Im Fall von Tributylphosphat wurden im NKB bei Kampagne 1 und 3 keine Peaks gefunden, weshalb keine Eliminationsraten berechenbar sind (n.b.), Grün: > 80 % Elimination, gelb: 30 % bis 80 % Elimination, rot < 30 % Elimination

5.2 Prozessvergleiche

Bei der herkömmlichen Effizienzbewertung von Reinigungsprozessen wird typischerweise eine kleine Anzahl bekannter Stoffe im Zu- und Ablauf des Prozesses quantifiziert, um anschließend die Eliminationsraten zu betrachten. Häufig sind nur wenige Transformationsprodukte von den Ausgangsstoffen bekannt bzw. Referenzstandards nicht erhältlich. Vor allem diese Gruppe ist daher beim klassischen Ansatz unterrepräsentiert.

Mit dem Non-Target-Screening-Ansatz können alle detektierbaren Stoffe über den Reinigungsprozess betrachtet werden. Somit fließen auch die Informationen unbekannter oder nicht berücksichtigter Stoffe in die Bewertung mit ein. Zur ersten Einordnung der Befunde wurden in Abbildung 5 zwei Kennzahlen dargestellt. Zum einen ist der Verlauf der Peakhöhensumme aller detektierter Features dargestellt, zum anderen die Featuresanzahlen für die verschiedenen Proben für den a. positiven und b. negativen Messmodus. Summarisch ist damit sowohl der Einfluss der Prozessstufen zu erkennen als auch die Unterschiede zwischen den Beprobungskampagnen.

Bei der Anzahl der Peaks ist zu erkennen, dass diese bei allen 3 Kampagnen über die Prozesskette (NKB – O3 – SF) abfällt. Bei den Peakhöhensummen (Intensitätssumme aller detektierten Stoffe) war dies im ESI- nicht immer der Fall. Bei Kampagne 1 und 2 (Mai und Juli) waren die Peakhöhensummen im Ablauf des Sandfilters höher als nach der Ozonung. Insgesamt ist sowohl die Anzahl der Features als auch die Peakhöhensumme als gering für Abwasser einzustufen (1:10-Verdünnung). Allerdings gehen Unterschiede zwischen den Proben bei diesen summarischen Parametern häufig unter. Im Folgenden werden die Prozesse daher im Detail betrachtet.

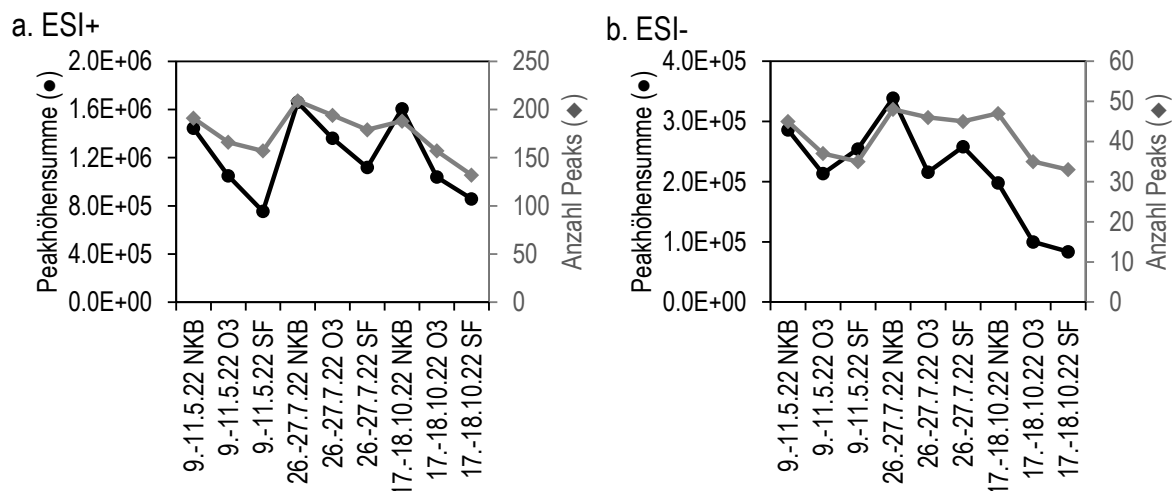


Abbildung 5. Verlauf der Peakhöhensumme (Primärachse) und der Anzahl der Peaks (Sekundärachse) über die verschiedenen Proben.

Um die Bildung von Transformationsprodukten bei den Prozessen bzw. bei unterschiedlicher Prozessführung zu erfassen, wurden die Prozessvergleiche aus den NTS-Daten erstellt. Im Folgenden sind die Prozessvergleiche jeweils für den Gesamtprozess (Ablauf Nachklärbecken gegen Ablauf Sandfilter) dargestellt. Zur Qualitätssicherung wurden den Proben isoto-
penmarkierte interne Standards in gleicher Konzentration hinzugefügt. Diese sind in den fc-Scatterplots auch als blaue Kreuz eingetragen und fallen stets in die Kategorie Konstanz. Es kann daher angenommen werden, dass Matrixeffekte (z.B. Signalsuppression) eine untergeordnete Rolle spielen. Außerdem sind bekannte Stoffe zusätzlich mit einem schwarzen Punkt hervorgehoben. Teilweise konnten Annotierungen (z.B. Neubildung in Abbildung 6) aber bereits durch manuelle Recherche widerlegt werden. Die bestätigten Befunde wurden bereits in Tabelle 2 dargestellt.

Die Fold-change-Scatterplots für den Gesamtprozess sind im positiven Messmodus in Abbildung 6 (Mai-Kampagne), Abbildung 7 (Juli-Kampagne) und Abbildung 8 (Oktober-Kampagne) dargestellt, für den negativen Messmodus in Abbildung 9 (Mai-Kampagne), Abbildung 10 (Juli-Kampagne) und Abbildung 11 (Oktober-Kampagne) dargestellt. Die Abbildungen für die Einzelprozesse Ozonung und Sandfiltration sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Anzahl der Peaks, welche mit Transformationsprodukten erklärt werden könnten, war absolut sehr gering (max. 16 Peaks). In den meisten Fällen wurde nur 1 Peak in der Kategorie Neubildung erfasst. Auffällig war, dass sowohl im positiven als auch im negativen Messmodus die meisten Signale in der Kategorie Neubildung bei der zweiten Beprobungskampagne (Juli) auftraten. Die Ergebnisse bei der Mai- und Oktober-Beprobung waren ähnlich unauffällig.

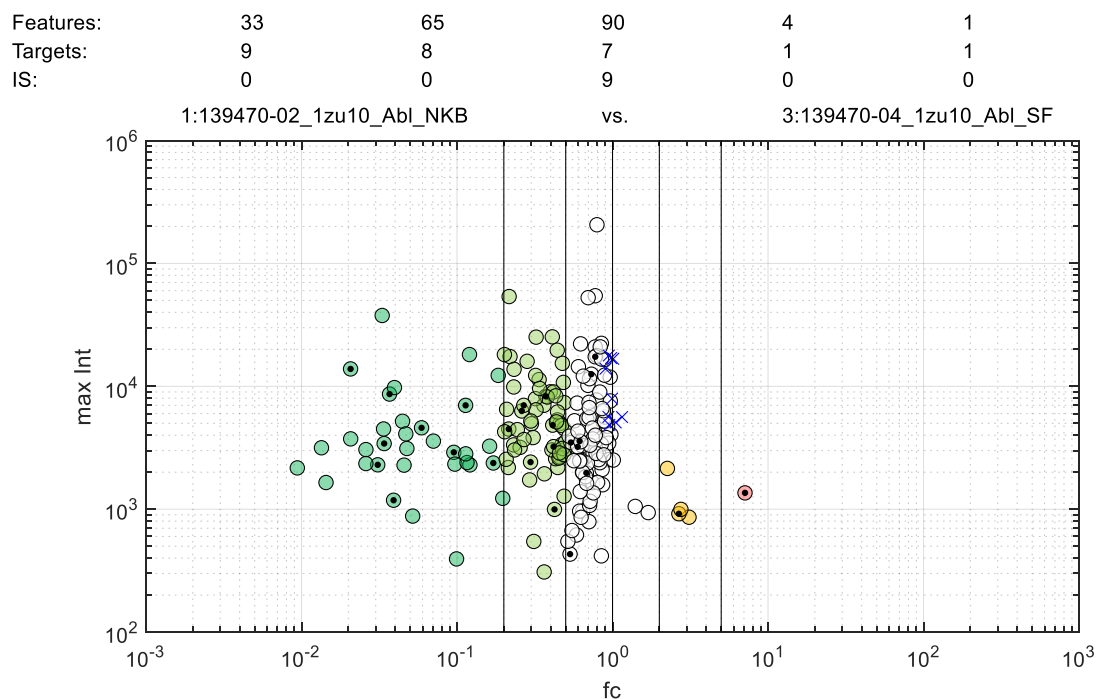


Abbildung 6. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom 9. - 11.5.2022 im positiven Messmodus.

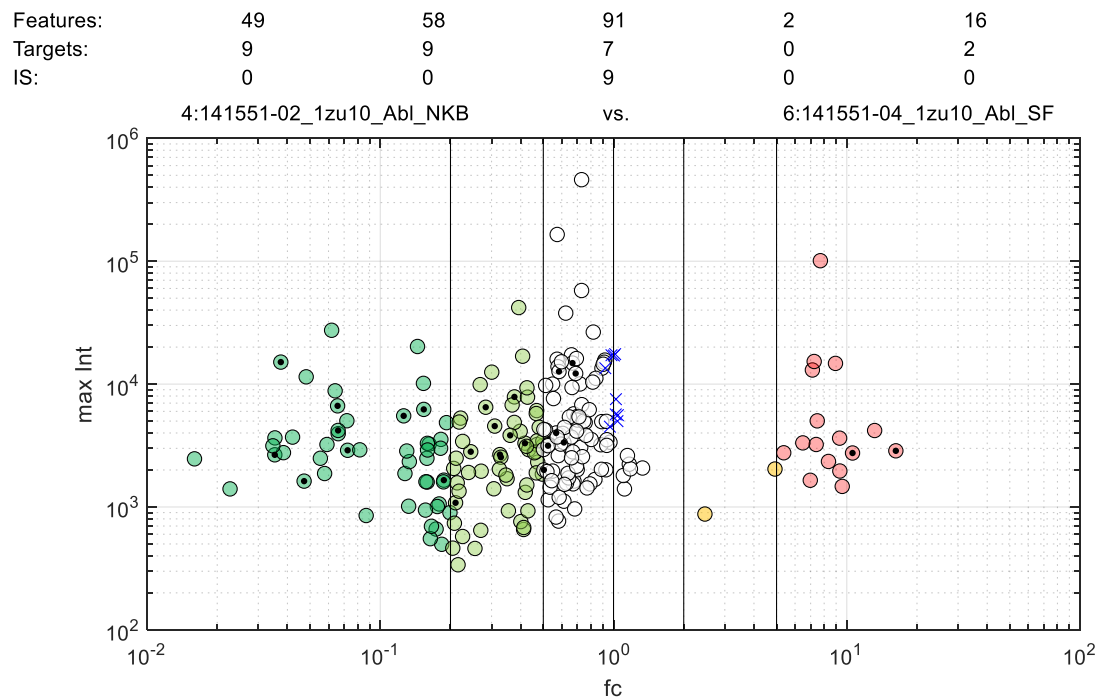


Abbildung 7. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom **26. - 27.7.2022 im positiven Messmodus.**

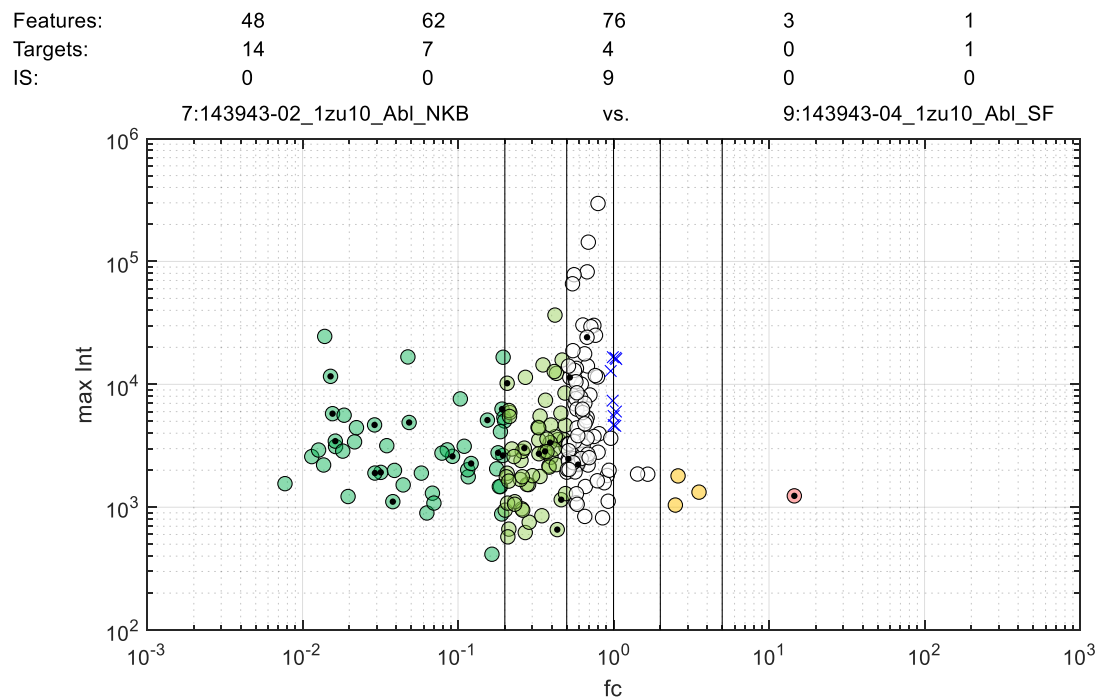


Abbildung 8. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom **17. - 18.10.2022 im positiven Messmodus.**

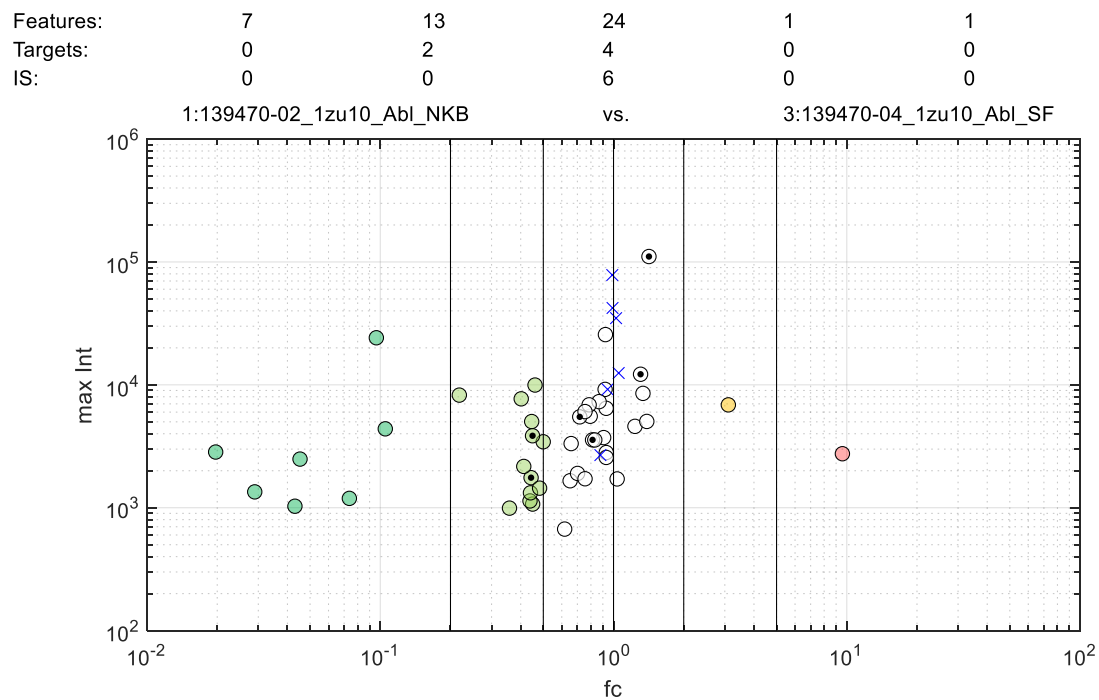


Abbildung 9. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom **9. - 11.5.2022 im negativen Messmodus.**

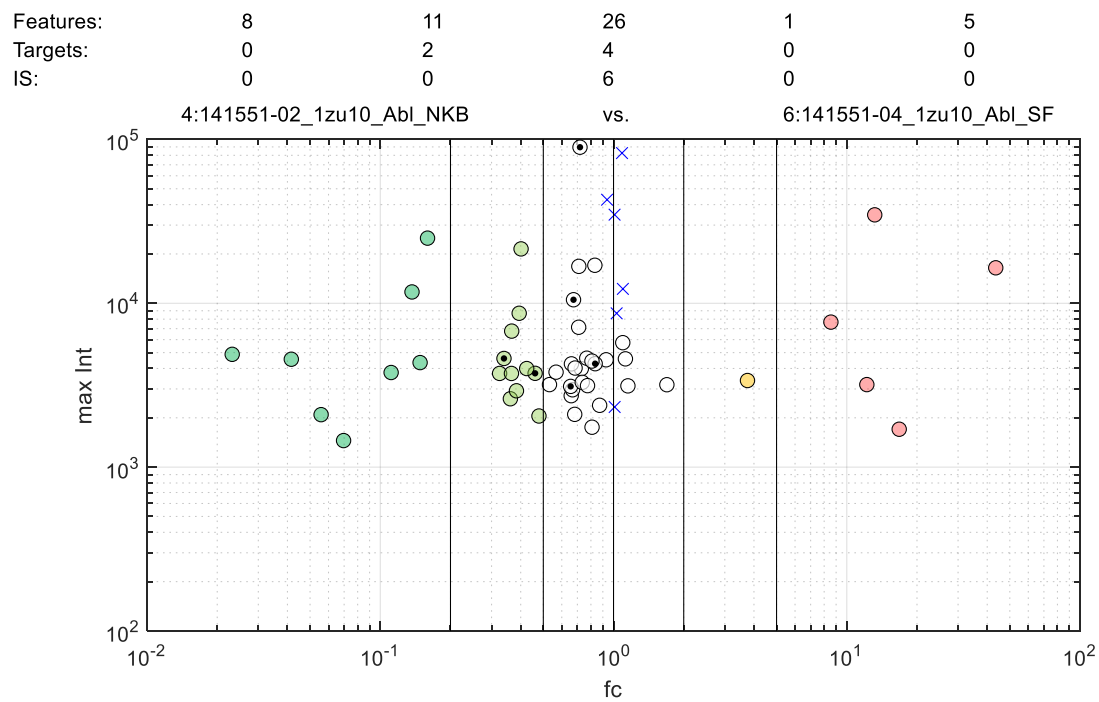


Abbildung 10. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom **26. - 27.7.2022 im negativen Messmodus.**

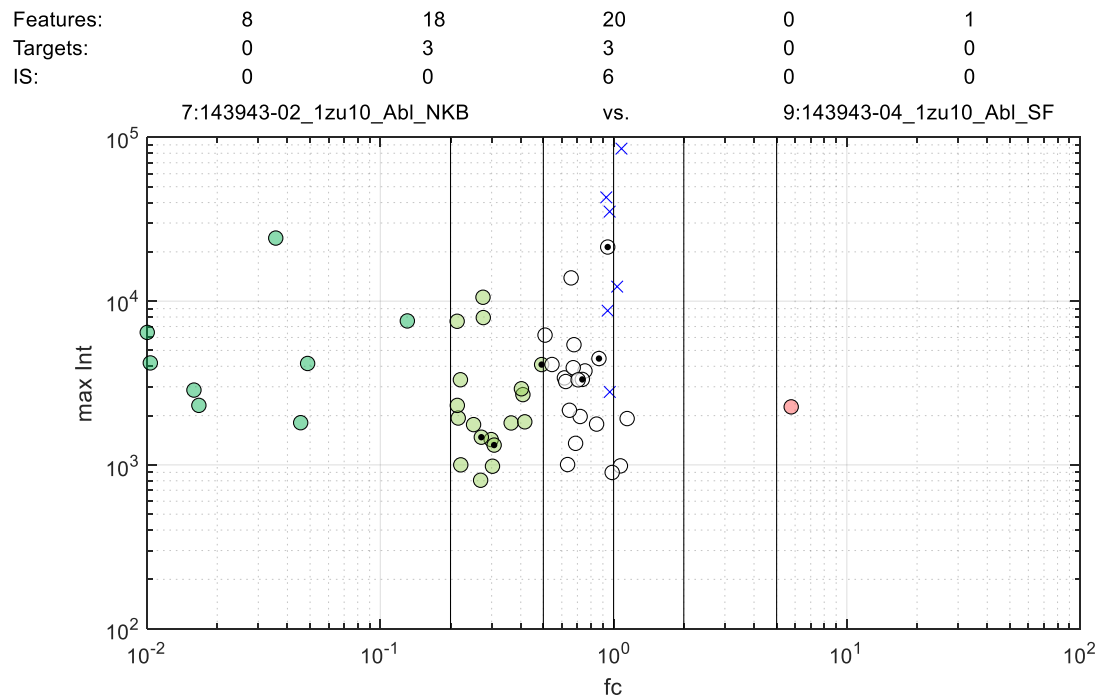


Abbildung 11. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für den Gesamtprozess (Abl. NKB vs. Abl. SF) vom **17. - 18.10.2022 im negativen Messmodus**.

Neben den Transformationsprodukten sind v.a. auch Stoffe interessant, welche den Prozess mehr oder weniger untergehindert durchlaufen, da auch diese in die Umwelt eingetragen werden. Im Folgenden wurden daher die intensivsten Signale, welche in die Kategorien Konstanz, Zunahme oder Neubildung fallen aufgelistet (Tabelle 4). In allen Fällen konnte eine Summenformel postuliert werden. Bei den Summenformeln konnten erneut Hinweise auf phosphorhaltige organische Spurenstoffe gefunden werden.

Tabelle 4. Features mit den höchsten Singnalhöhen in Kategorien Konstanz und Neubildung

Datum	Featurebezeichnung (m/z RT)	Polari- tät	Kategorie	postulierte Summenformel(n)
9. - 11.05.22	309.0626_5.90	+	Konstanz	C ₉ H ₂₀ O ₆ P ₂
	181.9916_5.44	-	Konstanz	C ₇ H ₅ NO ₃ S (Saccharin)
	303.0769_5.34	-	Konstanz	C ₉ H ₂₂ O ₇ P ₂
	213.9639_6.15	-	Konstanz	C ₇ H ₅ NO ₃ S ₂ (Benzothiazolsulfonsäure)
26. - 27.07.22	289.1536_14.37	+	Konstanz	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
	305.1488_10.88	+	Neubildung	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄ (C ₁₀ H ₂₁ N ₆ O ₃ P)
	309.0626_5.90	+	Konstanz	C ₉ H ₂₀ O ₆ P ₂
	181.9916_5.44	-	Konstanz	C ₇ H ₅ NO ₃ S (Saccharin)
	209.0947_7.55	-	Neubildung	C ₈ H ₁₉ O ₄ P
	225.0897_5.75	-	Neubildung	C ₈ H ₁₉ O ₅
	303.0769_5.34	-	Konstanz	C ₉ H ₂₂ O ₇ P ₂
	289.0612_4.98	-	Konstanz	C ₈ H ₂₀ O ₇ P ₂ (C ₁₁ H ₁₁ N ₆ O ₂ P)
	213.96939_6.15	-	Konstanz	C ₇ H ₅ NO ₃ S ₂ (Benzothiazolsulfonsäure)
17. - 18.10.22	309.0626_5.90	+	Konstanz	C ₉ H ₂₀ O ₆ P ₂
	309.0627_5.72	+	Konstanz	C ₉ H ₂₀ O ₆ P ₂
	181.9916_5.44	-	Konstanz	C ₇ H ₅ NO ₃ S (Saccharin)
	303.0769_5.34	-	Konstanz	C ₉ H ₂₂ O ₇ P ₂

Es wurden die höchsten Peaks aus den Kategorien Konstanz, Erhöhung und Neubildung extrahiert, die Schwellenwerte wurden für ESI+ auf 10⁵ cps, für ESI- auf 10⁴ cps festgelegt. Features, welche bei mehr als einer Kampagne auftraten, wurden mit gleicher Farbe gekennzeichnet.

Langenau, 20. Februar 2023

Anlage:
Anhang
Excel-Listen (nur online)

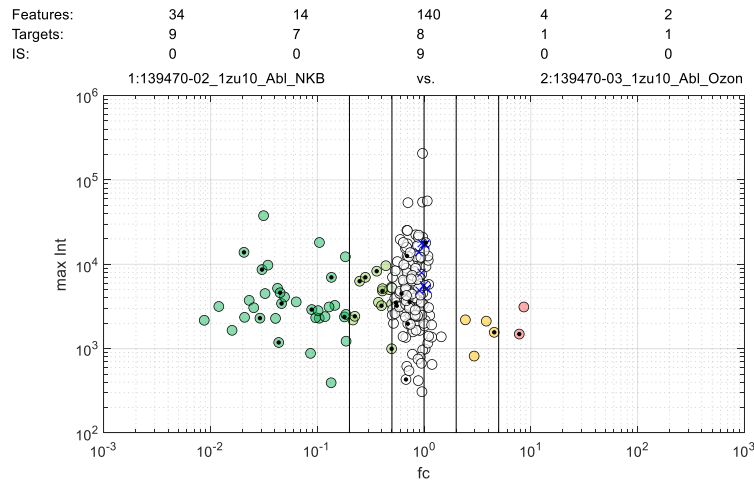
Anhang

Abbildung 12. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **9. - 11.5.2022 im positiven Messmodus**.

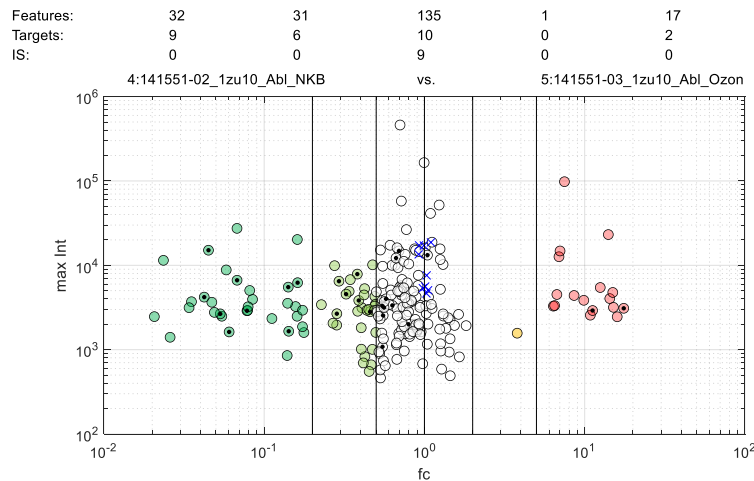


Abbildung 13. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **26. - 27.7.2022 im positiven Messmodus**.

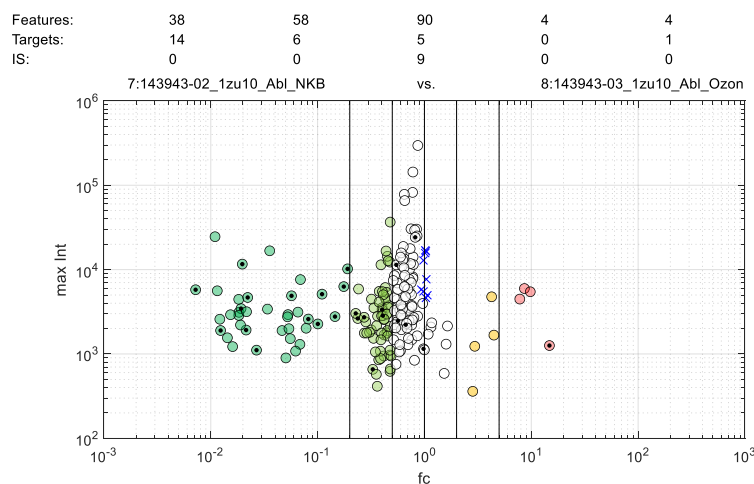


Abbildung 14. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **17. - 18.10.2022 im positiven Messmodus**.

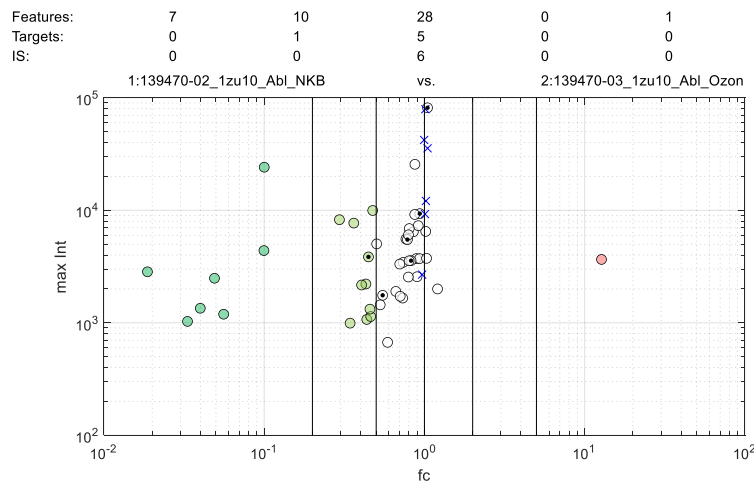


Abbildung 15. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **9. - 11.5.2022** im **negativen Messmodus**.

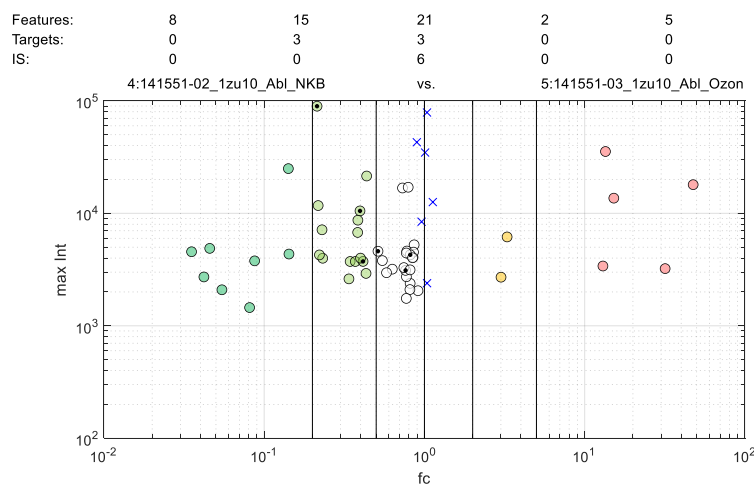


Abbildung 16. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **26. - 27.7.2022** im **negativen Messmodus**.

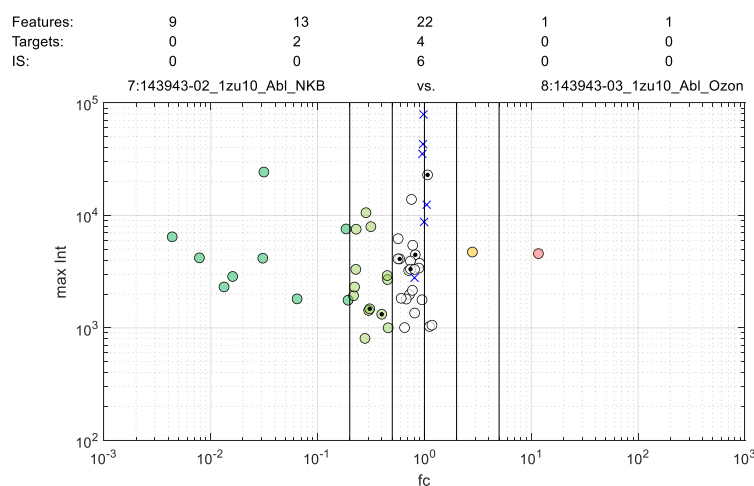


Abbildung 17. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Ozonung (Abl. NKB vs. Abl. O3) vom **17. - 18.10.2022** im **negativen Messmodus**.

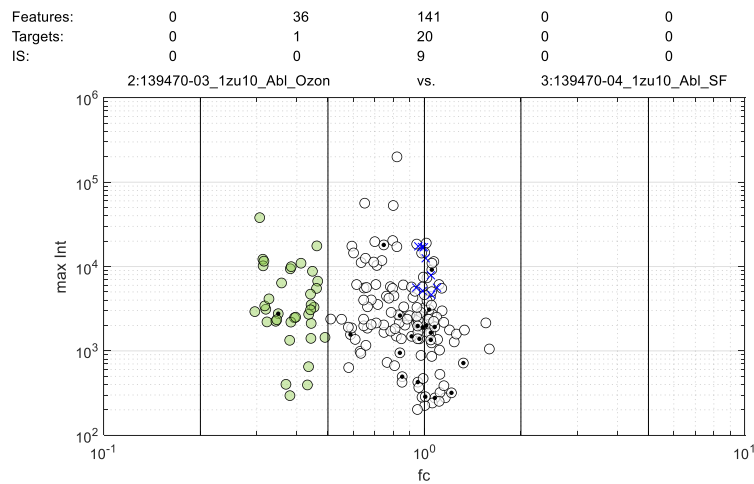


Abbildung 18. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **9. - 11.5.2022** im **positiven Messmodus**.

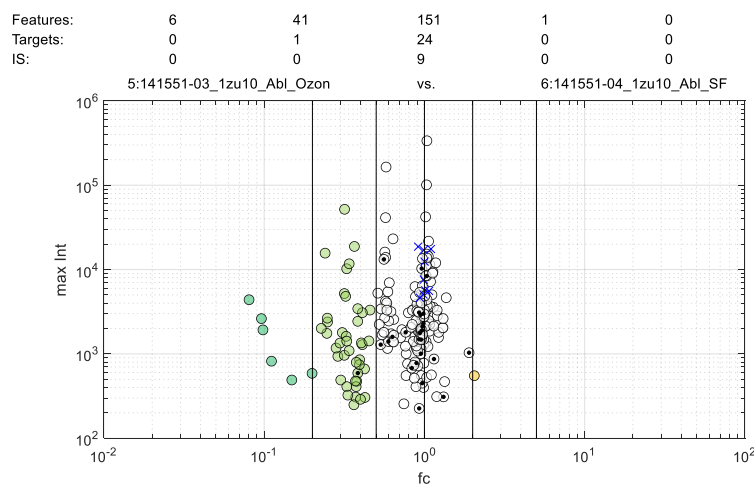


Abbildung 19. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **26. - 27.7.2022** im **positiven Messmodus**.

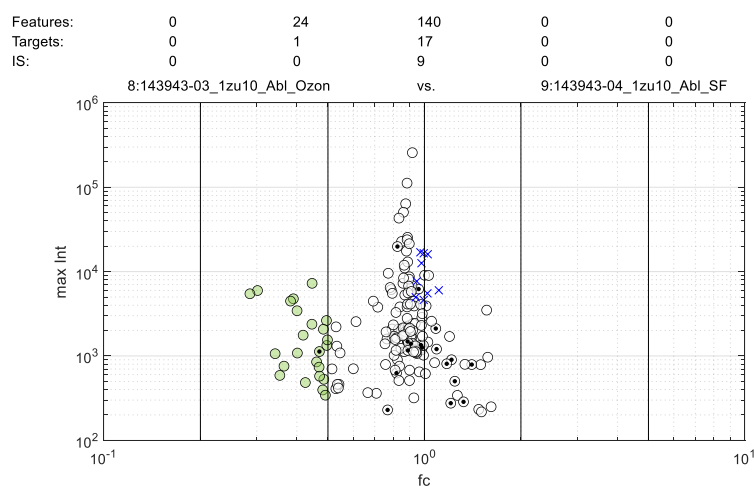


Abbildung 20. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **17. - 18.10.2022** im **positiven Messmodus**.

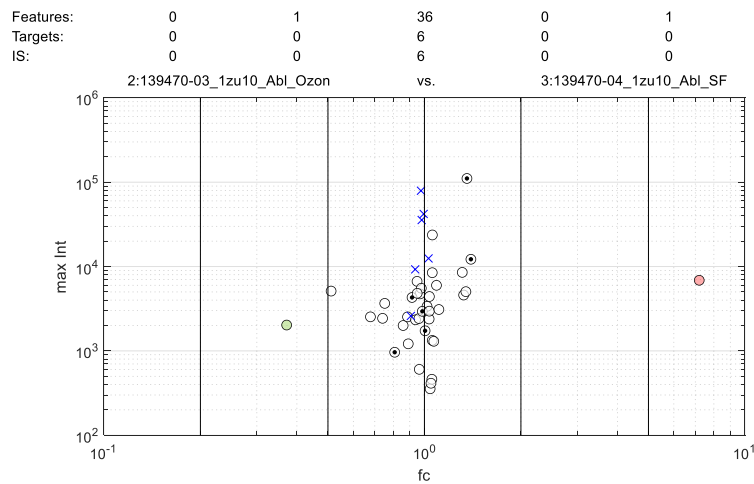


Abbildung 21. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **9. - 11.5.2022 im negativen Messmodus.**

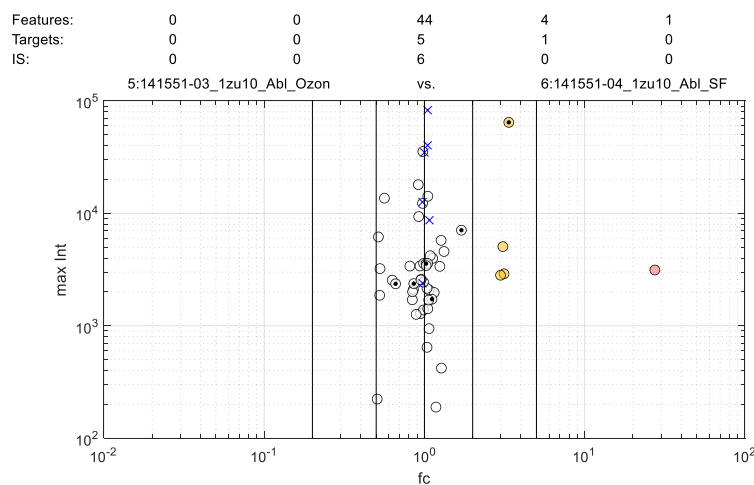


Abbildung 22. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **26. - 27.7.2022 im negativen Messmodus.**

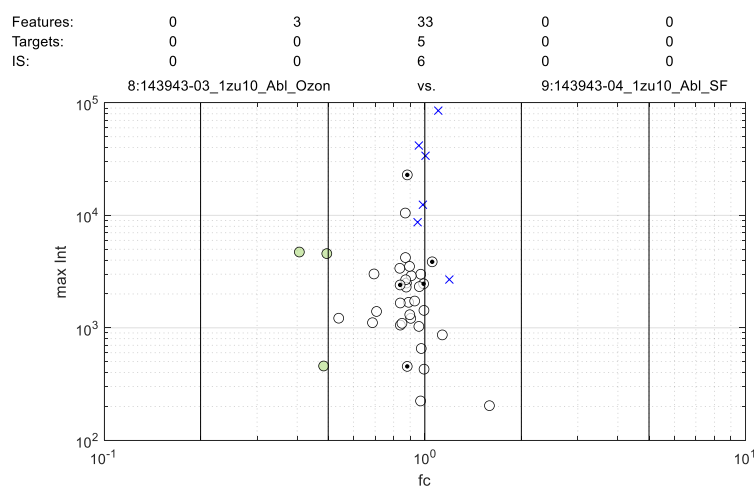


Abbildung 23. Fold-change (fc) - Intensität (max Int) - Scatterplot zur Beurteilung der Prozesseffizienz für die Sandfiltration (Abl. O3 vs. Abl. SF) vom **17. - 18.10.2022 im negativen Messmodus.**

FAKULTATIV-PATHOGENE BAKTERIEN UND KLINISCH-RELEVANTE ANTIBIOTIKA-RESISTENZGENE IM VERLAUF DER ABWASSERAUFBREITUNG DER KLÄRANLAGE TÜBINGEN

Die mikrobiologische Bewertung der Reduktionseffizienz erweiterter Technologien von unerwünschten mikrobiologischen Kontaminanten im Prozessverlauf der Kläranlage

KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT),
INSTITUT FÜR FUNKTIONELLE GRENZFLÄCHEN (IFG)
ABTEILUNG MIKROBIOLOGIE/MOLEKULARBIOLOGIE
Hermann von Helmholtz Platz 1
76344 Eggenstein-Leopoldshafen

PROF. DR. THOMAS SCHWARTZ, DR. NORMAN HEMBACH
Email: thomas.schwartz@kit.edu; norman.hembach@kit.edu
Tel: 0721 608 26802

Inhalt

1.	Hintergrund	3
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Probenaufarbeitung, DNA-Extraktion und molekularbiologische Analysen	4
2.2.	Molekularbiologische Nachweissysteme	4
2.3.	Molekularbiologische Analysen: Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	9
2.4.	Molekularbiologische Analysen: Bestimmung der Genkopienzahl	9
2.5.	Mikrobiologische Analysen: Kultivierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Anteile Antibiotika-resistenter Vertreter	10
2.6.	Parametereinstellungen der Ozonanlage an Tagen der Beprobung	10
3.	Resultate	12
3.1.	Abundanz von Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien im Prozessverlauf der Kläranlage Tübingen auf Basis molekularbiologischer Analysen	12
	Probenkampagne 1 - 0,8 g Ozon/ g DOC	12
	Probekampagne 3 - 0,56 g Ozon/ g DOC	13
	Probenkampagne 5 & 6 - 0,5 g Ozon/ g DOC	15
	Zwischenfazit und Diskussion der Reduktionsleistungen	16
3.2.	Einfluss des Probenahmesystems auf die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien in den Proben.	17
3.3.	Abundanz von Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien im Prozessverlauf der Kläranlage Tübingen auf Basis kulturbasierter Analysen	20
	Fakultativ pathogene Bakterienspezies	20
	Resistente Bakterien	21
4.	Fazit	23
5.	Literaturverzeichnis	24
6.	Anhang	26

1. Hintergrund

Die Verbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen über Kläranlagen in die aquatische Umwelt kann ein Risikopotential darstellen, wenn beeinflusste Gewässer nachfolgend vom Menschen genutzt werden (z.B. Wasserentnahme aus Fließgewässern zur Bewässerung oder nachfolgenden Trinkwasseraufbereitung). Aber auch der direkte Kontakt mit opportunistischen Bakterien bei aquatischen Freizeitaktivitäten kann bei Immun-kompromittierten Menschen (medizinisch- und/oder Alters-bedingt) zu einer Besiedlung und später auch zur Infektion führen. Der Erfolg der medizinischen Behandlung ist dann von der Resistenzausprägung des Bakteriums abhängig.

Viele klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene (ARG) werden nicht nur chromosomal von einer Bakteriengeneration zur nächsten vererbt, sondern liegen auch auf mobilen genetischen Elementen, so dass diese Gene Art-übergreifend übertragen werden können. Der dafür erforderliche Selektionsdruck für die Übertragung solcher mobilen genetischen Elemente kann dabei vielfältig sein und ist nicht zwingend an die Wirkung eines Antibiotikums gebunden (Multi-Resistenz, Plasmide, Co-Lokalisierung mit Schwermetall-/Pestizidresistenz etc.). Daher ist die quantitative Erfassung klinisch relevanter ARG auch unabhängig von fakultativ pathogenen Träger-Bakterien wichtig, um deren Verbreitungswege zu erkennen und zu unterbrechen.

Durch die Quantifizierung der ARG in einer nativen Wasserprobe mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) wird zudem das Problem der Kultivierung umgangen, die entweder selbst einen Selektionsdruck aufgrund des verwendeten Mediums auslöst, oder aufgrund der Wachstumsbedingungen potentielle ARG-Überträger ausschließt. Ebenso kann nur durch den spezifischen Gennachweis die Identität und damit die Relevanz eines ARG ermittelt werden, da ein phänotypischer Antibiotikaresistenznachweis nicht zwingend ein kritisches, mobiles ARG anzeigt, sondern auch intrinsische/chromosomale Antibiotikaresistenzen, die nicht übertragbar und u.U. auch auf einem anderen Resistenzmechanismus beruhen können.

Ebenso wie ARGs so können auch fakultativ pathogene Bakterien molekularbiologisch quantifiziert werden und umgehen dadurch auch falsch-negative Ergebnisse aus der Kultivierung, die ein deutlich verringertes Risikopotential darstellen. Dieser Effekt kann bei human-assoziierten Bakterien auftreten, da durch die untypischen Lebensbedingungen, wie sie in der aquatischen Umwelt vorherrschen, diese Bakterien in ein Dormanz-Stadium (VBNC-Stadium, Viable But Not Culturable) verfallen können.

Der Vorteil der klassischen mikrobiologische Kultivierung auf spezifischen Nährböden liegt dagegen in der Verknüpfung des taxonomischen Nachweises mit einer oder mehrerer Antibiotikaresistenzen. So ist es möglich, auch multiresistente fakultativ pathogene Bakterien nachzuweisen. Zur Absicherung solcher Befunde ist jedoch eine Typisierung notwendig. Für den Umweltbereich, und speziell im Abwasserbereich, ist die Kultivierung meist nur als qualitativer Nachweis möglich. In diesen Wässern/Abwässern ist die Bakteriendichte meist so hoch und divers, dass derzeitige erhältliche Selektivmedien die Begleit-Flora nicht ausreichend unterdrücken, um verlässliche quantitative Analysen durchzuführen.

2. Material und Methoden

2.1. Probenaufarbeitung, DNA-Extraktion und molekularbiologische Analysen

Abhängig vom dem Feststoffgehalt der Wasserprobe wurden 30 -200 mL der gekühlten Proben durch eine 0,2 µm Polycarbonatmembran filtriert. Die Membran wurde anschließend in einem Reaktionsgefäß mit einer Propidium-Monoazid-Lösung (PMA) überschichtet. Das PMA bindet an DNA von Bakterien, deren Membran geschädigt ist, sowie an freie DNA. Nach erforderlichen UV-Aktivierung bindet das PMA kovalent an diese DNA und macht sie für nachfolgende PCR-Analysen unbrauchbar. Bei intakte Bakterienzellen kann sich kein PMA in deren DNA einlagern und steht daher den nachfolgenden PCR-Analysen zur Quantifizierung der Zielgene zur Verfügung (Lebend-Tot Diskriminierung). Für die anschließende DNA-Extraktion wurde das FastSpin Kit für Soil (MP Bio) mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet.

2.2. Molekularbiologische Nachweissysteme

Repräsentativ für fakultativ pathogene Bakterien wurden 6 Vertreter dieser Bakteriengruppe ausgewählt: Enterokokken spp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* und *Escherichia coli*. Hierbei handelt es sich zum überwiegenden Teil um die Erreger, welche als ESKAPE-Gruppe von der WHO gelistet sind und einen signifikanten Anteil an klinischen Infektionen tragen (vgl. Tabelle 1) (National reference center for surveillance of nosokomial infections, 2016).

Tabelle 1: Klinische Relevanz der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und deren prozentualer Anteil an den klinischen Infektionen im Jahr 2016 nach Daten des Nationalen Referenzzentrum für die Überwachung von nosokomialen Infektionen (National reference center for surveillance of nosokomial infections, 2016).

fakultativ pathogene Bakterien	Relevanz
Enterokokken	14,3 % aller klinischen Infektionen
<i>E. faecalis</i>	6,9 % aller klinischen Infektionen
<i>P. aeruginosa</i>	5,8 % aller klinischen Infektionen
<i>K. pneumoniae</i>	4,5 % aller klinischen Infektionen
<i>A. baumannii</i>	5 % aller klinischen Infektionen
<i>E. coli</i>	16,6 % aller klinischen Infektionen

Enterokokken sind ein gängiger Indikator für fäkale Kontaminationen in wasserführenden Systemen. Die Gram-positiven Erreger sind vor allem für Harnwegs-, sowie Wundinfektionen verantwortlich (National reference center for surveillance of nosokomial infections, 2016).

Insbesondere *E. faecalis* ist widerstandsfähig gegenüber Flächendesinfektionen und kann bis zu 30 Monate auf Oberflächen überdauern. Er ist für 23 % aller postoperativen Wundinfektionen verantwortlich (Kommission and Krinko, 2018).

P. aeruginosa ist ein aquatisches fakultativ pathogenes, Gram-negatives Bakterium, das im besonderen Maße fähig ist, Biofilme zu bilden. Dadurch ist dieses Bakterium nur schwerlich aus kontaminierten Systemen zu entfernen, da Biofilme ein hohes Resistenzpotential gegenüber Desinfektion haben. Des Weiteren wurden für *P. aeruginosa* eine hohe Antibiotika-Resistenzlage gegen Carbapeneme, Aminoglycoside und Polymyxinen gefunden, was häufig zu Multiresistenzen führt (Lepper et al., 2002; Neuhauser et al., 2003).

Das Gram-negative Bakterium *K. pneumoniae* bildet generell sehr schnell neue Resistenzen aus und gibt diese über den horizontalen Gentransfer an bisher sensible Bakterien weiter. So wurde die erste nachgewiesene Quelle von Plasmid assoziierten Carbapenemasen in einem *K. pneumoniae*-Stamm isoliert (Hassani, 2014; Walsh, 2010).

Infektionen mit dem ebenfalls Gram-negativen Bakterium *A. baumannii* haben in den letzten Jahren eine steigende Mortalität aufgezeigt. Der Erreger ist sehr widerstandsfähig gegen die gängigen Sterilisationsverfahren. Seit 2008 sind vereinzelt erste Infektionen mit Pan-resistenten *A. baumannii*-Stämmen beobachtet worden (Eliopoulos et al., 2008).

E. coli wird in vielen Bereichen als Gram-negativer Indikator bakterieller Verunreinigungen verwendet. Dieses Bakterium hat vor allem im Klinikbereich eine hohes Risikopotential durch die hohe Abundanz von Extended Spektrum β -Lactamasen (ESBL) und ist daher als kritisch zu bewerten.

Um die Antibiotikaresistenzlage zu erfassen, wurden insgesamt 13 unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene sowie ein Gen des Integron *Int11*, welches den mobilen genetischen Austausch unterstützt, ausgewählt. Die Auswahl der Resistenzgene basiert auf korrespondierenden Antibiotikaklassen mit überwiegend klinischer Relevanz oder aufgrund ihrer nachgewiesenen Abundanz zur Ermittlung von Reduktionen mikrobieller Kontaminanten der eingesetzten erweiterten Technologien am Klärwerk. Die Resistenzgene und deren assoziierten Antibiotikaklassen sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Auswahl der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und Antibiotikaklassen der vermittelten Resistenzen.

Resistenzgen	Betreffende Antibiotikaklasse
<i>ermB</i>	Makrolid Antibiotika, Erythromycin
<i>int11</i>	Integron Typ 1 mobiles genetisches Element
<i>tetM</i>	Tetracykline
<i>blaTEM</i>	Penicilline
<i>sul1</i>	Sulfonamide
<i>blaCTX-M</i>	Cephalosporin der 2. Generation
<i>blaCTX-M-32</i>	Cephalosporin der 2. Generation
<i>blaOxa-48</i>	Carbapeneme
<i>vanA</i>	Glykopeptide, Vancomycin
<i>mecA</i>	Penicilline, Methicillin
<i>mcr-1</i>	Zyklisches Peptid, Colistin
<i>blaNDM</i>	Vielzahl von Lactam-Antibiotika, Carbapeneme

Die große Gruppe an Resistenzen gegen β -Lactam Antibiotika wird unter anderem durch *blaTEM* repräsentiert. Das Gen kommt vor allem in *E. coli* und *K. pneumoniae* vor. Es verursacht ca. 90 % aller beobachteten Ampicillinresistenzen in *E. coli* und gilt als Vorläufer von β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) (Emery and Weymouth, 1997). *blaCTX-M* sowie *blaCTX-M-32* sind die weltweit am häufigsten nachgewiesenen Resistenztypen von ESBL produzierenden Bakterien. Eine besondere Rolle bei den β -Lactam Antibiotika hat die Klasse der Carbapeneme, da diese bisher noch gegen ESBL produzierende Erreger wirken. Das Gen ist bei *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* bereits weit verbreitet, liegt auf dem Transposon Tn402 und ist somit genetisch hoch mobil. Ebenfalls Plasmid-lokalisiert ist das Resistenzgen *blaOxa-48*, welches neben Resistenzen gegen Carbapeneme auch Resistenzen gegen Cephalosporine vermittelt ist (Poirel et al., 2012). Als weitere, besondere kritisch zu bewertendes Resistenzgen ist das *blaNDM* Gen ausgewählt. Dieses Gen ist auf einem mobilen kodierenden Plasmid lokalisiert, welches unter anderem auch Resistenzgene gegen eine Vielzahl von β -Lactam Antibiotika kodiert. Dadurch wird die Behandlung klinischer Infektionen weiterhin erschwert (Nordmann et al., 2011).

Neben den in der Humanmedizin weit verbreiteten Resistenzen wurden auch noch das MRSA assoziierte *mecA* Gen von *Staphylococcus aureus* sowie das Resistenzgen gegen

Glykopeptid (Vancomycin)-Antibiotika *vanA* in Enterokokken und das 2015 erstmals beschriebene mobile *mcr-1* Gen, welches eine Resistenz gegen das zyklische Peptid Polymyxin (Colistin, ein Reserveantibiotikum) vermittelt, untersucht (Skov and Monnet, 2016).

Repräsentativ für Resistenzen gegen auch in der Veterinärmedizin genutzten Antibiotika wurden die Resistenzgene *su1* und *tetM* als Parameter ausgewählt. Insbesondere von Tetrazyklin ist bekannt, dass es als relativ altes Breitbandantibiotikum immer noch in relevanten Konzentrationen im Zulauf von Kläranlagen nachgewiesen werden kann (Gao et al., 2012).

Eine Sonderstellung in der Liste hat das Integrase-Gen des Klasse 1 Integrans (*intl1*), da dieses Gen keine direkte Antibiotikaresistenzen vermittelt, sondern ein verbreitetes mobiles genetisches Element darstellt, welches eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotikaresistenzen inkorporieren und innerhalb verschiedener Bakterienspezies transferieren kann (Soledad Ramírez et al., 2009; Xia et al., 2013).

Einen Überblick über die verwendeten qPCR Nachweissysteme ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Für jedes Target (fakultativ pathogene Bakterium oder spezifisches Antibiotikaresistenzgen) sind die verwendeten Primersequenzen aufgeführt. Hierbei handelt es sich um eine spezifische Abfolge von Basenpaaren (den variablen Bausteinen der DNA), welche für den spezifischen Nachweis des Targets innerhalb der Gesamtpopulation verwendet wurde. Die Amplikongröße ist der Abstand zwischen den einzelnen Primersequenzen in der DNA des Zielorganismus. Da die durchgeführte PCR den Abschnitt zwischen beiden Primersequenzen amplifiziert, kann mittels der Amplikongröße kontrolliert werden, ob die verwendeten Primersequenzen spezifisch für das relevante Target ist. Die Spalte „Gleichung der Kalibriergerade“ listet die erstellten Kalibriergeraden der verwendeten Primersysteme. Jede Kalibriergerade ist spezifisch für die verwendete Kombination aus Gerät, verwendeten Reagenzien und jeweiligen Primern erstellt worden. Sie wird verwendet um das Signal der qPCR in Zelläquivalente umzurechnen. Effizienz sowie der Korrelationskoeffizient R^2 geben Aufschluss über die Qualität der erstellten Kalibriergeraden und LOD zeigt das spezifische Detektionslimit eines Targets im qPCR-System. Der jeweilige Kontrollstamm wurde zur Erstellung dieser Kalibriergeraden verwendet.

Tabelle 3: Primersequenzen, Geradengleichung, Effizienz, Detektionslimit und Korrelationskoeffizient der Kalibriergerade, Amplikongröße, verwendete Referenz und Literatur der nachgewiesenen molekularbiologischen Parameter

Target	Primersequenz	Gleichung der Kalibriergeraden	Amplikon- größe	Effizienz	R ²	LOD	Kontrollstamm	Referenz
fakultativ pathogene Bakterien								
Enterokokken spp.	Fwd: AGAAATTCCAAACGAACCTTG Rev: CAGTGCTCTACCTCCATCATT	$F(x) = -3,585x + 35,283$	93 bp	90,1 %	1,000	65	<i>E. faecium</i> DSM20477	(Frahm and Obst, 2003)
<i>E. faecalis</i>	Fwd: CACCTGAAGAAACAGGC Rev: ATGGCTACTTCAATTTTCACG	$F(x) = -3,472x + 35,447$	475 bp	94,1 %	0,999	6	<i>E. faecalis</i> ATCC51299	(Depardieu et al., 2004)
<i>P. aeruginosa</i>	Fwd: AGCGTTTCGTCCTGCACAAGT Rev: TCCACCATGCTCAGGGAGAT	$F(x) = -3,282x + 35,276$	81 bp	101,7 %	0,999	3	<i>P. aeruginosa</i> DSM1117	(Clifford et al., 2012)
<i>K. pneumoniae</i>	Fwd: ACGGCCGAATATGACGAATTC Rev: AGAGTGATCTGCTCATGAA	$F(x) = -3,387x + 38,844$	68 bp	97,4 %	0,998	18	<i>K. pneumoniae</i> DSM30104	(Clifford et al., 2012)
<i>A. baumannii</i>	Fwd: GTTGTGGCTTTAGGTTTATTATACG Rev: AAGTTACTCGACGCAATTCCG	$F(x) = -3,380x + 35,679$	94 bp	97,6 %	1,000	31	<i>A. baumannii</i> DSM30007	(Clifford et al., 2012)
<i>E. coli</i>	Fwd: GCATCGTGACCACTTGA Rev: CAGCGTGGTGGCAAAA	$F(x) = -3,361x + 35,797$	59 bp	98,4 %	0,994	4	<i>E. coli</i> DSM1103	(Clifford et al., 2012)
Antibiotikaresistenzgene								
<i>ermB</i>	Fwd: TGAATCGAGACTTGAGTGTGCAA Rev: GGATTCTACAAGCGTACCTT	$F(x) = -3,328x + 35,901$	71 bp	100 %	1,000	16	<i>S. hyointestinalis</i> DSM20770	(Alexander et al., 2015)
<i>Int1</i>	Fwd: GCCTTGATGTTACCCGAGAG Rev: GATCGGTCTGAATGCGTGT	$F(x) = -3,472x + 34,720$	196 bp	94,1 %	1,000	126	<i>E. coli</i> pNORM	(Rocha et al., 2018)
<i>tetM</i>	Fwd: GGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATC Rev: CCAACCATAAATCCTTGTTTCRC	$F(x) = -3,424x + 38,747$	88 bp	95,9 %	0,998	4	<i>E. coli</i> DH5α	(Peak et al., 2007)
<i>blaTEM</i>	Fwd: TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG Rev: CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	$F(x) = -3,303x + 38,559$	112 bp	100,8 %	0,999	80	<i>E. coli</i> pNORM	(Rocha et al., 2018)
<i>sul1</i>	Fwd: CGCACCAGAAACATCGCTGCAC Rev: TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	$F(x) = -3,387x + 39,802$	161 bp	97,6 %	0,999	80	<i>E. coli</i> pNORM	(Rocha et al., 2018)
<i>blaCTX-M</i>	Fwd: CGCTTTGCGATGTGCAG Rev: ACCGCGATATCGTTGGT	$F(x) = -3,504x + 34,255$	551 bp	92,9 %	1,000	93	<i>E. coli</i> pNORM	(Rocha et al., 2018)
<i>blaCTX-M-32</i>	Fwd: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA Rev: CGCTCATCAGCACGATAAAG	$F(x) = -3,517x + 37,800$	155 bp	92,5 %	1,000	235	<i>E. coli</i> pNORM	(Rocha et al., 2018)
<i>blaOXA-48</i>	Fwd: TGTTTTTGGTGGCATCGAT Rev: GTAAMRATGCTTGTTTCGC	$F(x) = -3,540x + 36,913$	177 bp	91,6 %	0,998	92	<i>K. pneumoniae</i> TGH Isolate 2	(Monteiro et al., 2012)
<i>vanA</i>	Fwd: TCTGCAATAGAGATAGCCGC Rev: GGAGTAGCTATCCAGCATT	$F(x) = -3,541x + 33,078$	376 bp	91,6 %	1,000	43	<i>E. faecium</i> B7641 vanA	(Klein et al., 1998)
<i>mecA</i>	Fwd: CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA Rev: TGGTCTTTCTGCATTCTCTGGA	$F(x) = -3,327x + 34,887$	91 bp	99,8 %	1,000	11	<i>S. Aureus</i> A1	(Volkman et al., 2004)

Target	Primersequenz	Gleichung der Kalibriergeraden	Amplikon- größe	Effizienz	R ²	LOD	Kontrollstamm	Referenz
<i>mcr-1</i>	Fwd: GGGCCTGCGTATTTTAAGCG Rev: CATAGGCATTGCTGTGCGTC	$F(x) = -3,386x + 35,349$	183 bp	97,4 %	0,999	8	<i>E. coli</i> NRZ-14408	(Hembach et al., 2017)
<i>blaNDM</i>	Fwd: TTGGCCTTGCTGTCCTTG Rev: ACACCAGTGACAATATCACCG	$F(x) = -3,293x + 35,877$	82 bp	101,2 %	0,999	66	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2146	Monteiro et al., 2012)

2.3. Molekularbiologische Analysen: Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene und Markergene von fakultativ pathogenen Bakterien erfolgte über quantitative Real-Time PCR (qPCR). Die Reaktion wurde im Triplikat mit 200 nM Endkonzentration je Primer in 20 µl Ansätzen, 40 Zyklen lang gefahren. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde nach jedem qPCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und die korrekte Identität des Amplicons bestätigt. Das verwendete Temperaturprofil erfolgte im 2-stufigen Verfahren und startet mit 90°C für 10 Minuten zur initialen Denaturierung der extrahierten Gesamt-DNA und Enzymaktivierung (DNA-Polymerase, Maxima SYBR Green). Daraufhin erfolgen die 40 Zyklen mit Primer-spezifischer Annealing-Temperatur, bei gleichzeitiger Elongation (Tabelle 4).

Tabelle 4: Temperaturprofil der verwendeten qPCR

Temperatur	Zeitdauer	Reaktionsschritt	Zyklen
90 °C	10 min	Initiale Denaturierung und Enzym-aktivierung	x 1
90 °C	15 sec	Denaturierung	x 40
60 °C	1 min	Annealing/Elongation	
60 – 90 °C	5 sec / 0,5 °C	Schmelzkurvenanalyse	x 1

2.4. Molekularbiologische Analysen: Bestimmung der Genkopienzahl

Die Detektion und Quantifizierung von Spezies-spezifischen Markergenen und klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen innerhalb einer nativen Bakterienpopulation erfordert eine Kalibrierung des Detektionssystems, auf dessen Grundlage die Genkopien in der untersuchten Abwasserprobe errechnet werden können. Das hierfür verwendete Standardprotokoll wird im Folgenden erläutert.

Referenzorganismen wurden über Nacht, aerob bei 37 °C unter Schütteln (120 rpm) bis zu einer OD > 1 kultiviert. Nach Extraktion der genomischen DNA mit dem „DNA Purification - FastDNA™ spin kit for soil“ (MP Biomedicals) wurde eine Verdünnungsreihe über 7 log-Stufen erstellt und anschließend die DNA-Konzentration per QuBit™ (ThermoFisher Scientific) gemessen. Aufgrund des Detektionslimit des Qubit™ konnten nur Verdünnungen bis zu einer DNA-Konzentration von 0,1 ng/µl gemessen werden, die Konzentrationen der übrigen Verdünnungen wurden darauf basierend errechnet. Die Anzahl der Genkopien der Verdünnungsreihe wurde auf Grundlage der recherchierten Genom-Größen und der gemessenen DNA-Konzentrationen mit Hilfe des URI Genomics & Sequencing Center (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) bestimmt.

Zur Auswertung wurde die in der qPCR gemessenen Cycle Threshold (Ct-Wert) der zu untersuchenden Wasserprobe gegen die ermittelten Genkopien der jeweiligen Verdünnung aufgetragen. Die Normierung der Genkopien erfolgte pro 100 mL Wasservolumen.

Der Hauptanteil an Mikroorganismen in einer natürlichen Population besteht aus weitestgehend uncharakterisierten Bakterien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund sowie autochthonen Bakterien, die ebenfalls Empfänger und als Überträger von Antibiotikaresistenzgenen fungieren können. Daher werden die Zellzahlen, die mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierfunktion berechnet wurden, als Zelläquivalente aus einer Mischpopulation bezeichnet. Die Normierung der quantitativen Daten wurde auf 100 mL Wasservolumen bezogen.

2.5. Mikrobiologische Analysen: Kultivierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Anteile Antibiotika-resistenter Vertreter

Um eine korrekte KBE-Bestimmung auf den Selektiv-Agar Nährböden durchzuführen, wurde aus jeder Wasserprobe eine logarithmische Verdünnungsreihe erstellt (mit 100 mL, 10 mL, 1 mL, 100 µL, 10 µL und 1 µL Originalvolumen) und dieses über einen Nitrocellulose Membran (47 mm Durchmesser, Porengröße 0,45 µm, Whatmann) filtriert. Die Membranen einer jeden Verdünnungsreihe wurden anschließend zur Selektion spezifischer Bakterien auf die folgenden Nährböden verteilt:

Bakterien der ESBL Klassifizierung wurden auf CHROMagar™ ESBL selektioniert.

Der kulturelle Nachweis von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) erfolgte durch den CHROMagar™ MRSA von Mast Diagnostica.

Als bakterielle Begleitparameter wurden kultivierbare *E. coli* und Coliforme (mFc-Agar), Pseudomonaden (Cetrimidagar), Enterokokken (Slanetz-Bartley-Agar + Galle Äskulin-Agar) und *Acinetobacter* (Acinetobacter CHROMagar) in allen Wasserproben untersucht (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Plattensysteme und deren Inkubationsparameter zum kulturellen Nachweis von fakultativ pathogenen Bakterien sowie antibiotikaresistenten Bakterien (ESBL&MRSA-Keimen)

Nachgewiesene Organismen	Plattensystem	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur [°C]	Spezifische Kolonien
<i>E. coli</i>	mFC	24 h	37° C	Blau bis violett
Intestinale Enterokokken	Slanetz Barley	48 h	37° C	-
	Galle Äskulin	30 Min.	44° C	Schwarz
Pseudomonaden	Cetrimid	48 h	42° C	Blau/grün,
<i>Acinetobacter</i> spp.	CHROMagar™ Acinetobacter	48 h	37° C	Hellrot
ESBL-Erreger	CHROMagar™ ESBL	24 h	42° C	Dunkelpink bis lila, blau-türkis bis blau, bräunlich bis dunkelgelb, transparent bis gelb, weiß bis cremefarben
MRSA	CHROMagar™ MRSA	48 h	42° C	Rose bis malve

Die resultierenden spezifischen koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden auf 100 mL normiert und im Anschluss der Mittelwert der auswertbaren Verdünnungen gebildet.

2.6. Parametereinstellungen der Ozonanlage an Tagen der Beprobung

Insgesamt wurden 6 Probenkampagnen an der Kläranlage Tübingen durchgeführt. Zwecks Optimierung der Betriebsparameter der Ozonanlage wurde die verwendete Ozonkonzentration zwischen den einzelnen Probenkampagnen variiert. Ein Überblick über die einzelnen Probenkampagnen und deren verwendeten Ozonkonzentration ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Datum, Ozonkonzentration und durchgeführte Analysen der einzelnen Probekampagnen.

	Kampagne 1	Kampagne 2	Kampagne 3	Kampagne 4	Kampagne 5	Kampagne 6
Datum der Probenahme	24.01.22	20.04.22	04.05.22	10.05.22	27.07.2022	18.10.22
Ozon - konzentration	0,8 g Ozon/ g DOC	0,6 g Ozon/ g DOC	0,56 g Ozon/ g DOC	0,5 g Ozon/ g DOC	0,5 g Ozon/ g DOC	0,5 g Ozon/ g DOC
Kultivierung	+	+	+	+	+	+
FBP & ARGs	+	-	+	-	+	+

Die Probenahmen erfolgte als 24h Mischprobe über das zentrale Probenahmesystem der Kläranlage. Jede Probenahme umfasste jeweils eine Probe vom Zulauf der biologischen Klärung (PN1), Zulauf der Ozonbehandlung (Ablauf der biologischen Klärung) (PN2), Zulauf der Sandfiltration (Ablauf der Ozonbehandlung) (PN3) und Ablauf der Sandfiltration (PN4). Für Probekampagne 5 und 6 wurden zusätzlich zu den vier Proben, die über das 24h Probenahmesystem gezogen wurden, eine Schöpfprobe der vier Probenahmestellen genommen.

3. Resultate

3.1. Abundanz von Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien im Prozessverlauf der Kläranlage Tübingen auf Basis molekularbiologischer Analysen

Um zu erfassen, inwieweit die weitergehenden Abwasserbehandlung bestehend aus Ozonbehandlung und Sandfiltration zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen beitragen, wurde die absolute Abundanz der untersuchten Parameter in jeder Probe erfasst. Die Probe des Zulaufes (PN1) sowie die Probe Ablauf des Nachklärbeckens/NKB (PN2) dient hierbei als Referenz, um die Reduktionsleistungen der Ozonung und Sandfiltration besser einordnen zu können. Der Fokus dieser Ausarbeitung lag somit auf den Reduktionsleistungen der Ozonbehandlung und Sandfiltration.

In den nachfolgenden Tabellen zu den molekularbiologischen Untersuchungen sind die prozentualen Reduktionsleistungen aufgelistet, welche durch die Verfahren als Prozess erreicht wurden. Vollständige Reduktion unter das Detektionslimit wurden mit einer Reduktion von 100% notiert. Negative prozentuale Reduktionen spiegeln eine Zunahme des Zielgens während des Verfahrens wieder.

Probenkampagne 1 - 0,8 g Ozon/ g DOC

Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Reinigungsleistungen der einzelnen Stufen unter den Bedingungen, welche während den 24h der Probensammlung vorherrschten. Eine allgemeingültige Aussage ist durch solche Einfachmessungen nur bedingt möglich.

Die prozentuale Reduktionsleistung der Ozonbehandlung bei 0,8 g Ozon/ g DOC ist in Tabelle 7 aufgelistet.

Ausgehend vom Zulauf (PN1) konnte durch die biologische Klärung eine 99,1% Reduktion erreicht werden. Vergleichbare Reduktionsleistungen von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen werden ebenfalls in der Fachliteratur für die konventionelle Klärung genannt.

Durch die Erweiterung des Klärprozesses um eine Ozonung und Sandfiltration konnte über den gesamten Klärprozess (PN1 bis PN4) mit 13 der 19 untersuchten Parametern, die Mehrheit der untersuchten mikrobiologischen Parameter unter das Detektionslimit reduziert werden. Gerade die klinisch besonders kritischen Resistenzgene der Gruppe der selten vorkommenden Resistenzgene und die intermediär vorkommende Resistenzgene wurden aus dem Abwasser eliminiert und erreichten damit nicht den Vorfluter. Dies betraf auch die Mehrzahl der Genmarker der fakultativ pathogenen Bakterien.

Lediglich die häufig vorkommenden Resistenzgene, sowie taxonomische Markergene der Enterokokken, gelangten nach einer deutlichen aber unzureichenden Reduktion über den gesamten Klärprozess in den Vorfluter. Trotz Reduktion von ca. 6 Log-Stufen (Mittelwert aller untersuchten Parameter) erreichen Konzentrationen bis zu 10^4 Zelläquivalenten / 100 mL den Vorfluter.

Tabelle 7: Abundanz von fakultativ pathogenen Bakterien (Markergene) und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf der biologischen Klärung (Zulauf), Zulauf der Ozonung (Ablauf NKB) in Zelläquivalenten/ 100 mL sowie die prozentuale Reduktion der Kontaminationen, die durch die biologische Klärung, Ozonunbehandlung (0,8 g /g DOC) und Sandfiltration bei Kampagne 1 erreicht wurde.

0,8 g Ozon/ g DOC		Zulauf (PN1)	Zulauf Ozonung (PN2)		Reduktion durch 0,8 g Ozon/ g DOC	Reduktion durch Sandfiltration
Fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	4,37E+10	7,78E+07	99,822%	-85,886%	99,775%
	Enterokokken	1,63E+07	5,28E+05	96,762%	97,333%	99,771%
	<i>E. faecalis</i>	3,65E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1,88E+04	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>K. pneumoniae</i>	2,29E+04	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>A. baumannii</i>	1,12E+06	9,43E+01	99,992%	-6,054%	100,000%
	<i>E. coli</i>	1,57E+06	1,31E+03	99,917%	28,969%	100,000%
häufig vorkommende Resistenzen	<i>ermB</i>	3,73E+07	1,02E+04	99,973%	-248,564%	99,875%
	<i>int11</i>	2,65E+08	7,08E+05	99,732%	-62,710%	98,556%
	<i>blaTEM</i>	1,31E+07	1,04E+04	99,921%	47,380%	94,121%
	<i>tetM</i>	6,97E+06	2,58E+03	99,963%	-197,775%	100,000%
	<i>sul1</i>	6,56E+08	4,02E+06	99,386%	-160,172%	99,394%
intermediär vorkommende Resistenzen	<i>ctx-M</i>	6,55E+04	6,09E+03	90,699%	98,739%	100,000%
	<i>ctx-M-32</i>	1,02E+06	6,59E+02	99,935%	31,354%	100,000%
	<i>bla_{oxa}-48</i>	1,93E+05	0,00E+00	100,000%	-	-
selten vorkommende Resistenzgene	<i>vanA</i>	3,00E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>mcr-1</i>	1,51E+04	7,95E+01	99,472%	100,000%	-
	<i>mecA</i>	1,94E+03	3,93E+01	97,969%	35,799%	100,000%
	<i>blaNDM</i>	2,91E+05	2,21E+02	99,924%	88,803%	100,000%

Auch wenn ein Großteil der unerwünschten Gentargets reduziert wurde, zeigte sich bei *Acinetobacter baumannii*, und den Resistenzgenen *ermB*, *tetM*, *sul1* und dem Integron *Int11* eine Zunahme der Abundanzen nach Ozonbehandlung mit durchschnittlich 16, 6%. Die klinisch relevanteren (intermediär vorkommende Resistenzen) und klinisch kritischen Resistenzgene (selten vorkommende Resistenzgene) nahmen jedoch nicht zu und wurden wie bereits beschrieben deutlich reduziert. So wurde das Resistenzgen *mcr-1*, welches eine Resistenz gegen das Reserveantibiotika Colistin vermittelt, unter das Detektionslimit reduziert. Die Sandfiltration hingegen erreicht hohe durchschnittliche Reduktionsleistungen von 99%. Insgesamt wurden nach der Ozonbehandlung 7 weitere mikrobiologisch-genetische Parameter durch die Sandfiltration unter die Nachweisgrenze reduziert.

Probekampagne 3 - 0,56 g Ozon/ g DOC

In Anlehnung an die Ergebnisbeschreibung zu Probenkampagne 1 erfolgte die Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse aus der Probenkampagne 3, die mit einer reduzierten Ozonkonzentration von 0,56 g Ozon /g DOC durchgeführt wurde. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren ebenfalls die Reinigungsleistungen der einzelnen Behandlungsstufen unter den vorliegenden Bedingungen an der Kläranlage, welche während den 24h der Probensammlung vorherrschten. Der Effekt von 0,56 g Ozon/ g DOC auf den Reduktionsprozess ist in Tabelle 8 aufgeführt. Die mittlere Reduktionsleistung aus dem Mittelwert aller untersuchten Parameter, über den gesamten Klärprozess inklusive erweiterter Abwasserbehandlungen (PN1- PN4) lag hier bei ca. 5 Log-Stufen. Damit war

die mittlere Reduktionsleistung des gesamten Klärprozesses (PN1-PN4) mit 0,56 g Ozon / g DOC eine Log-Stufe geringer als bei der Verwendung von 0,8 g Ozon/ g DOC.

Vergleichbar mit der Reduktionsleistung von Kampagne 1 ist in dieser Probenkampagne, nach Abschluss der gesamten Klärprozesses, die Mehrheit der untersuchten Parameter (13 von 19 Parametern) unter das Detektionslimit reduziert worden. Vergleichbar mit den Ergebnissen von Probenkampagne 1 konnten nach der Sandfiltration lediglich noch Vertreter der häufig vorkommenden Resistenzgene (*ermB*, *int1*, *blaTEM*, *sul1*) sowie Enterokokken als Vertreter der fakultativ pathogenen Bakterien nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Abundanz von fakultativ pathogenen Bakterien (Markergene) und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf der biologischen Klärung (Zulauf), Zulauf der Ozonung (Ablauf NKB) in Zelläquivalenten/ 100 mL sowie die prozentuale Reduktion der Kontaminationen die durch die biologische Klärung, Ozonbehandlung (0,56 g Ozon /g DOC) und Sandfiltration bei Kampagne 3 erreicht wurde.

0,56 g Ozon/ g DOC		Zulauf (PN1)	Zulauf Ozonung (PN2)		Reduktion durch 0,8 g Ozon/ g DOC	Reduktion durch Sandfiltration
Fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	8,15E+10	1,25E+08	99,846%	2,338%	84,046%
	Enterokokken	2,37E+07	1,60E+04	99,933%	81,474%	64,898%
	<i>E. faecalis</i>	2,30E+04	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1,53E+04	2,23E+02	98,539%	100,000%	-
	<i>K. pneumoniae</i>	4,52E+04	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>A. baumannii</i>	5,36E+06	4,23E+02	99,992%	78,480%	100,000%
	<i>E.coli</i>	2,37E+06	1,27E+03	99,946%	100,000%	-
häufig vorkommende Bakterien	<i>ermB</i>	1,00E+08	1,04E+04	99,990%	70,917%	88,922%
	<i>int1</i>	2,07E+08	3,24E+05	99,843%	-26,966%	62,276%
	<i>blaTEM</i>	3,59E+07	1,29E+04	99,964%	63,861%	76,625%
	<i>tetM</i>	8,25E+06	1,37E+03	99,983%	75,393%	100,000%
	<i>sul1</i>	6,29E+08	1,61E+06	99,744%	-38,115%	72,048%
intermediär vorkommende Resistenzen	<i>ctx-M</i>	1,52E+05	1,01E+02	99,934%	60,797%	100,000%
	<i>ctx-M-32</i>	1,94E+06	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>bla_{oxa}-48</i>	1,80E+05	0,00E+00	100,000%	-	-
selten vorkommende Resistenzgene	<i>vanA</i>	5,26E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>mcr-1</i>	8,56E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>mecA</i>	1,88E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>blaNDM</i>	5,63E+05	1,94E+02	99,966%	42,443%	100,000%

Bereits die biologische Klärung reduzierte die untersuchten Parameter um durchschnittlich 99,9%, wobei bereits 7 mikrobiologischen Parameter unter das Detektionslimit reduziert wurden. Vergleichbar mit Probenkampagne 1 konnte nach der Ozonbehandlung vereinzelte Parameter sogar in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Gesamtheit aller Bakterien, *int1*, *sul1*), sodass die durchschnittliche Reduktionsleistung der Ozonung bei lediglich 41,1% lag. Die beiden fakultativ pathogenen Bakterienspezies *P. aeruginosa* und *E. coli* konnten in dieser Kampagne erst durch die Ozonbehandlung mit 0,56 g Ozon/ g DOC unter das Detektionslimit reduziert werden. Die Sandfiltration erreichte mit einer durchschnittlichen Reduktionrate von 74,8 % eine signifikant höhere Reduktionsleistung wie die Ozonbehandlung mit 0,56 g Ozon/ g DOC. Durch dieses abschließende

Filtrationsverfahren konnte in der Probenahme auch *A. baumannii* und die Resistenzgene *tetM*, *ctx-M* und *blaNDM* unter das Detektionslimit reduziert werden.

Probenkampagne 5 & 6 - 0,5 g Ozon/ g DOC

Insgesamt wurden zwei Probenkampagnen mit einer Ozonkonzentration von 0,5 g Ozon/ g DOC durchgeführt.

Tabelle 9 zeigt die mittlere Reduktion bzw. Abundanz von beiden Probenahmen. Die Werte der einzelnen Probenahmen sind im Anhang 6.1 aufgeführt.

Die mittlere Reduktionsleistung der biologischen Klärung lag mit bis zu 4 Log-Stufen bei durchschnittlich 99,5% (Mittelwert aller untersuchten Parameter). Im Mittel konnte bei beiden Probenahmen (PN5 und PN6) lediglich 3 der 19 untersuchten mikrobiologisch-genetischen Parameter durch die biologische Klärung unter das Detektionslimit reduziert werden. Dies kann auf eine höhere Belastung des Zulaufes (PN1) und eventuellen Schwankungen der Aktivität der biologischen Klärung zugeführt werden. Durch die nachfolgende Ozonbehandlung mit 0,5 g Ozon/ g DOC konnten weitere 5 Parameter unter das Detektionslimit reduziert werden. Auch hier wie bereits in Probenkampagne 1 und 3 gezeigt, muss darauf hingewiesen werden, dass bereits nach der biologischen Klärung ein Teil der Resistenzgene bzw. Marker der fakultativ-pathogenen Bakterien eliminiert waren und daher eine Abwesenheit der Determinanten im Ablauf der Kläranlage nicht auf eine gezielte Wirkung durch Ozon zurückzuführen ist. Die Ozonbehandlung kommt dann zum Tragen, wenn es der Belebung nicht gelingt, einen Großteil der untersuchten Resistenzgen-Determinanten oder fakultativ-pathogenen Markern zurückzuhalten. Dies zeigte sich gerade in den Probenahmekampagnen 5 & 6.

Tabelle 9: Mittelwert der Abundanzen von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf der biologischen Klärung (Zulauf), Zulauf der Ozonung (Ablauf NKB) in Zelläquivalenten/ 100 mL sowie die prozentuale Reduktion der Kontaminationen die durch die biologische Klärung, Ozonunbehandlung und Sandfiltration bei Kampagne 5 und 6 erreicht wurde.

0,5 g Ozon/ g DOC Mischproben		Zulauf (PN1)	Zulauf Ozonung (PN2)		Reduktion durch 0,8 g Ozon/ g DOC	Reduktion durch Sandfiltration
Fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	3,55E+11	2,09E+09	99,413%	4,929%	85,393%
	Enterokokken	4,86E+07	1,95E+05	99,598%	80,261%	68,385%
	<i>E. faecalis</i>	7,20E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1,63E+05	7,52E+02	99,538%	73,593%	-557,785%
	<i>K. pneumoniae</i>	5,86E+04	1,51E+02	99,743%	100,000%	-
	<i>A. baumannii</i>	1,10E+06	5,83E+02	99,947%	59,039%	100,000%
	<i>E.coli</i>	9,26E+06	1,49E+04	99,839%	72,072%	82,509%
häufig vorkommende Bakterien	<i>ermB</i>	2,14E+08	8,90E+04	99,958%	36,485%	98,924%
	<i>int1</i>	6,90E+08	8,11E+06	98,825%	84,757%	-42,705%
	<i>blaTEM</i>	1,12E+08	1,34E+05	99,880%	22,799%	73,241%
	<i>tetM</i>	4,24E+07	5,96E+04	99,859%	96,399%	59,737%
	<i>sul1</i>	4,02E+09	6,97E+07	98,263%	15,997%	84,403%
intermediär vorkommende Resistenzen	<i>ctx-M</i>	2,38E+05	7,02E+02	99,705%	100,000%	-
	<i>ctx-M-32</i>	3,30E+06	1,18E+04	99,642%	-176,907%	75,276%
	<i>bla_{oxa}-48</i>	7,85E+05	2,70E+03	99,656%	100,000%	-
selten vorkommende Resistenzgene	<i>vanA</i>	9,75E+03	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>mcr-1</i>	3,90E+04	2,19E+02	99,439%	100,000%	-
	<i>mecA</i>	2,39E+04	0,00E+00	100,000%	-	-
	<i>blaNDM</i>	7,11E+05	5,22E+02	99,927%	100,000%	-

Weiterhin zeigt die Ozonbehandlung bei einem Parameter (*ctx-M*) eine Zunahme der Abundanz bzw. bei unterschiedlichen Parametern (Gesamtheit der Bakterien, *A. baumannii*, *ermB*, *blaTEM*, *sul1*) wurde nur in geringem Maße reduziert. Trotzdem konnten nach der Behandlung mit 0,5 g Ozon/ g DOC keine hygienisch kritischen Resistenzgene der selten vorkommenden Resistenzgene mehr detektiert werden. Aufgrund der z.T. sehr geringen Reduktionsleistung lag die durchschnittliche Reduktion aller Parameter durch die Ozonung bei 58,4%.

Durch die nachfolgende Sandfiltration konnte zusätzlich noch *A. baumannii* unter das Detektionslimit reduziert werden. *P. aeruginosa* und das Integrase Gen des Class 1 Integron *int1* lagen nach der Sandfiltration in höheren Konzentrationen vor als vor dem Prozess. Die durchschnittliche Reduktionsleistung der Sandfiltration lag bei 24,7%.

Zwischenfazit und Diskussion der Reduktionsleistungen

Eine Zusammenfassung der einzelnen Reinigungsverfahren von Probenkampagnen 1,3,5 und 6 ist in Tabelle 10 zu sehen. Trotz signifikanter Reduktionen konnten nicht alle untersuchten molekular- genetischen Parameter eliminiert werden und erreichen die Umwelt. Die mittlere Reduktionsleistung über den gesamten Klärprozess (PN1-PN4) lag

abhängig der Probenkampagne bei 99,929% (0,5 g Ozon/ g DOC) bis 99,998% (0,8 g Ozon/ g DOC).

Tabelle 10: Zusammenfassung der prozentualen Reduktion der einzelnen Reinigungsstufen während den unterschiedlichen Probekampagnen.

	Reduktion durch biol. Klärung		Reduktion durch Ozonbehandlung		Reduktion durch Sandfiltration		Reduktion über den gesamten Klärprozess	
	Prozentuale Reduktion	Anzahl eliminierter Parameter	Prozentuale Reduktion	Anzahl eliminierter Parameter	Prozentuale Reduktion	Anzahl eliminierter Parameter	Prozentuale Reduktion	Anzahl eliminierter Parameter
Kampagne 1 0,8g Ozon/ g DOC	99,130%	5	-16,627%	1	99,346%		99,998%	13/19
Kampagne 2 0,56 g Ozon/ g DOC	99,878%	7	41,062%	1	74,803%	4	99,989%	13/19
Kampagne 5+6 0,5g Ozon/ g DOC	99,538%		58,399%	5	24,723%	1	99,929%	9/19

Die Reduktionsleistung der biologischen Klärung liegt mit 99% in der erwarteten Größenordnung.

Die Reduktionsleistung der Ozonbehandlung lag mit -16 bis 58% deutlich unter der erwarteten Reduktion von 1,5 - 2 Log-Stufen wie sie in der Literatur von Ozonanlagen beschrieben werden, welche neben der Spurenstoffreduktion auch zur Reduktion mikrobiologischer Kontaminationen eingesetzt werden. Gründe hierfür können die Verwendung zu geringer Ozonkonzentrationen sein, aber auch Regrowth- Ereignissen oder Biofilmen innerhalb des Rohrsystems des Probenahmesystems oder dem Probenahmebehälter. Besonders nach Ozonung ist die Problematik des Regrowths in Literatur gut dokumentiert. Bakterien die durch die Ozonbehandlung zwar geschädigt, aber nicht direkt abgetötet werden, können nach einer kurzen Rekonvaleszenzzeit wieder aufwachsen und sich weiter vermehren. Auf die Auswirkungen des verwendeten Probenahmesystems wird im nachfolgenden Kapitel vertiefend eingegangen.

Weiterhin auffällig war die kontinuierliche Abnahme der Reduktionsleistung der Sandfiltration im Verlauf der Kampagnen. Betrug diese zu Beginn der Versuchsreihe im Januar 2022 noch für eine Sandfiltration sehr gute 99%, so nahm sie über den Verlauf des Jahres bis auf die durchschnittliche Reduktion während Kampagne 5 & 6 von 26% kontinuierlich ab. Da der Sandfilter Anfang des Jahres 2022 noch neu war, hat sich noch kein Biofilm ausgebildet. Dieser konnte sich erst im Laufe des Jahres etablieren, was zu einem stetigen Rückgang der Reduktionsleistung der Sandfiltration auf das erwartete Maß führte. Mit solch geringen mikrobiologischen Reduktionsleistungen ist bei Sandfiltern zu rechnen.

3.2. Einfluss des Probenahmesystems auf die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien in den Proben.

Aufgrund der Auffälligkeit bezüglich der sehr geringen Reduktionsleistung durch die Ozonbehandlung in PN1 und PN3 wurden zusätzlich zu den 24h-Mischproben, Schöpfproben als Stichproben ohne Verwendung des Leitungssystem der Probenahmesysteme, direkt aus dem Prozess entnommen. Durch den Vergleich der Abundanzen der Mischproben (mittels Probenahmesystem gezogene 24h Proben) mit den Stichproben (als Schöpfprobe aus dem Prozess entnommen) wird der Einfluss des Probenahme Prozesses auf die bakterielle Population deutlich. Der Fokus dieser Untersuchungen lag auf der Reduktionsleistung der Ozonung sowie Sandfiltration.

Die durchschnittliche Reduktion der Ozonbehandlung mit 0,5 g Ozon/ g DOC lag bei den Stichproben bei 92%, wobei ungleich den Mischproben kein Parameter in unzureichendem Maße (<70%) reduziert wurde (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittelwert der Abundanzen von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf der biologischen Klärung (Zulauf), Zulauf der Ozonung (Ablauf NKB) in Zelläquivalenten/ 100 mL sowie die prozentuale Reduktion der Kontaminationen die durch die biologische Klärung, Ozonunbehandlung und Sandfiltration bei den Stichproben der Kampagne 5 und 6 erreicht wurde.

Mittelwert 0,5 g Ozon/ g DOC Stichproben		Zulauf (PN1)	Ablauf NKB (PN2)		Reduktion durch 0,5 g Ozon/ g DOC	Reduktion durch Sandfiltration
Fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	3,55E+11	1,03E+09	99,710%	89,109%	-58,507%
	Enterokokken	4,74E+07	1,21E+05	99,744%	95,939%	45,366%
	E. faecalis	5,77E+03	1,43E+01	99,751%	100,000%	
	P. aeruginosa	1,22E+05	1,68E+02	99,862%	100,000%	
	K. pneumoniae	4,35E+04	2,33E+02	99,464%	100,000%	
	A. baumannii	7,53E+05	1,15E+03	99,847%	93,148%	100,000%
	E.coli	1,18E+07	2,21E+04	99,813%	91,972%	-180,263%
häufig vorkommende Bakterien	ermB	2,43E+08	7,43E+04	99,969%	85,909%	13,555%
	int1	1,45E+09	5,38E+06	99,628%	81,224%	-4,985%
	blaTEM	9,08E+07	2,24E+05	99,753%	90,619%	-65,610%
	tetM	4,71E+07	3,05E+04	99,935%	91,957%	-44,353%
	sul1	6,62E+09	4,94E+07	99,254%	81,366%	10,945%
intermediär vorkommende Resistenzgene	ctx-M	2,06E+05	5,67E+02	99,725%	100%	
	ctx-M-32	2,41E+06	3,67E+04	98,480%	77,479%	84,181%
	bla _{oxa} -48	1,76E+06	2,01E+03	99,886%	94,029%	-163,074%
selten vorkommende Resistenzgene	vanA	8,90E+03	0,00E+00	100,000%		
	mcr-1	1,67E+04	7,15E+01	99,573%	99,930%	100,000%
	mecA	1,27E+04	0,00E+00	100,000%		
	bla _{NDM}	5,42E+05	3,93E+02	99,928%	92,531%	100,000%

Die durchschnittliche Reduktionsleistung über den gesamten Klärprozess lag bei 99,98%, wobei hauptsächlich die Kategorie der häufig vorkommenden Resistenzgene und ausgewählte fakultativ pathogene Bakterien noch nachgewiesen werden konnten. Die Kategorie der selten vorkommenden Resistenzgene wurde vollständig eliminiert. Im Gegensatz zu den 24h Mischproben, konnte in den Stichproben bei der Ozonbehandlung mit 0,5 g Ozon/ g DOC eine Reduktionsleistung von mindestens 92% beobachtet werden (Mischproben: 58 %), während bei der Sandfiltration im Durchschnitt ein leichtes Wiederaufkeimen von 12% (Mischproben 24%) zu sehen war. Durch die Ozonung mit 0,5 g Ozon/ g DOC konnten in den Stichproben 6 der untersuchten Parameter eliminiert werden

Ein prozentualer Vergleich der einzelnen Parameter in den Mischproben und den Stichproben ist in Tabelle 12 dargestellt. Werte über 100% zeigen, dass in der Mischprobe höhere Abundanzen des jeweiligen Parameters nachgewiesen wurde, als in der Stichprobe. Ein solcher Effekt lässt auf ein Regrowth während der Probenahme und eine Besiedlung des Probenahmesystems mit Biofilm schließen.

Es zeigt sich, dass in den Mischproben von allen Probenahmestellen vereinzelte fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in höheren Abundanzen vorhanden sind als in den jeweiligen korrespondierenden Stichproben. Bei PN2- PN4 zeigte sich, dass die Abundanz von fakultativ pathogenen Bakterien sowie häufig vorkommende Resistenzgene

während der 24h Probenahme bis auf 1000% zunimmt. Besonders der Ablauf der Ozonbehandlung ist in der Mischprobe stärker kontaminiert als in der Stichprobe. Hier wurden in der Mischprobe 9 der untersuchten Parameter mit einer höheren Konzentration in der Mischprobe nachgewiesen als in der Stichprobe.

Besonders bedenklich ist die Zunahme der als hygienisch kritisch einzustufenden, selten vorkommenden Resistenzgene während der Mischprobenahme des Zulaufes der biologischen Klärung (PN1).

Tabelle 12: Prozentualer Vergleich der Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Kampagne 5 & 6: Werte über 100%: Mischprobe ist stärker kontaminiert als die Stichprobe.

	Zulauf (PN1)	Ablauf NKB (PN2)	Ablauf Ozonung mit 0,5 g Ozon/ g DOC (PN3)	Ablauf Sandfiltration (PN4)
Gesamtheit	82%	142%	1027%	99%
Enterokokken	54%	81%	391%	226%
<i>E. faecalis</i>	94%	0%	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	91%	1233%	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	201%	32%	-	-
<i>A. baumannii</i>	107%	25%	151%	-
<i>E. coli</i>	78%	47%	151%	8%
ermB	58%	123%	323%	4%
intl1	35%	116%	142%	116%
blaTEM	123%	60%	491%	79%
tetM	64%	127%	79%	121%
sul1	47%	100%	391%	63%
ctx-M	89%	62%	-	-
ctx-M-32	123%	16%	198%	309%
bla _{oxa} -48	61%	67%	0%	125%
vanA	176%	-	-	-
mcr-1	117%	153%	100%	100%
mecA	127%	-	-	-
blaNDM	136%	185%	-	-

Eine solche Diskrepanz zwischen unterschiedlichen Arten der Probenahme, wie beobachtet, kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einem spielt der Zeitpunkt Probenahme bei den Stichproben eine signifikante Rolle. Da bei Stichproben nur die aktuelle Situation des konkreten Zeitpunktes der Probennahme abgebildet werden kann, werden einzelne Ereignisse oder Zeiträume, in denen eine hohe Kontaminationslast die Kläranlage erreicht, nicht mit gefasst werden. Selbiges gilt für mögliche Regenereignisse, welche die Abundanzen der Kontaminationen in Relation zum Wasservolumen verändern.

Da es sich bei Bakterienpopulationen jedoch um dynamische Systeme handelt, die sich über die Zeit abhängig von ihren Umgebungsbedingungen verändern können, kann allerdings bei einer Mischprobe nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Kontamination der Probe während der längeren Probenahmezeit in Probebehältern ändert. So können sich einzelne Bakterienspezies selektiv vermehren, absterben oder ihre Resistenzgene über horizontalen Gentransfer weiterverbreiten. Weiterhin ermöglicht es Bakterien, welche durch

eine disruptive Reinigungsmethode (wie eine Ozonbehandlung) sub-letal geschädigt wurden, sich erholen und wieder aktiv werden.

Durch die durchgeführten Untersuchungen kann nicht festgelegt werden, welche der beiden oben beschriebenen Effekte verursachend für die höhere Kontamination in den Mischproben ist. Zur genaueren Abklärung der Ursache wären Untersuchungen des Probenahmesystems hinsichtlich potentieller Biofilmbildung und eine länger andauernde Probenahmekampagne mit vergleichbaren Betriebsparametern anzuraten.

Die Stichproben zeigen eine genauere Momentaufnahme der Kontamination zu einem Zeitpunkt, während die Mischproben ein ungenaueres Bild der Kontaminationslage über einen längeren Zeitraum zeigen.

3.3. Abundanz von Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien im Prozessverlauf der Kläranlage Tübingen auf Basis kulturbasierter Analysen

Fakultativ pathogene Bakterienspezies

Zusätzlich zu den taxonomischen Markern der molekularbiologischen Untersuchungen wurden noch intestinale Enterokokken, *Pseudomonas spp.*, fäkale Coliforme und *Acinetobacter spp.* mit kulturbasierten Methoden nachgewiesen. Der Unterschied zwischen den molekularbiologischen- und den kulturbasierten Untersuchungen liegt im Wesentlichen darin, dass mittels der Kulturverfahren bestätigt werden kann, dass die Zielorganismen intakt und im vermehrungsfähigen Zustand in der Probe vorhanden sind, während spezifische molekularbiologische Untersuchungen zeigen, ob ein bestimmtes taxonbezogenes Markergen in der Probe vorhanden ist, unabhängig, ob es sich in einem intakten Organismus, einem abgestorbenen Organismus befindet oder als freie DNA vorliegt. Durch die bei der Kultivierung vorgegebenen Parameter, ist es jedoch lediglich möglich, Spezies nachzuweisen, welche sich unter den jeweiligen Bedingungen vermehren lassen. Die mit kulturellen Verfahren nachgewiesenen Reduktionsleistungen während den einzelnen Probenahmen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Mittels Kulturverfahren detektierte prozentuale Reduktionsleistungen an fakultativ pathogenen Bakterien.

	intestinale Enterokokken	MRSA	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	fäcale Coliforme
Ablauf biol. Klärung	99,88%	93,03%	99,55%	96,33%	98,46%
0,8 g Ozon / g DOC	86,02%	49,70%	96,55%	66,67%	99,95%
Sandfiltration nach 0,8 g Ozon/ g DOC	99,88%	92,06%	99,35%	99,86%	99,91%
0,6 g Ozon/ g DOC	94,45%	72,05%	99,21%	95,31%	97,86%
Sandfiltration nach 0,6 g Ozon/ g DOC	92,08%	32,39%	45,74%	-671,01%	72,67%
0,56g Ozon/ g DOC	100,00%	48,39%	99,78%	99,59%	99,77%
Sandfiltration nach 0,56 g Ozon/ g DOC	100,00%	100,00%	-49,86%	-19,55%	46,30%
0,5 g Ozon / g DOC	95,79%	67,22%	-7,45%	91,39%	98,73%
Sandfiltration nach 0,5g Ozon/ g DOC	86,83%	86,49%	-442,11%	-153,84%	43,89%

Ein Großteil der nachgewiesenen fakultativ pathogenen Bakterien wurde bereits durch die biologische Klärung entfernt (96,3%-99,8%) und vergleichbar mit den Ergebnissen der molekularbiologische untersuchungen konnte nach der Ozonbehandlung eine speziesabhängige Varianz der Reduktionsleistungen beobachtet werden. So konnte mit einer Ozonkonzentration von 0,5 g Ozon/ g DOC im Durchschnitt über drei Probenahme-Kampagnen 98,7% aller fäkal Coliformen eliminiert werden, während bei gleicher Behandlung *Pseudomonas spp.* um 7% zunahm. Die Reduktionsleistung der Sandfiltration nahm, ebenfalls im Verlauf des Jahres und damit wohl auch mit dem Alter der Sandfiltrationsmaterials ab. Besonders auffällig hierbei war die Abundanz von *P. aeruginosa*, welche von einer Reduktion von 96% während der ersten Probennahme und einer vierfachen Zunahme der Kontamination in der letzten Probennahme schwankte. Auch hier kann das Wiederaufwachsen nach Sandfiltration mit einem Biofilmwachstum in der Filtereinheit durch *Pseudomonas spp.* erklären.

Resistente Bakterien

Der kulturelle Nachweis von MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) sowie ESBL (Extended Spectrum of Beta-Lactamase) Produzenten verdeutlicht, dass die mittels Molekularbiologie nachgewiesenen Resistenzgene auch in hygienisch relevanten Spezies kultivierbar vorliegen. Sowohl MRSA als auch ESBL-Bakterien konnten im Zulauf und während der Klärung mit durchschnittlich 10^5 (MRSA) und 10^4 Kolonie bildende Einheiten (KBE) in 100 mL nachgewiesen werden. Bereits durch die konventionelle Klärung wurde ein Großteil der MRSA- Bakterien reduziert, sodass diese nur noch in geringen Konzentrationen im Ablauf der Kläranlage nachgewiesen werden konnten (ca. 50 KBE / 100 mL). Die Ozonbehandlung hatte, ungeachtet der verwendeten Ozonkonzentration, einen untergeordneten Effekt auf die Reduktion von MRSA-Erregern.

ESBL- produzierende Bakterien wurden hingegen durch die Klärung vollständig aus dem Abwasserstrom entfernt. Auch hier zeigte sich, dass die abschließende Sandfiltration eine Reduktionsleistung durch die Ozonung unterstützt, so dass die ESBL-Erreger durch die Sandfiltration unter das Detektionsmittel reduziert wurden (vgl Tabelle 14). Bezüglich der ESBL-Erregern konnte die nachlassende Reduktionsleistung der Sandfiltration über den gesamten Versuchszeitraum nicht beobachtet werden. Weitere Ausdifferenzierung der ESBL Erreger zeigte, dass es sich hauptsächlich um *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter*

spp. und *Citrobacter* spp. (KEC- group) handelt sowie vereinzelt ESBL produzierende *A. baumannii* nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 14: Mittels Kulturverfahren detektierte prozentuale Reduktionsleistungen an ESBL-Erregern.

	<i>E. coli</i>	KEC	<i>Proteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Ablauf biol. Klärung	-130,86%	-18,12%	-	-	-
0,8 g Ozon / g DOC	30,00%	63,64%	-	-	-
Sandfiltration nach 0,8 g Ozon/ g DOC	61,69%	92,19%	-	-	100,00%
0,6 g Ozon/ g DOC	90,57%	80,00%	-	-	-
Sandfiltration nach 0,6 g Ozon/ g DOC	100,00%	100,00%	-	-	100,00%
0,56g Ozon/ g DOC	89,47%	80,00%	-	-	-
Sandfiltration nach 0,56 g Ozon/ g DOC	100,00%	100,00%	-	-	-
0,5 g Ozon / g DOC	87,69%	71,20%	-	-	-
Sandfiltration nach 0,5g Ozon/ g DOC	100,00%	100,00%	-	-	-

4. Fazit

Die untersuchte Kläranlagen Tübingen mit der technischen Erweiterung einer Ozonung und Sandfiltration zeigte aus mikrobiologischer Sicht gute Reduktionsleistungen hinsichtlich fakultativ pathogener Bakterien und klinisch relevanter Antibiotikaresistenzgenen. 99,9% bis 99,99% der 19 untersuchten mikrobiologischen Parameter (fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene) konnten durch die Kläranlage zuverlässig entfernt werden. Besonders klinisch kritische Resistenzgene, welche Resistenzen gegen Reserveantibiotika der Humanmedizin vermitteln (*vanA*, *mcr-1*, *mecA*, *blaNDM*), wurden vollständig aus dem Abwasser entfernt und konnten im Ablauf der Kläranlage nicht mehr nachgewiesen werden. Auch die fakultativ pathogenen Bakterien *E. faecalis*, *K. pneumoniae* und *A. baumannii* konnten im Ablauf der Kläranlage nicht mehr detektiert werden. Die im Fokus der Öffentlichkeit liegenden ESBL produzierenden sowie MRSA Erreger konnten effektiv reduziert werden. Insbesondere ESBL Erreger wurden in allen Probenkampagnen vollständig aus dem Abwasserstrom entfernt.

Unabhängig von den verwendeten Ozonkonzentrationen zeigte die oxidative Behandlung des Abwassers eine Reduktionsleistung von über 90%. Die Art der Probenahme hatte hierbei einen signifikanten Einfluss auf die beobachteten Reduktionsleistungen. Es zeigte sich bei einem Vergleich von Stichproben zu 24h- Mischproben, dass durch die Maßnahme der Mischprobenahme signifikant höhere Abundanzen nachgewiesen werden konnten als bei Stichproben. Die Ursache der unterschiedlichen Abundanz kann zurzeit nicht genau festgelegt werden (Regrowth, Biofilm oder Kontaminationsspitzen). Jedoch sind zur Bewertung der Reduktionsleistungen der einzelnen Verfahren Stichproben besser geeignet.

Die Sandfiltration zeigte zu Beginn der Untersuchungen mit 99% sehr gute Reduktionsleistungen, welche über den Verlauf des Probenahmejahres jedoch bis auf 24% bis hin zu leichten Zunahmen der bakteriellen Abundanzen abfielen. Die Reduktionsleistungen bzw. leichtes Wiederaufkeimen der bakteriellen Kontaminationen während der Sandfiltration ist bereits bekannt und bereits umfassend in der Literatur beschrieben. Die anfänglich überraschenden, hohen Reduktionsleistungen sind vermutlich auf die geringe Laufzeit der Sandfiltration zurückzuführen. Mit zunehmendem Alter siedeln sich unterschiedliche Bakterien und Biofilme innerhalb der Sandfiltration an, welche zwar beim Abbau organischer und chemischer Kontaminationen hilfreich sein können, die mikrobiologische Reduktionsleistung jedoch stark vermindern. Die in Probenkampagne 5 & 6 beobachteten geringeren Reduktionleistungen sind charakteristisch für Sandfiltrationen.

Zusammenfassend ist aus mikrobiologischer Sicht die Erweiterung der Kläranlage mit einer Ozonbehandlung und nachfolgender Sandfiltration effektiv umgesetzt. Mikrobiologische Kontaminationen werden verstärkt reduziert und besonders klinisch relevante Resistenzgene werden vollständig eliminiert und erreichen nicht die Umwelt.

5. Literaturverzeichnis

- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., Schwartz, T., 2015. Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Sci. Total Environ.* 512–513, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.046>
- Clifford, R.J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D. V., Kwak, Y.I., Waterman, P.E., Lesho, E.P., Mc Gann, P., 2012. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS One* 7, 7–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048558>
- Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P., 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5857–5860. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5857-5860.2004>
- Eliopoulos, G.M., Maragakis, L.L., Perl, T.M., 2008. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1254–1263.
- Emery, C.L., Weymouth, L.A., 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2061–2067. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2061-2067.1997>
- Frahm, E., Obst, U., 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J. Microbiol. Methods* 52, 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00150-1)
- Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S.M., Su, X., 2012. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *J. Colloid Interface Sci.* 368, 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.015>
- Hassani, M., 2014. The Crisis of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: Is there any Hope for ESKAPE? *Clin. Res. Infect. Dis.* 1, 1005.
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T., Schwartz, T., 2017. Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>
- Klein, G., Pack, A., Reuter, G., 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1825–1830. <https://doi.org/10.1128/aem.64.5.1825-1830.1998>
- Kommission, E. Der, Krinko, I., 2018. Hygienemaßnahmen zur prävention der infektion durch enterokokken mit speziellen antibiotikaresistenzen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 61, 1310–1361. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2811-2>
- Lepper, P.M., Grusa, E., Reichl, H., Högel, J., Trautmann, M., 2002. Consumption of imipenem correlates with β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2920–2925. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2920-2925.2002>
- Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C.C., Kubasek, C., Silbert, S., 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 906–909. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>

- National reference center for surveillance of nosokomial infections, 2016. Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016, NRZ-National reference center for surveillance of nosokomial infections. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen.
- Neuhauser, M.M., Weinstein, R.A., Rydman, R., Danziger, L.H., Karam, G., Quinn, J.P., 2003. Antibiotic Resistance among Gram-Negative Bacilli in US Intensive Care Units: Implications for Fluoroquinolone Use. *J. Am. Med. Assoc.* 289, 885–888. <https://doi.org/10.1001/jama.289.7.885>
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M., 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 19, 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005>
- Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S., Graham, D.W., 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environ. Microbiol.* 9, 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01123.x>
- Poirel, L., Potron, A., Nordmann, P., 2012. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1597–1606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>
- Rocha, J., Cacace, D., Kampouris, I., Guilloteau, H., Jäger, T., Marano, R.B.M., Karaolia, P., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Berendonk, T.U., Schwartz, T., 2018. Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *J. Environ. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.022>
- Skov, R.L., Monnet, D.L., 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): Three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance* 21, 30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
- Soledad Ramírez, M., Pineiro, S., Centron, D., 2009. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology Downloaded from <http://aac.asm.org/> on June 12 , 2016 by guest. *Microb. Agents Chemother.* 54, 699–706.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U., 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>
- Walsh, T.R., 2010. Emerging carbapenemases: A global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, S8. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
- Xia, R., Ren, Y., Guo, X., Xu, H., 2013. Molecular diversity of class 2 integrons in antibiotic-resistant gram-negative bacteria found in wastewater environments in China. *Ecotoxicology* 22, 402–414. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1034-9>

6. Anhang

6.1. Mittels molekularbiologischer Methoden detektierte Abundanzen pro 100 mL an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen der einzelnen Probenahmen bei Mischproben

Kampagne 1

Tabelle 15: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 1. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

100 mL	PN1- 24.01.2022	PN2- 24.1.2022	PN3- 24.01.2022	PN4- 24.01.2022
Gesamtheit	4,37E+10	7,78E+07	1,45E+08	3,25E+05
Enterokokken	1,63E+07	5,28E+05	1,41E+04	3,23E+01
<i>E. faecalis</i>	3,65E+03	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,88E+04	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	2,29E+04	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	1,12E+06	9,43E+01	1,00E+02	0
<i>E. coli</i>	1,57E+06	1,31E+03	9,31E+02	0
ermB	3,73E+07	1,02E+04	3,54E+04	4,43E+01
intl1	2,65E+08	7,08E+05	1,15E+06	1,66E+04
blaTEM	1,31E+07	1,04E+04	5,47E+03	3,22E+02
tetM	6,97E+06	2,58E+03	7,69E+03	0
sul1	6,56E+08	4,02E+06	1,05E+07	6,35E+04
ctx-M	6,55E+04	6,09E+03	7,68E+01	0
ctx-M-32	1,02E+06	6,59E+02	4,53E+02	0
bla _{oxa} -48	1,93E+05	0	0	0
vanA	3,00E+03	0	0	0
mcr-1	1,51E+04	7,95E+01	0	0
mecA	1,94E+03	3,93E+01	2,52E+01	0
blaNDM	2,91E+05	2,21E+02	2,47E+01	0

Kampagne 3

Tabelle 16: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 3. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

pro 100 mL	PN1- 04.05.2022	PN2- 04.05.2022	PN3- 04.05.2022	PN4- 04.05.2022
Gesamtheit	8,15E+10	1,25E+08	1,22E+08	1,95E+07
Enterokokken	2,37E+07	1,60E+04	2,96E+03	1,04E+03
<i>E. faecalis</i>	2,30E+04	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,53E+04	2,23E+02	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	4,52E+04	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	5,36E+06	4,23E+02	9,10E+01	0
<i>E. coli</i>	2,37E+06	1,27E+03	0	0
ermB	1,00E+08	1,04E+04	3,04E+03	3,37E+02
intl1	2,07E+08	3,24E+05	4,11E+05	1,55E+05
blaTEM	3,59E+07	1,29E+04	4,67E+03	1,09E+03
tetM	8,25E+06	1,37E+03	3,37E+02	0

sul1	6,29E+08	1,61E+06	2,22E+06	6,21E+05
ctx-M	1,52E+05	1,01E+02	3,95E+01	0
ctx-M-32	1,94E+06	0	0	0
bla _{oxa} -48	1,80E+05	0	0	0
vanA	5,26E+03	0	0	0
mcr-1	8,56E+03	0	0	0
mecA	1,88E+03	0	0	0
bla _{NDM}	5,63E+05	1,94E+02	1,12E+02	0

Kampagne 5

Tabelle 17: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 5. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

	M1-27-07-22	M2-27.07.22	M3-27.07.22	M4-27.07.22
Gesamtheit	3,55E+11	2,09E+09	1,98E+09	2,90E+08
Enterokokken	4,86E+07	1,95E+05	3,86E+04	1,22E+04
<i>E. faecalis</i>	7,20E+03	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,63E+05	7,52E+02	1,99E+02	1,31E+03
<i>K. pneumoniae</i>	5,86E+04	1,51E+02	0	0
mecA	2,39E+04	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	1,10E+06	5,83E+02	2,39E+02	0,00E+00
<i>E. coli</i>	9,26E+06	1,49E+04	4,16E+03	7,27E+02
bla _{NDM}	7,11E+05	5,22E+02	0	0
ctx-M	2,38E+05	7,02E+02	0	8,43E+01
ctx-M-32	3,30E+06	1,18E+04	3,26E+04	8,07E+03
ermB	2,14E+08	8,90E+04	5,65E+04	6,08E+02
intI1	6,90E+08	8,11E+06	1,24E+06	1,76E+06
bla _{oxa} -48	7,85E+05	2,70E+03	0	7,90E+02
tetM	4,24E+07	5,96E+04	2,15E+03	8,64E+02
vanA	9,75E+03	0	0	0
bla _{TEM}	9,45E+07	2,01E+05	1,76E+05	2,54E+04
sul1	4,02E+09	6,97E+07	5,86E+07	9,14E+06
mcr-1	3,90E+04	2,19E+02	0	0

Kampagne 6

Tabelle 18: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 6. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

	M1 - 18.10.22	M2 - 18.10.22	M3 - 18.10.22	M4 - 18.10.22
Gesamtheit	2,29E+11	8,52E+08	3,25E+08	6,48E+07
Enterokokken	2,21E+06	1,57E+03	3,00E+01	1,37E+01
<i>E. faecalis</i>	3,66E+03	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	6,02E+04	3,39E+03	1,57E+02	0,00E+00
<i>K. pneumoniae</i>	1,17E+05	0	0	0

<i>mecA</i>	8,39E+03	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	5,16E+05	0	0	0
<i>E. coli</i>	9,06E+06	5,70E+03	1,21E+03	2,81E+01
<i>blaNDM</i>	7,60E+05	9,32E+02	0,00E+00	4,18E+02
<i>ctx-M</i>	1,29E+05	0	0	0
<i>ctx-M-32</i>	2,63E+06	0	0	0
<i>ermB</i>	6,56E+07	9,41E+04	1,12E+04	4,58E+01
<i>intI1</i>	3,22E+08	4,32E+06	1,62E+06	7,04E+05
<i>bla_{oxa}-48</i>	1,38E+06	0	0	0
<i>tetM</i>	1,77E+07	1,77E+04	1,73E+03	7,71E+03
<i>vanA</i>	2,16E+04	0	0	0
<i>blaTEM</i>	1,28E+08	6,72E+04	3,12E+04	2,99E+04
<i>sul1</i>	2,17E+09	2,93E+07	1,34E+07	1,26E+06
<i>mcr-1</i>	0,00E+00	0	0	0

6.1. Mittels molekularbiologischen Methoden detektierte Abundanzen pro 100 mL an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen der einzelnen Probenahmen bei Stichproben

Tabelle 19: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 5. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

	S1- 27.07.22	S2- 27.07.22	S3- 27.07.22	S4- 27.07.22
Gesamtheit	3,77E+11	1,45E+09	1,57E+08	7,05E+07
Enterokokken	9,39E+07	2,40E+05	9,66E+03	4,13E+03
<i>E. faecalis</i>	1,06E+04	2,87E+01	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,25E+05	3,36E+02	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	4,81E+04	2,94E+02	0	0
<i>A. baumannii</i>	1,02E+06	1,66E+03	1,58E+02	0
<i>E. coli</i>	1,26E+07	2,98E+04	2,76E+03	6,47E+02
<i>ermB</i>	4,46E+08	9,15E+04	1,17E+04	5,30E+02
<i>intI1</i>	2,20E+09	8,69E+06	1,09E+06	5,54E+05
<i>blaTEM</i>	1,22E+08	4,25E+05	3,18E+04	1,05E+04
<i>tetM</i>	7,61E+07	6,10E+04	4,91E+03	4,51E+02
<i>sul1</i>	9,78E+09	8,41E+07	1,07E+07	6,71E+06
<i>ctx-M</i>	3,04E+05	9,65E+02	0	0
<i>ctx-M-32</i>	9,88E+05	5,84E+04	1,65E+04	6,53E+02
<i>bla_{oxa}-48</i>	4,66E+05	3,02E+03	2,41E+02	4,30E+02
<i>vanA</i>	8,26E+03	0	0	0
<i>mcr-1</i>	2,65E+04	1,43E+02	0,00E+00	0,00E+00
<i>mecA</i>	7,83E+03	0	0	0
<i>blaNDM</i>	4,61E+05	2,48E+02	5,87E+01	0

Tabelle 20: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in 100 mL Probe aus Probenkampagne 6. Der Nachweis erfolgte mittels Molekularbiologie (qPCR).

	S1 - 18.10.22	S2 - 18.10.22	S3 - 18.10.22	S4- 18.10.22
Gesamtheit	3,33E+11	6,12E+08	6,82E+07	2,86E+08
Enterokokken	1,01E+06	2,95E+03	2,02E+02	1,26E+03
<i>E. faecalis</i>	9,61E+02	0,00E+00	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1,19E+05	0,00E+00	0	5,90E+02
<i>K. pneumoniae</i>	3,89E+04	1,73E+02	0	0
<i>mecA</i>	1,76E+04	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	4,87E+05	6,50E+02	0	0,00E+00
<i>E. coli</i>	1,10E+07	1,44E+04	7,95E+02	9,31E+03
blaNDM	6,23E+05	5,38E+02	0,00E+00	0,00E+00
ctx-M	1,09E+05	1,69E+02	8,74E+01	1,61E+02
ctx-M-32	3,84E+06	1,49E+04	0,00E+00	1,96E+03
ermB	3,87E+07	5,71E+04	9,27E+03	1,76E+04
intl1	6,97E+08	2,06E+06	9,33E+05	1,57E+06
bla _{oxa} -48	3,06E+06	1,01E+03	0,00E+00	2,03E+02
tetM	1,82E+07	0	0	6,63E+03
vanA	9,54E+03	0	0	0
blaTEM	5,97E+07	2,40E+04	1,03E+04	5,93E+04
sul1	3,45E+09	1,47E+07	7,66E+06	9,68E+06
mcr-1	6,95E+03	0	0	0

6.2. Mittels selektiver Kulturverfahren nachgewiesene Abundanzen von fakultativ pathogenen Bakterien und ESBL tragende Spezies.

Tabelle 21: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 1. Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren. TMTC: „Too much to count“; nicht auswertbar.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	<i>E. coli</i>	KEC	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
PN1	1,96E+06	7,44E+04	TMTC	1,46E+06	1,00E+07	3,00E+03	6,50E+03	0,00E+00	1,00E+02
PN2	1,86E+03	1,67E+02	7,40E+03	4,00E+02	6,30E+05	1,00E+03	1,10E+03	0,00E+00	0,00E+00
PN3	2,59E+02	8,40E+01	2,55E+02	1,33E+02	3,10E+02	7,00E+02	4,00E+02	1,00E+02	4,00E+02
PN4	4,00E+00	5,25E+01	8,00E+01	5,50E+00	6,45E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 22: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 2. Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	<i>E. coli</i>	KEC	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
PN1	1,82E+06	1,60E+03	6,10E+06	8,95E+05	1,62E+07	2,77E+03	6,40E+03	0,00E+00	1,00E+02
PN2	2,28E+03	1,27E+02	3,99E+04	1,23E+03	1,40E+04	1,06E+03	5,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN3	1,26E+02	3,55E+01	3,13E+02	5,75E+01	3,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	1,00E+02
PN4	1,00E+01	2,40E+01	1,70E+02	4,43E+02	8,20E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 23: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 3. Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	<i>E. coli</i>	KEC	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
PN1	1,28E+07	3,06E+04	6,80E+06	3,37E+06	7,00E+06	1,70E+03	2,37E+04	0,00E+00	1,04E+04
PN2	0,00E+00	1,55E+01	5,29E+04	5,40E+04	5,45E+04	3,80E+03	5,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN3	2,68E+03	8,00E+00	1,17E+02	2,20E+02	1,26E+02	4,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN4	0,00E+00	#DIV/0!	1,75E+02	2,63E+02	6,77E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 24: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 4. Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	<i>E. coli</i>	KEC	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
PN1	2,94E+06	4,30E+05	0,00E+00	2,79E+06	1,26E+07	6,20E+03	8,80E+03	0,00E+00	5,40E+03
PN2	5,13E+03	3,45E+02	6,17E+04	2,25E+03	7,29E+04	1,55E+03	4,50E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN3	1,04E+02	4,60E+01	5,20E+02	4,50E+01	5,30E+02	1,50E+02	1,00E+02	0,00E+00	3,00E+02
PN4	1,60E+01	8,00E+00	3,13E+02	3,02E+02	1,63E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 25: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 5. Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	<i>E. coli</i>	KEC	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
PN1	2,80E+06	7,03E+04	1,54E+04	1,00E+04	6,00E+06	5,23E+03	3,00E+02	0,00E+00	2,55E+03
PN2	8,45E+03	1,25E+02	1,50E+02	1,88E+03	6,55E+04	3,40E+03	1,97E+03	0,00E+00	0,00E+00
PN3	2,35E+02	8,00E+01	4,80E+02	4,25E+02	1,71E+03	7,00E+02	7,00E+02	1,00E+02	3,00E+02
PN4	3,15E+01	1,85E+01	7,40E+03	3,00E+02	1,22E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 26: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 6 (Mischprobe). Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	E. coli	KEC	P.aeruginosa	A.baumannii
PN1	5,34E+06	3,00E+02	1,96E+07	9,50E+05	1,80E+07	1,50E+02	3,30E+03	0,00E+00	0,00E+00
PN2	8,95E+02	1,00E+02	5,69E+04	1,29E+04	7,13E+04	1,50E+03	7,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN3	7,00E+01	2,10E+01	8,65E+02	1,58E+02	3,45E+02	1,00E+02	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN4	7,50E+00	#DIV/0!	2,11E+02	3,30E+01	2,29E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabelle 27: Abundanzen von fakultativ Pathogenen Bakterien und ESBL resistenten Spezies in 100 mL Probe aus Probenkampagne 6 (Stichprobe). Der Nachweis erfolgte mittels selektiver Kulturverfahren.

	Mittels Selektivplatten nachgewiesene Spezies					Auf ESBL-selektivplatten nachgewiesene Spezies			
	intestinale Enterokokken	MRSA	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	fäcale Coliforme	E. coli	KEC	P.aeruginosa	A.baumannii
PN1	6,40E+06	1,40E+03	6,80E+06	3,05E+05	8,05E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
PN2	1,30E+03	2,00E+01	5,36E+04	1,16E+02	5,24E+04	2,30E+03	7,00E+02	0,00E+00	0,00E+00
PN3	7,20E+03	1,50E+01	0,00E+00	2,00E+04	1,69E+04	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
PN4	7,41E+02	3,36E+03	1,42E+04	2,82E+03	1,17E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Spurenstoffmessergebnisse - Liste B

Sollwert SAK254			m ⁻¹	40	40	30	30	30	40	
Istwert SAK254 Sonde			m ⁻²	49	45	34	40	31	38	
Istwert SAK254 Photometer			m ⁻³	43	44	38	38	36	45	
spezifische Ozondosis				0,8	0,59	0,53	0,51	0,49	0,65	
Spurenstoffe			BG	Einheit						Zulauf KA
Probenahme				PN1	PN2	PN3	PN4	PN 5	PN6	
Ibuprofen	0,025	µg/l		15	18	12	13	12	39	
Metoprolol	0,025		0,69	0,63	0,67	0,58	0,8	1,2		
Carbamazepin	0,025		0,22	0,16	0,18	0,2	0,26	0,21		
Diclofenac	0,025		0,66	2	1,9	2,2	1,6	2,2		
Sulfamethoxazol	0,025		1	0,78	0,83	0,84	0,79	1,2		
Hydrochlorothiazid	0,05		1,4	1	1,1	1,1	1,3	1		
Candesartan	0,05		1,5	1,5	1,4	1,7	1,4	1,9		
Irbesartan	0,05		0,56	0,58	0,54	0,56	0,63	0,46		
Benzotriazol	0,05		23	24	7,9	14	8,8	13		
Tolyltriazol	0,05		2,2	1,9	1,3	4,6	2,2	1,6		
Spurenstoffe			BG	Einheit						Ablauf NKB Zulauf Ozon
Probenahme				PN1	PN2	PN3	PN4	PN 5	PN6	
Ibuprofen	0,025	µg/l		< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	
Metoprolol	0,025		0,47	0,35	0,4	0,37	0,41	0,32		
Carbamazepin	0,025		0,26	0,2	0,2	0,22	0,19	0,2		
Diclofenac	0,025		0,49	0,95	1,2	1,5	1,1	1,1		
Sulfamethoxazol	0,025		0,51	0,37	0,47	0,53	0,97	0,81		
Hydrochlorothiazid	0,05		1	0,82	0,87	0,96	0,89	0,95		
Candesartan	0,05		1,6	1,4	1,2	1,4	1,4	1,5		
Irbesartan	0,05		0,78	0,42	0,49	0,42	0,42	0,46		
Benzotriazol	0,05		1,2	6,6	7,3	6,8	6	4,9		
Tolyltriazol	0,05		2,3	1,2	1,2	2,1	1,6	0,86		
Spurenstoffe			BG	Einheit						Ablauf Ozon
Probenahme				PN1	PN2	PN3	PN4	PN 5	PN6	
Ibuprofen	0,025	µg/l		< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	
Metoprolol	0,025		0,09	0,08	0,13	0,17	0,16	0,04		
Carbamazepin	0,025		< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025		
Diclofenac	0,025		< 0,025	< 0,025	< 0,025	0,03	0,06	< 0,025		
Sulfamethoxazol	0,025		< 0,025	< 0,025	0,03	0,04	0,07	< 0,025		
Hydrochlorothiazid	0,05		0,11	0,065	0,11	0,2	0,26	0,077		
Candesartan	0,05		0,42	0,37	0,44	0,54	0,57	0,28		
Irbesartan	0,05		0,22	0,14	0,19	0,16	0,17	0,091		
Benzotriazol	0,05		3,3	3,6	3,3	5,4	2,5	1,2		
Tolyltriazol	0,05		0,45	0,39	0,47	1,1	0,65	0,18		
Spurenstoffe			BG	Einheit						Ablauf Sandfilter
Probenahme				PN1	PN2	PN3	PN4	PN 5	PN6	
Ibuprofen	0,025	µg/l		< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	
Metoprolol	0,025		0,11	0,07	0,13	0,16	0,1	0,06		
Carbamazepin	0,025		< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025		
Diclofenac	0,025		< 0,025	< 0,025	< 0,025	0,03	0,05	< 0,025		
Sulfamethoxazol	0,025		< 0,025	< 0,025	0,03	0,05	0,04	< 0,025		
Hydrochlorothiazid	0,05		0,18	0,05	0,12	0,21	0,22	0,089		
Candesartan	0,05		0,56	0,37	0,46	0,55	0,53	0,29		
Irbesartan	0,05		0,23	0,14	0,19	0,17	0,12	0,096		
Benzotriazol	0,05		3,8	2,1	2,8	4,6	2,9	1		
Tolyltriazol	0,05		0,52	0,34	0,42	0,84	0,74	0,21		

Spurenstoffmesswerte Liste A

Spurenstoffmesswerte Liste A		Vergleichsmessung 1		Vergleichsmessung 2		Vergleichsmessung 3		Vergleichsmessung 4				Vergleichsmessung 5				Vergleichsmessung 6			
		10.07. - 12.07.2018		05.06. - 07.06.2018		14.05.-16.05.2019		30.05. - 01.06.2023				7.05. - 9.05.2024				21.09 - 22.09. 2024			
		von 00 ⁰⁰ bis 24 ⁰⁰ Uhr		von 00 ⁰⁰ bis 24 ⁰⁰ Uhr		von 0 ⁰⁰ bis 24 ⁰⁰ Uhr		von 0 ⁰⁰ bis 24 ⁰⁰ Uhr				von 0 ⁰⁰ bis 24 ⁰⁰ Uhr				800 - 800			
		Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Ablauf Ozon _{mf}	Ablauf Filter _{mf}	Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Ablauf Ozon _{mf}	Ablauf Filter _{mf}	Zulauf _{mf}	Ablauf NKB _{mf}	Ablauf Ozon _{mf}	Ablauf Filter _{mf}
		[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]		[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]		[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	
Arzneimittelrückstände	Ibuprofen	14	< 0,0125	16	< 0,0125	14	0,17	22	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	16	0,03	< 0,0125	< 0,0125	6,8	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125
	Metoprolol	0,65	0,43	0,87	0,49	0,82	0,82	0,74	0,46	0,16	0,19	0,58	0,25	0,08	0,09	0,5	0,4	0,1	0,2
	Carbamazepin	0,32	0,32	0,36	0,44	0,25	0,28	0,14	0,21	< 0,0125	< 0,0125	0,14	0,18	< 0,0125	< 0,0125	0,2	0,2	< 0,0125	< 0,0125
	Diclofenac	1,4	1,1	2,1	1,80	1,8	1,3	1,6	2	< 0,0125	0,04	1,6	1,20	< 0,0125	< 0,0125	1,4	1,0	< 0,0125	0,1
	Sulfamethoxazol	1,5	0,76	1,3	0,97	1,5	0,39	0,83	0,81	0,07	0,08	0,67	0,90	0,04	0,04	1,0	1,6	0,1	0,1
	Metabolit DHH	0,61	0,56	0,99	0,99	0,68	0,64	0,7	0,61	0,33	0,21	0,57	0,53	0,27	0,28	0,6	0,5	0,3	0,3
	Gabapentin	6,0	4,1	7,6	2,90	5,4	3,4	11	3	0,7	0,79	6,4	1,10	0,65	0,61	10,0	1,0	0,1	0,4
	Metformin	61	0,45	92	0,93	72	0,31	14	1,1	0,95	0,89	86	0,21	0,22	0,22	100,0	0,2	0,4	0,2
	Guanylharnstoff	41	20	260	8,30	160	55	3,2	24	17	3,4	9,8	25,00	25,00	1,10	5,0	19,0	0,1	1,0
	Erythromycin A	0,070	0,070	0,12	0,12	0,13	0,11	0,09	0,07	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	0,1	0,1	< 0,0250	< 0,0250
	Dehydrato-Erythromycin A	0,14	0,14	0,05	0,04	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250	< 0,0250
	Clarithromycin	0,35	0,30	0,23	0,30	0,11	0,18	0,16	0,11	< 0,0125	< 0,0125	0,11	0,05	< 0,0125	< 0,0125	0,2	0,1	< 0,0125	< 0,0125
	Azithromycin	0,070	0,060	0,22	0,28	0,19	0,23	0,29	0,32	< 0,0250	< 0,0250	0,26	0,18	< 0,0250	< 0,0250	0,3	0,5	< 0,0250	0,1
	Ciprofloxacin	0,84	0,14	1,2	0,13	0,47	0,044	0,35	0,061	< 0,0125	< 0,0125	0,51	0,05	< 0,0125	< 0,0125	0,3	0,1	< 0,0125	< 0,0125
	Hydrochlorothiazid	1,8	1,6	3,3	3,00	2	1,6	1,1	0,86	0,26	0,32	0,95	0,91	0,19	0,20	0,8	0,8	0,3	0,3
	Candesartan	0,94	0,89	1,5	1,60	1,3	1,2	1,7	1,7	0,73	0,62	3,3	1,50	0,51	0,48	1,5	1,6	0,6	0,7
	Irbesartan	0,67	0,59	0,78	0,69	0,61	0,54	0,54	0,49	0,17	0,22	0,40	0,40	0,10	0,10	0,4	0,4	0,1	0,2
	Bezafibrat	0,27	< 0,0125	0,3	0,09	0,26	0,03	0,12	0,03	< 0,0125	0,33	0,12	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	0,1	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125
Röntgenkontrastmittel	Amidotrizesäure	7,6	3,8	14	9,500	9,6	3,7	2,8	1,2	2	1,9	2,10	1,40	1,20	1,40	1,2	1,7	2,7	1,7
	Iohexol	1,3	0,040	0,74	0,030	0,39	0,07	0,81	0,47	0,36	0,41	0,11	0,15	0,10	0,10	0,3	0,2	0,1	0,2
	Iomeprol	150	21	200	26,000	120	33	120	30	30	12	41,0	13,0	8,7	9,8	21,0	38,0	7,5	21,0
	Iopromid	14	1,2	51	4,600	30	7,4	77	42	13	12	40,0	11,0	7,8	8,3	18,0	25,0	2,3	12,0
	Iopamidol	0,13	0,060	0,33	0,170	0,3	0,03	< 0,0125	0,03	< 0,0125	< 0,0125	0,07	0,07	0,06	0,07	< 0,0125	0,04	0,08	0,03
Estrogene	17-alpha-Ethinylestradiol	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005
	17-beta-Estradiol	0,010	< 0,00005	0,009	0,0002	0,02	0,0001	0,01	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00020	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005	0,02	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005
	Estron	0,080	0,002	0,03	0,001	0,04	0,001	0,04	0,0005	0,0002	< 0,00005	0,003	< 0,00005	< 0,00005	< 0,00005	0,0700	0,0002	< 0,00005	< 0,00005
Pestizide	Carbendazim	0,060	0,040	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125
	Mecoprop	< 0,0125	0,040	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125
	DEET	1,2	0,070	0,270	< 0,0125	0,7	0,07	0,98	0,47	0,21	0,24	0,47	0,18	0,10	0,10	1,50	0,04	< 0,0125	0,03
	Terbutryn	0,080	0,040	0,040	0,03	0,06	0,04	0,06	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	< 0,0125	0,03	< 0,0125	< 0,0125
Benzotriazole	Benzotriazol	25	12	27	14	34	24	7,3	7,4	2,4	2,2	4,40	3,90	2,00	1,90	2,3	3,8	1,8	2,1
	Σ4- und 5-Methylbenzotriazol	3,4	2,9	5,9	3,7	2,9	2,1	2,5	2,7	0,59	0,9	1,00	0,90	0,37	0,39	0,51	0,83	0,34	0,42
Synthetische Komplexbildner	EDTA	74	1,6	45	2,6	57	2	33	< 0,5000	2,8	3,6	23,0	22,0	21,0	2,2	19,0	16,0	13,0	21,0
	NTA	190	1,5	100	< 0,5000	34	1,1	15	< 0,5000	< 0,5000	< 0,5000	15,0	< 0,5000	< 0,5000	< 0,5000	16,0	2,7	1,8	2,3
	DTPA	6,0	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000	< 1,5000
Perfluorierte Verbindungen	PFBA	< 0,0025	< 0,0025	0,017	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	0,006	0,006	0,008	0,006
	PFOA	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	0,005	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025
	PFBS	0,012	0,012	0,013	0,011	0,009	0,01	0,016	0,006	0,008	0,008	0,009	0,009	0,010	0,011	0,010	0,014	0,017	0,015
	PFOS	< 0,0025	< 0,0025	0,008	0,010	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	< 0,0025	0,005
Synthetische Moschusduftstoffe	AHTN	0,040	0,070	0,04	0,08	0,07	< 0,0010	0,06	0,05	< 0,0100	< 0,0100	0,06	0,02	< 0,0100	0,02	0,06	0,03	< 0,0100	< 0,0100
	HHCB	0,95	0,87	0,54	0,80	0,07	0,27	0,63	0,38	0,02	0,17	0,34	0,18	0,09	0,12	0,28	0,13	0,02	0,09
Trialkylphosphate	TCEP	0,64	0,69	0,25	0,20	0,04	0,10	1,90	1,00	1,00	0,55	0,46	0,20	0,16	0,14	0,53	0,23	0,17	0,16
	TCP	2,2	1,6	1,2	1,00	0,17	0,31	3,00	2,60	1,80	1,30	2,90	1,10	0,93	0,96	2,90	0,95	0,55	0,56
Synthetische Süßstoffe	Acesulfam	24	0,10	31	0,21	22	0	45	0,26	0,12	0,13	22,00	0,04	< 0,0050	0,02	23	0,02	0,03	0,02
	Sucralose	7,2	6,7	7,3	7,4	7	5	18	14,00	7,20	7,60	11,00	< 0,0025	7,70	13,00	13	12,00	9,70	9,40
	Cyclamat	78	0,18	70	0,25	150	< 0,0050	67	0,33	< 0,0050	0,10	40,00	11,00	< 0,0050	< 0,0050	37	0,02	0,05	0,02
Weitere Spurenstoffe	Melamin	1,7	2,2	3,1	3,9	0,77	1,3	2,5	3,2	3,00	3,5	2,1	2,0	2,2	2,2	1,5	2,4	3,0	2,2

Investigation of micropollutant removal at the Tübingen Wastewater Treatment Plant using ozonation with subsequent sand filtration and its impact on the micropollutants in the river Neckar

Daniel Bogenrieder, Micropollutants Competence Centre Baden-Württemberg, Stuttgart/Germany; Rita Triebkorn, University of Tübingen, Tübingen/Germany; Vera Kohlgrüber, Micropollutants Competence Centre Baden-Württemberg, Stuttgart/Germany

Over the last years ozonation of wastewater became one of the promising large-scale oxidative technologies to eliminate micropollutants from wastewater on municipal wastewater treatment plants (WWTP).

Tübingen has a mechanical-biological WWTP designed for 137.500 population equivalents that discharges into the nearby Neckar river. In 2021 the plant began operating a large-scale ozonation with subsequent sand filtration as fourth treatment step to reduce the emission of micropollutants into the Neckar.

To evaluate the effect of ozonation on the micropollutant concentrations in wastewater, micropollutant removal in the WWTP was investigated before and after being upgraded with ozonation. Therefore, a list of 47 emerging substances from the groups of human pharmaceuticals, benzotriazoles, X-ray contrast agents and perfluorinated compounds, among others, was analyzed.

Furthermore, there was an evaluation of the effect of ozonation on the micropollutants in the Neckar. Sampling took place on several sampling points upstream and downstream of the discharge point of the Tübingen WWTP. The sampling was done three times before and after the commissioning of ozonation.

Before being upgraded, the Tübingen WWTP with mechanical-biological treatment achieved an average elimination rate of 38 % concerning all 47 substances examined and 19 % concerning the seven micropollutants for evaluation of elimination in advanced wastewater treatment in Baden-Württemberg. With an operating ozonation, the average elimination increased up to 65 % in total and 70 % for the seven trace substances in Baden-Württemberg. However, it has to be considered that the mechanical-biological treatment only achieved 26 % elimination on average for the substances examined for all samples after operating the ozonation due to an overall worse performance of the mechanical-biological treatment at the time.

Concerning the micropollutant concentrations in the river Neckar, the WWTP was identified as point source for several substances examined. This was evident in a comparison of samples from sites upstream and downstream the discharge point in the years before the start of ozonation. However, after operating the ozonation for most of the substances there is no significant reduction of concentrations apparent. This is in large parts due to the small proportion of the total flow accounted for by the effluent. For easily oxidizable substances like Diclofenac, there is a clear indication that operating the ozonation ensures lower concentrations of that substance in the river. Regardless, it was not possible to determine an influence of the operation of the ozonation on the chemical water quality for all substances.

Based on the results, it can be said that operating an ozonation with subsequent sand filtration on a municipal WWTP significantly improves the reduction of micropollutants in the effluent.

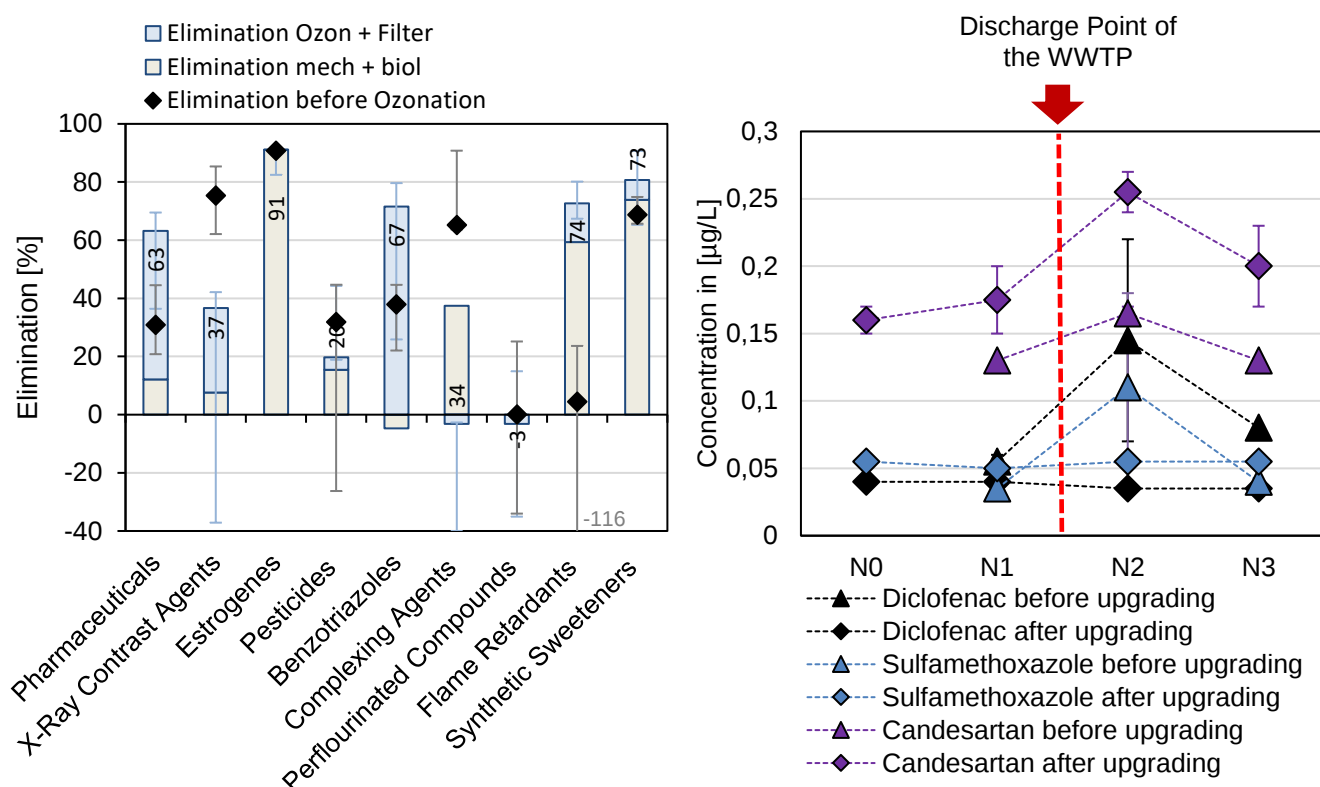
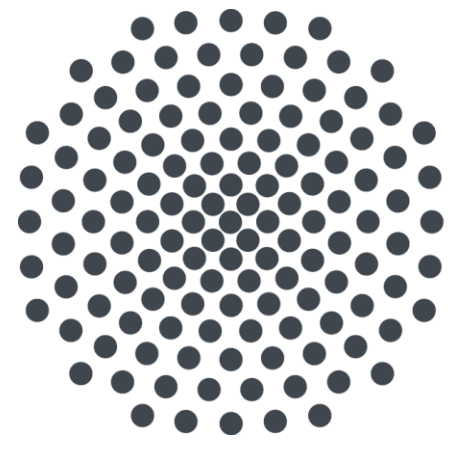


Figure 1: Average Elimination of substances in the investigated groups at Tübingen WWTP in mechanical-biological treatment and ozonation with subsequent sandfiltration before and after upgrading the WWTP (left). Change of concentration for selected micropollutants in the river Neckar achieved through the upgrade of the WWTP downstream the discharge point (right).



University of Stuttgart

Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management

Micropollutants Competence Centre Baden-Württemberg

D. Bogenrieder¹, R. Triebkorn², V. Kohlgrüber¹

¹ Micropollutants Competence Centre, Stuttgart/Germany

² University of Tübingen, Tübingen/Germany

Micropollutant Removal using Ozonation at the Tübingen Wastewater Treatment Plant

Investigation of organic micropollutant removal at the Tübingen Wastewater Treatment Plant using ozonation with subsequent sand filtration and its impact on the micropollutants in the river Neckar

1 Background & Methods

- Ozonation of wastewater is among the oxidative technologies promising to effectively eliminate organic micropollutants in municipal WWTPs. Therefore, ozonation could also take part in improving the chemical water quality in water bodies.
- Tübingen has a mechanical-biological WWTP designed for 137.500 population equivalents that discharges into the nearby Neckar River. In 2021 the plant began operating a large-scale ozonation with subsequent sand filtration to reduce the emission of micropollutants into the Neckar.
- To evaluate the effect of ozonation on the micropollutant concentrations in wastewater, the removal in the WWTP was investigated before and after being upgraded with ozonation. Therefore, a list of 47 emerging substances from the groups of human pharmaceuticals, benzotriazoles, X-ray contrast agents and perfluorinated compounds, among others, was analyzed.

2.1 Micropollutant removal at the Tübingen Wastewater Treatment Plant

- Before being upgraded with ozonation, the WWTP achieved an average elimination of 38 % concerning all 47 substances examined and 19 % concerning the seven micropollutants for evaluation of advanced treatment in Baden-Württemberg.
- During the sampling the wastewater was treated with relatively low ozone doses of 2.0 - 2.3 mg/L.
- As shown in Figure 1, with an operating ozonation the average elimination increased up to 65 % overall and 70 % for the seven trace substances in Baden-Württemberg.
- Ozonation with subsequent sand filtration significantly improves the reduction of micropollutants in the effluent.

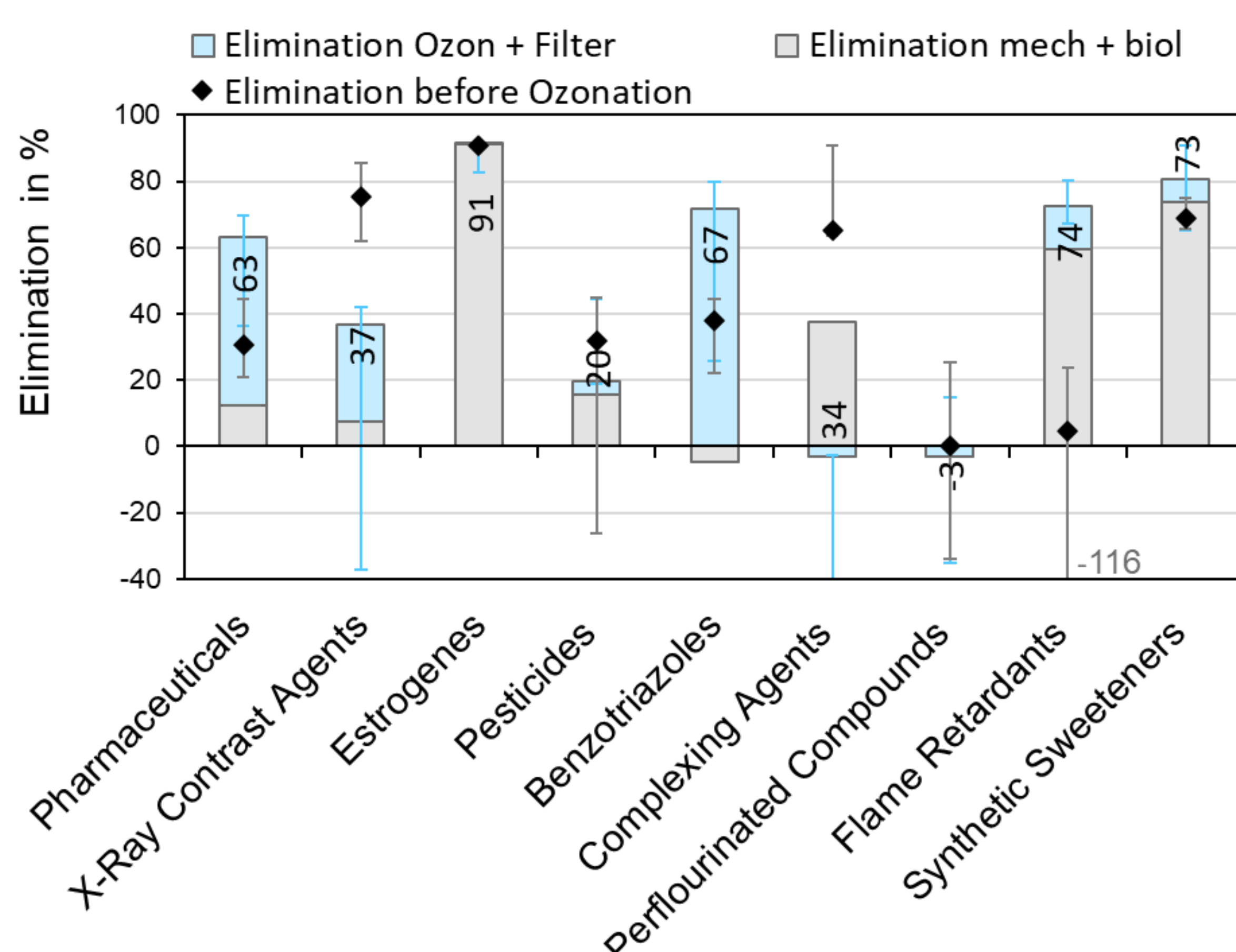


Figure 1: Average Elimination of substances in the investigated groups at Tübingen WWTP in mechanical-biological treatment and ozonation with subsequent sand filtration before and after upgrading the WWTP.

2.2 Development of Micropollutant Concentrations in the River Neckar

- In the years before and after commissioning of ozonation, sampling took place on several sites upstream and downstream of the discharge point of the WWTP.
- The WWTP was identified as point source for several micropollutants examined.
- For most of the micropollutants there is no significant reduction of concentrations in the Neckar apparent. This is in large parts due to the small proportion of the total flow accounted for by the effluent.
- But, as seen in Figure 2, for easily oxidizable substances, like Diclofenac, there is a clear indication that ozonation ensures lower concentrations of that substance in the Neckar.

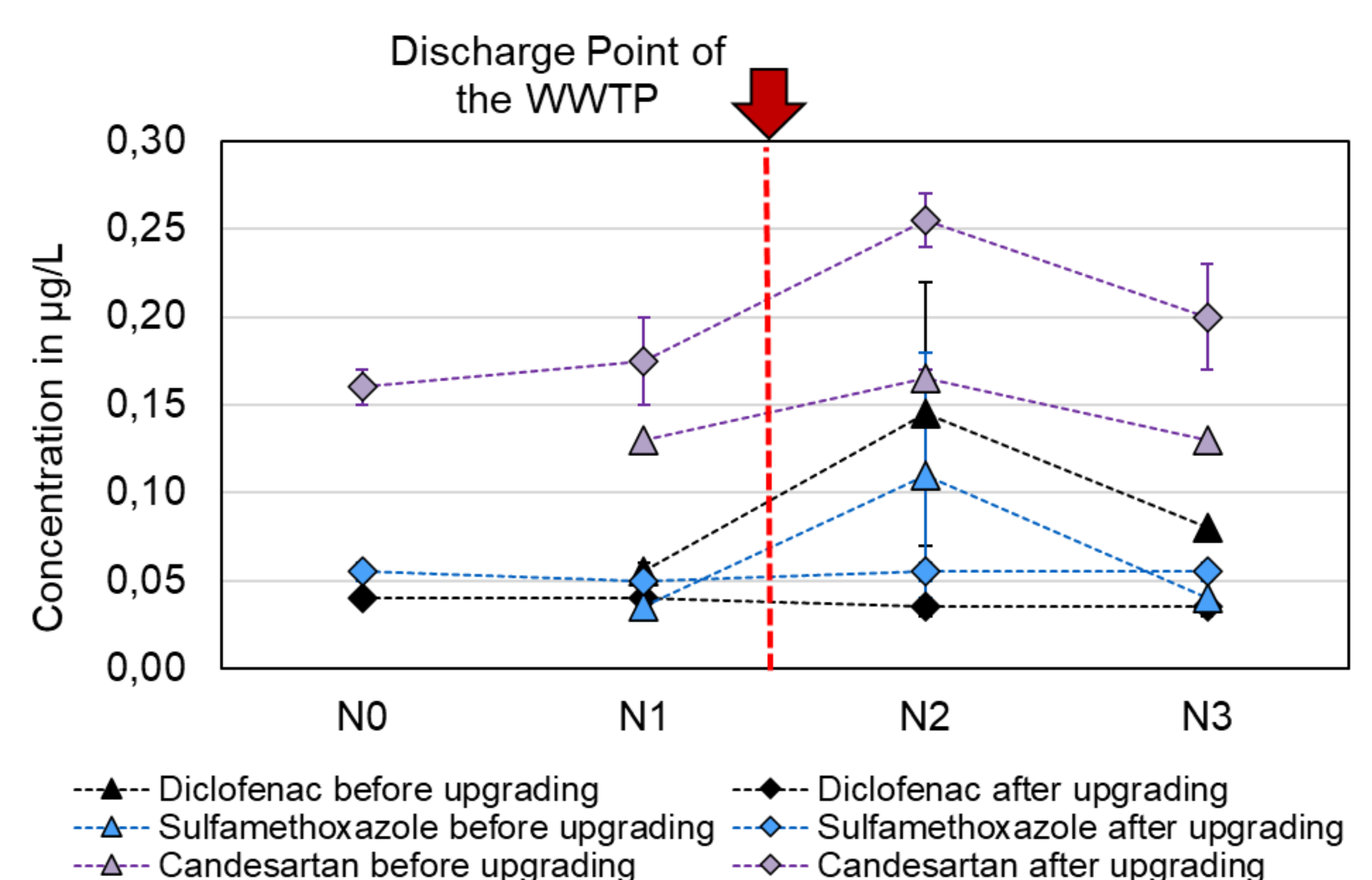


Figure 2: Change of concentration for selected micropollutants in the river Neckar achieved through the upgrade of the WWTP downstream of the discharge point.

3 Conclusion

- Operating an ozonation with subsequent sand filtration on a municipal WWTP significantly improves the reduction of micropollutants in the effluent.
- There was no significant influence of the operation of the ozonation determined for most of the analyzed micropollutants in the Neckar.