

Zusammenfassung Dissertation

Mikroschadstoffe bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen, wie Industriechemikalien, Pestiziden und Bioziden, Pharmazeutika und Körperpflegeprodukten sowie deren Transformationsprodukten, und werden kontinuierlich in geringen Konzentrationen in die Umwelt abgegeben. Kläranlagen mit ihren Abwassereinleitungen sind eine punktuelle Quelle dieser Schadstoffe, da viele Verbindungen nicht oder nur unzureichend abgebaut werden. Abhängig von den Verbindungen kann diese Verunreinigung für Organismen, die diesen Stoffen ausgesetzt sind, schädlich sein. Insbesondere pharmazeutische Wirkstoffe sind Mikroschadstoffe, die aufgrund ihres Designs in sehr geringen Konzentrationen in Organismen wirken können. Sie haben medizinische Eigenschaften und sind daher biologisch aktive Substanzen mit einem weltweiten Produktionsvolumen im Größenmaßstab über 100.000 Tonnen. Zu den wichtigsten negativen Auswirkungen von Arzneimitteln in der Umwelt gehören die aquatische Toxizität, die Entwicklung von Resistenzen bei pathogenen Bakterien, die Genotoxizität und die endokrine Disruption. Die am meisten diskutierten Themen sind nach wie vor die Entwicklung bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika und Störungen des endokrinen Systems, die durch hormonaktive Substanzen wie beispielsweise Östrogene verursacht werden.

Aufgrund der geringen Eliminationsleistung bestehender Kläranlagen müssen Lösungen gegen die weitere Freisetzung und Anreicherung dieser Mikroschadstoffe gefunden werden. Ursprünglich wurden Kläranlagen entwickelt, um Schwebstoffe abzutrennen und vor allem organische Verbindungen, Stickstoff und Phosphor sowie Krankheitserreger aus dem häuslichen Abwasser zu entfernen. Aufgrund der komplexeren Matrix des heutigen Abwassers sind die Anforderungen an die Reinigungswirkung von Kläranlagen gestiegen. Eine mögliche Lösung ist die Behandlung von Abwasser mit erweiterten Reinigungstechnologien. Die erweiterte Abwasserbehandlung ist einer von vielen Ansätzen, um die Belastung des Abwassers mit Mikroschadstoffen zu reduzieren. Es gibt verschiedene Technologien, dies zu erreichen. Die meisten davon basieren auf Sorption (z.B. an Aktivkohle), erweiterten Oxidationsprozessen (z.B. Ozonung), elektrochemischen Techniken oder Membranabtrennung. Seit kurzem steht eine neuartige Methode mit einem biotechnologischen Ansatz zum Abbau von Mikroverunreinigungen zur Verfügung. Das Konzept dieser erweiterten Abwasserbehandlung ist der Einsatz spezifischer Enzyme zum Abbau von Schadstoffen, die bei der konventionellen Behandlung nicht eliminiert werden. Diese Enzyme können Xenobiotika durch Oxidationsprozesse cometabolisieren und somit abbauen. Ein herausragendes Merkmal von Pilzen und insbesondere von Weißfäulepilzen ist die Fähigkeit mit extrazellulären Oxidoreduktasen organische Verbindungen einer zufälligen Struktur, wie die Holzverbindung Lignin und ihre Huminstoffderivate, anzugreifen. Daher werden sie oft als Lignin-modifizierende Enzyme (LME) bezeichnet, wobei Ligninperoxidase, Manganperoxidase und Laccase die wichtigsten sind. Sie haben gezeigt, dass sie strukturell unterschiedlichste Verbindungen verschiedener Schadstoffklassen wie PAK, Pestizide, synthetische Farbstoffe,

Chlorphenole und PCB abbauen können. Laccasen sind aufgrund ihrer vielfältigen Funktionalität, Thermostabilität und Umweltfreundlichkeit besonders vorteilhaft für den Einsatz in der Abwasserbehandlung. Sie benötigen nur Luft (molekularen Sauerstoff), um Schadstoffe zu oxidieren und Wasser als Nebenprodukt zu produzieren. Diese werden in verschiedenen industriellen Prozessen auch bereits eingesetzt, aber in der Abwasseraufbereitung gibt es noch großen Forschungsbedarf, insbesondere hinsichtlich ihrer kontinuierlichen Anwendung, Funktionalität und Stabilität, sowie deren Anwendung in größerem Maßstab.

Diese Arbeit untersucht die Effizienz der enzymatischen Technologie, mittels Laccasen spezifische Mikroschadstoffe (Antibiotika, Hormone und endokrine Disruptoren (EDs)) abzubauen. Besonderes Augenmerk wird auf mögliche ökotoxikologisch relevante Veränderungen gelegt, in Kombination mit chemischer Analytik. Es wurde untersucht, ob diese neue Anwendung eine Alternative zu anderen erweiterten Abwasserbehandlungen sein könnte, beziehungsweise wo diese Anwendung eine sinnvolle Ergänzung sein kann. Der zweite Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der ökotoxikologischen Bewertung von Carbamazepin (CBZ) und dessen Transformationsprodukten hinsichtlich Nichtzielorganismen. Es wurde untersucht, wie wichtig die ökotoxikologische Bewertung von Stoffen insbesondere auch die von Transformationsprodukten ist.

Die Entfernung von Hormonen und EDs wurde im Labormaßstab in Batch-Konfiguration mit Reinstwasser und realem Krankenhausabwasser untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung von Hormonen und ED durch Laccasen in beiden Fällen möglich ist. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass die Entfernung bei sehr niedrigen Enzymkonzentrationen (2,8 ABTS U/L) möglich ist. Bei der Implementierung dieser Technologie in größerem Maßstab sind die Enzymaktivität und die damit verbundene Menge wesentliche Faktoren, insbesondere im Hinblick auf die Kosteneffizienz. Bemerkenswert ist, dass immobilisierte Enzyme im Vergleich zum freien Enzym eine bessere Abbauleistung aufwiesen. Die Immobilisierung ermöglicht es, das Enzym wiederzuverwenden und im System zu halten. Dies ist ein weiterer entscheidender Faktor im Scale-up-Prozess. Neben der guten Leistung der Laccase war die Adsorption an die polymeren Träger selbst der wichtigste Faktor für die Eliminierung von Schadstoffen. Im Vergleich zu anderen erweiterten Abwasserbehandlungstechnologien wie Ozonung oder Aktivkohle konnte eine ähnliche Leistung erzielt werden.

Weiterhin wurde im Rahmen der Dissertation die erfolgreiche Behandlung einer Mischung von 38 verschiedenen Antibiotika in entionisiertem Wasser durch den kontinuierlichen Prozess eines enzymatischen Membranreaktors demonstriert. 32 der 38 Antibiotika konnten um mehr als 50% entfernt werden, wenn der Mediator Syringaldehyd zur immobilisierten Laccase gegeben wurde. Diese Behandlung führte jedoch zu einer erhöhten unspezifischen Toxizität. Dies deutet auf die Bildung von toxischen Transformationsprodukten oder Radikalen während der Behandlung hin. Dagegen reduzierte die Laccase ohne Mediator die Antibiotika nicht signifikant. In diesem Fall zeigten sich aber auch keine Auswirkungen auf die Toxizität. Die enzymatische Behandlung mit Mediator entfernte Antibiotika ähnlich gut wie andere erweiterte

Abwassertechnologien. In einem weiteren Experiment wurden Antibiotika in entionisiertem Wasser und realem Abwasser mit dem Pilz *Trametes versicolor* behandelt. Die Methoden und Materialien waren die gleichen wie zuvor, aber anstelle von immobilisierter Laccase wurden dem Medium Pilzpellets zugesetzt und keine zusätzlichen Mediatoren verwendet. Im Krankenhausabwasser wurde die Entfernung der im Wasser selbst vorhandenen Antibiotika analysiert, im entionisierten Wasser wurden erneut die 38 Antibiotika zu dotiert, um diese zu behandeln. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung von Antibiotika aus synthetischen und realen Abwässern mittels Pilzpellets erfolgreich war. Beim Abbau wurde in diesem Fall keine Erhöhung der Toxizität festgestellt. Neben der Reduktion der Gesamtoxizität des Abwassers wurde auch die Reduktion der östrogenen und androgenen Aktivität von realen Abwasserproben erreicht.

Ferner wurden die ökotoxikologischen Folgen von CBZ und zwei Metaboliten in einem Lebenszyklus-Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* untersucht. Durch die Bestimmung des Einflusses von CBZ und seiner beiden Hauptmetabolite Carbamazepin 10,11-Epoxid (EP-CBZ) und 10,11-Dihydro-10,11-Dihydroxy-Carbamazepin (DiOH-CBZ) auf die Population von *C. riparius* wurde das potentielle Risiko für Sedimentbewohner abgeschätzt. Der Metabolit EP-CBZ war deutlich toxischer als die Ausgangssubstanz CBZ. Mortalität, Emergenz und Fruchtbarkeit waren besonders sensible Parameter bei der Exposition gegenüber CBZ und EP-CBZ. Der Metabolit DiOH-CBZ rief innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs keine Effekte hervor. Obwohl CBZ weniger toxisch war als EP-CBZ, ist CBZ in der Umwelt in viel höheren Konzentrationen vorhanden und stellt daher ein höheres potenzielles Risiko für Sedimentbewohner im Vergleich zu seinem Metaboliten dar. Die hohe Toxizität von EP-CBZ ist noch nicht vollständig geklärt, obwohl sie schon lange bekannt ist. Darüber hinaus zeigt dieses untersuchte Beispiel, wie wichtig es ist, häufig nachgewiesene Metaboliten und Transformationsprodukte in die Risikobewertung einzubeziehen. Molekulardynamische Simulationen wurden angewandt, um die Affinitäten von CBZ zum Ecdysonrezeptor (EcR) zu modellieren und eine mögliche Wirkungsweise bei *C. riparius* zu klären. Ihre Bindungsaffinität war jedoch recht gering, so dass die Wirkungsweise nicht geklärt werden konnte. Die Rezeptoraffinität wurde untersucht, da es in vorigen Studien bereits Hinweise auf einen Einfluss der Entwicklung bei *C. riparius* gab. Auch weitere Versuche aus einer Bachelorarbeit deuteten auf eine Störung der Entwicklung zum Imago hin. Die Vermutung war, dass CBZ den EcR blockiert.

Folgende neue Erkenntnisse konnten mit dieser Arbeit erzielt werden. Eine effektive Entfernung der endokrinen Aktivität von Stoffgemischen aus EDC in Reinstwasser und Abwasser wurde durch Laccasen aus *T. versicolor* und *M. thermophila* demonstriert. Unter Einsatz der genannten Enzyme ist neben dem Abbau von Hormonen auch die Entfernung von Bisphenol A, Benzyl-butyl-phthalat, Nonylphenol und Propylparaben möglich. Der Abbau dieser Stoffe durch Laccasen konnte bereits bei geringen Enzymaktivitäten festgestellt werden, was gezeigt hat, dass eine enorme Kosteneinsparung beim Einsatz von Laccase möglich ist. Immobilisierte Enzyme (Laccase von *T. versicolor* und *M. thermophila*) haben eine bessere

Entfernungsleistung im Vergleich zu den freien Enzymen gezeigt. Weiterhin konnte immobilisierte Laccase von *T. versicolor* erfolgreich 32 von 38 Antibiotika, die in Wasser in umweltrelevanten Konzentrationen vorlagen, nach 24 Stunden und unter Verwendung von Syringaldehyd als Mediator abbauen. Die Gruppe der Sulfonamide und Tetracycline wurde am effektivsten abgebaut. Allerdings hat die Laccase-Behandlung mit Mediator eine unspezifische Toxizität in zwei Bioassays induziert, die eine Entstehung von toxischen Transformationsprodukten oder Radikalen impliziert. Bezogen auf beide Anwendungen ist die enzymatische Behandlung ebenso effektiv wie andere erweiterte Abwasserbehandlungstechnologien zur Entfernung von Hormonen, ED und Antibiotika.

Für CBZ und EP-CBZ wurde ein Einfluss auf das Populationsniveau von *C. riparius* und ein potenzielles Umweltrisiko für Sedimentbewohner nachgewiesen. Dies zeigt nicht nur die Bedeutung von CBZ als Umweltschadstoff, sondern auch die Notwendigkeit, bekannte und häufig nachgewiesene Metaboliten oder Transformationsprodukte in die Risikobewertung einzubeziehen. Darüber hinaus ist weder für CBZ noch für EP-CBZ die Wirkungsweise zur Erklärung ihrer Toxizität für *C. riparius* bekannt. Da die Bindungsaffinität von CBZ zum EcR sehr gering ist, scheint eine Wechselwirkung von CBZ mit dem EcR nicht Grund der CBZ Toxizität zu sein. Eine andere Studie hat CBZ in Verbindung mit dem Juvenilhormon in Insekten gebracht.

Die Bewertung einer neuen erweiterten Abwasserbehandlung sollte im Allgemeinen durch Kombination chemischer und ökotoxikologischer Testmethoden erfolgen. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung dieser Kombination für die Bewertung solcher neuartiger Behandlungstechnologien und der Chemikalien. So lassen sich Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Entfernung und die Entstehung problematischer Umwandlungsprodukte ziehen.

Die Behandlung kommunaler Abwässer ist sehr komplex. Eine Kombination verschiedener Enzyme oder gentechnisch veränderter Enzyme könnte diese neue Technologie erfolgreich machen. Die Laccase-Technologie muss weiter verfeinert werden, um die besten Enzyme, Enzymkonfigurationen, Stabilitätsstudien und den idealen Träger für den Einsatz im Abwasser zu finden. Der Einsatz von immobilisierten Enzymen erhöht die Effizienz der Eliminierung und die Anwendung des Reaktordesigns fördert in der Regel den Abbau. Dies ist ein vielversprechendes Signal, dass auch eine Großanwendung erfolgreich sein wird. Der Einsatz von Laccasen ist eher bei der Behandlung spezifischer Abwässer mit hoher Belastung durch einen oder wenige bekannte Schadstoffe möglich, z.B. in Krankenhäusern, Industrieabwässern, Massentierhaltung oder Konzentrate aus der Membrantechnologie.