

# OXISCREEN – WIRKUNGS- BEZOGENE ANALYTIK

ZUR DETEKTION VON REAKTIONSPRODUKTEN BEI DER TRINKWASSERAUFBEREITUNG MIT  $O_3$ ,  $O_3/H_2O_2$  UND  $Cl_2/ClO_2$

Die Wasserversorger müssen den Nachweis erbringen, dass Kontaminationen wie pathogene Mikroorganismen, Toxine, Spurenstoffe und endokrine Disruptoren effektiv entfernt, zerstört oder inaktiviert werden und dass die bei ihren Aufbereitungsverfahren entstehenden Reaktionsprodukte gesundheitlich unbedenklich sind. Der Aufwand für eine komplette Analyse aller möglichen Einzelstoffe ist für eine Qualitätsüberwachung praktisch nicht zu leisten. Ein Weg aus diesem Dilemma könnte, neben der quantitativen Bestimmung durch Target-Bestimmungsmethoden, ein Screening des Stoffgemisches mit einer wirkungsbezogenen Analytik sein.

Oliver Köster\*, Stadt Zürich, Wasserversorgung; Patricia Schubert-Ullrich, Industrielle Werke Basel

Andreas Schönborn, Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften; Wolfgang Schulz, Zweckverband Landeswasserversorgung

## RÉSUMÉ

### OXISCREEN – ANALYSE PORTANT SUR LE MODE D'ACTION DES PRODUITS DE RÉACTION DANS LE TRAITEMENT DE L'EAU POTABLE AVEC $O_3$ , $O_3/H_2O_2$ ET $Cl_2/ClO_2$

Les distributeurs d'eau doivent d'une part prouver que les contaminants indésirables tels que les micro-organismes pathogènes, les toxines, les micropolluants et les perturbateurs endocriniens sont efficacement éliminés, détruits ou inactivés et, d'autre part, assurer également que les produits de réaction provenant des processus de traitement ne soient pas présents dans des concentrations dangereuses pour la santé. Le coût pour une analyse complète de toutes les substances individuelles possibles est pratiquement impossible à supporter pour une surveillance de la qualité. Pour sortir de ce dilemme s'offre la possibilité d'un screening du mélange de substances avec une analyse portant sur le mode d'action, en plus de la détermination quantitative par des méthodes d'analyse ciblée. Depuis quelques années, il y a des kits miniaturisés et automatisés de tests valorisables pour la détection de mutagénicité (AMES MicroPlate Fluctuation MPF) ou perturbateurs endocriniens (XenoScreen XL YES/YAS; A-YES aqua 1.1; A-YAS aqua), qui sont plus rapides et plus simples à utiliser que les systèmes précédents. La combinaison des méthodes physico-chimiques telle que la chromatographie sur couche mince

## EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Der Anspruch der Trinkwasserkonsumenten, ein nachweislich fast unbelastetes, reines Trinkwasser zu geniessen, schlägt sich in der Wasseranalytik in immer tieferen Nachweisgrenzen und einer wachsenden Zahl an gemessenen Qualitätsparametern nieder.

Selbst das sehr starke Oxidationsmittel Ozon in Kombination mit Wasserstoffperoxid (*Advanced Oxidation Process*, AOP) führt, bei ökonomisch sinnvollen Betriebsbedingungen, in der Regel nicht zur vollständigen Mineralisierung der organischen Stoffe, sondern zu Transformationsprodukten, die allenfalls noch unbekannte, negative Eigenschaften haben könnten. Der Schweizerische Verein des Gas- und Wasserfaches (SVGW) initiierte deshalb in Zusammenarbeit mit den Labors der Wasserversorger und dem *Swiss Centre for Applied Human Toxicology* (SCAHT) die Übersichtsarbeit *Microtox* [1], um eine wirkungsbezogene Teststrategie zu eruiieren, mit der routinemässig relevante Substanzen erfasst werden könnten.

In der Folge starteten die Industriellen Werke Basel (IWB) und die Wasserversorgung Zürich (WVZ) erste gemeinsame Untersuchungen mit Testsystemen zur Detektion von Mutagenität [2, 3]

\* Kontakt: [oliver.koester@zuerich.ch](mailto:oliver.koester@zuerich.ch)

sowie östro- und androgen wirkender Substanzen [4, 5]. Durch das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) wurden die IWB und die WVZ auf eine innovative Methodenentwicklung der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) zum Nachweis von östrogenen Aktivität hingewiesen. Bei dieser Methode ist die Probenaufbereitung und Detektion der biologisch aktiven Stoffe im Vergleich zur bisherigen Standard-Methode sehr viel schneller und sensitiver [6, 7].

Um die Testpalette zu erweitern, wurde Wolfgang Schulz vom Zweckverband Landeswasserversorgung (LW) aus Langenau (D) für eine Zusammenarbeit angefragt. Zur Überwachung ihrer Rohwässer nutzt die LW neben der herkömmlichen Target-Analytik seit mehr als zehn Jahren auch die wirkungsbezogene Analytik. Als besonders erfolgreich hat sich, nach Trennung der Substanzen auf HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography)-Platten, die Biolumi-

neszenz-Detektion mithilfe des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* erwiesen [8]. Die Ziele, die mit dem Projekt *OxiScreen* erreicht werden sollten, waren folgende:

- Evaluierung der Praxistauglichkeit von wirkungsorientierten Biotests für die Labors der Wasserversorger
- Praxisnahe Überprüfung der Wirkung verschiedener oxidativer Verfahren (Chlorierung / Ozonung / Ozonung + AOP) auf ausgewählte hormonaktive Substanzen und Spurenstoffe
- Identifikation und Quantifizierung ausgewählter Spurenstoffe und deren Transformationsprodukte nach Ozonung und AOP mit einer Screeningmethode (LC/MS-Analytik)

## MATERIAL UND METHODEN

### PROBEWÄSSER

Für die Batch-Versuche (31) im Labor wurde Evian-Wasser, Zürichseewasser, Uferfiltrat der Limmat und Rheinwasser nach Schnellfiltration verwendet. Tem-

peratur, pH, gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Bikarbonat/Karbonatgehalt beeinflussen den Ozonzerfall massgeblich. Die Oxidationsversuche im Labor wurden deshalb temperaturstabilisiert bei 10 °C durchgeführt. Die Qualität der Wässer ist in *Tabelle 1* aufgeführt.

### Probenbehandlung

Die Probewässer wurden mit und ohne Zugabe eines Spurenstoffmix (*Tab. 2*) mit folgenden Startkonzentrationen ( $C_0$ ) an Oxidantien versetzt:

- Chlorierung mit Chlor/Chlordioxid ( $C_0$ : 0,4 mg/l; 10 °C; 30 min)
- Ozonung ( $C_0$ : 2 mg/l; 10 °C; 3 min)
- Ozonung ( $C_0$ : 2 mg/l; 10 °C; 20 min) + AOP mit  $H_2O_2$  (10 °C; 10 min)

Bei der Kombination von Ozonung und AOP wurde nach 20 Minuten Wasserstoffperoxid beigemischt. Allen oxidierten Probewässern wurde zur Neutralisierung der Restoxidantien nach 30 Minuten eine

	Karbonathärte	Hydrogenkarbonat	pH	DOC	$kO_3$ (nativ)	$kO_3$ (+Mix)
	(mmol/l)	(mmol/l)	-	(mg/l)	( $min^{-1}$ )	( $min^{-1}$ )
Evian-Wasser	2,95	5,9	7,2	-	n. m.	0,027
Zürichseewasser <sup>1)</sup> aus 30m Tiefe	1,2-1,4	2,4-2,7	7,5-8,2	1,2-1,5	0,020	0,110
Uferfiltrat <sup>2)</sup> vom GW Hardhof	1,4-1,6	2,7-3,1	7,6-7,9	0,3-0,5	0,004	0,008
Schnellfiltrat <sup>3)</sup> von Rheinwasser beim Kraftwerk Birsfelden	1,2-1,5	2,3-3,1	8,0-8,3	1,1-1,6	0,018	0,024

<sup>1)</sup> Qualitätswerte aus dem Jahresbericht der WVZ (2015)

<sup>2)</sup> Qualitätswerte aus dem Jahresbericht der WVZ (2015)

<sup>3)</sup> Qualitätswerte aus einem Abschlussbericht eines anderen Projekts [9]

Tab. 1 Qualität der untersuchten Wässer, inkl. Ozonzerfallskonstante ( $kO_3$ ) in den originalen (nativ) und mit Spurenstoffmix aufgestockten Proben (+Mix)

Qualité des eaux analysées (incl. constante de désintégration d'ozone  $kO_3$ ) dans des échantillons originaux (nativ) et des échantillons enrichis par un mélange de micropolluants (+Mix)

Mittelwerte nach Aufstockung mit Mix A*		Mittelwerte nach Aufstockung mit Mix B**		Spurenstoffe	CAS-Nr.
nM	µg/l	nM	µg/l		
79	48,3	82,1	50,4	Amidotriozoesäure	117-96-4
101	79,7	88,4	69,9	Iopromid	73334-07-3
70	14,1	57,1	11,5	Acesulfam K	55589-62-3
86	10,3	91,5	10,9	1H-Benzotriazol	95-14-7
85	14,0	77,3	12,8	Metformin HCl	1115-70-4
7	2,0	0,7	0,2	17-α-Ethinylestradiol (EE2)	57-63-6
8	2,2	0,7	0,2	17-β-Estradiol (E2)	50-28-2
68	19,7	2,8	0,8	Dihydrotestosteron (DHT)	521-18-6
131	40,1	2,6	0,8	Testosteron	58-22-0

\* Für die Versuche mit Evianwasser und Zürichseewasser

\*\* Für die Versuche mit Uferfiltrat der Limmat und Schnellfiltrat des Rheins

Tab. 2 Konzentrationen der Spurenstoffe nach Zugabe des Spurenstoffmix A und B  
Concentrations de micropolluants après addition des mélanges A et B de micropolluants

ausreichende Menge an Natriumthiosulfat zugegeben. Je ein Liter der Probewässer wurde auf pH 7 und pH 2 eingestellt, über einen Glasfaserfilter filtriert (GF/B,

Abscheidevermögen ca. 1 µm) und nach Zugabe von 20 ml Methanol über *Oasis HLB 6cc* Festphasenkartuschen aus Kunststoff gegeben (*Waters*). Die Anrei-

cherung auf der Festphase (5 ml/min) wurde mit *Autotrace*-Anlagen von *Caliper* durchgeführt. Die Elution fand mit 1 × 4 ml Aceton und 1 × 1 ml Methanol statt. Die Eluate wurden mithilfe eines Abdampfsystems unter einem Stickstoffstrom bei 35 °C weiter eingengt und so bis zu 2000-fach aufkonzentriert (*Fig. 1*).

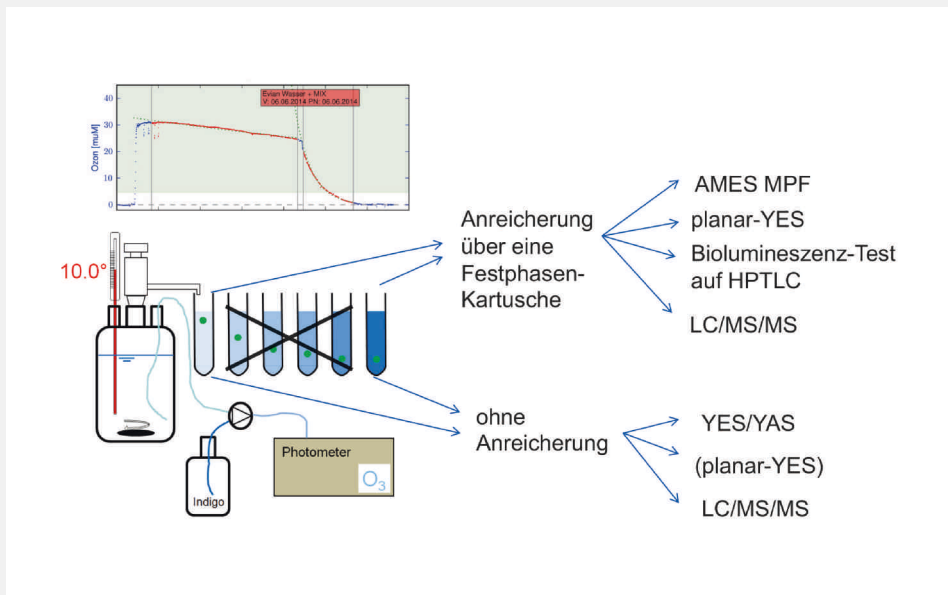


Fig. 1 Laborversuchsaufbau und Probenbehandlung am Beispiel einer Ozonung ( $C_{O_3}$ : 2 mg/l; 10 °C; 20 min) + AOP mit  $H_2O_2$  (10 °C; 10 min) von Evian-Wasser mit Spurenstoffmix. Analysiert wurden die Proben vor Zugabe der Oxidantien und am Ende des Versuchs nach Neutralisierung der Restoxidantien mit Natriumthiosulfat.

Installation d'un essai de laboratoire et manipulation des échantillons pour l'exemple du traitement à l'ozone ( $C_{O_3}$ : 2 mg/l; 10 °C; 20 min) + AOP avec  $H_2O_2$  (10 °C; 10 min) d'eau d'Évian avec mélange de micropolluants. Des échantillons ont été analysés avant l'addition d'oxidants et en fin de test après neutralisation du reste d'oxidant avec du thiosulfate de sodium.

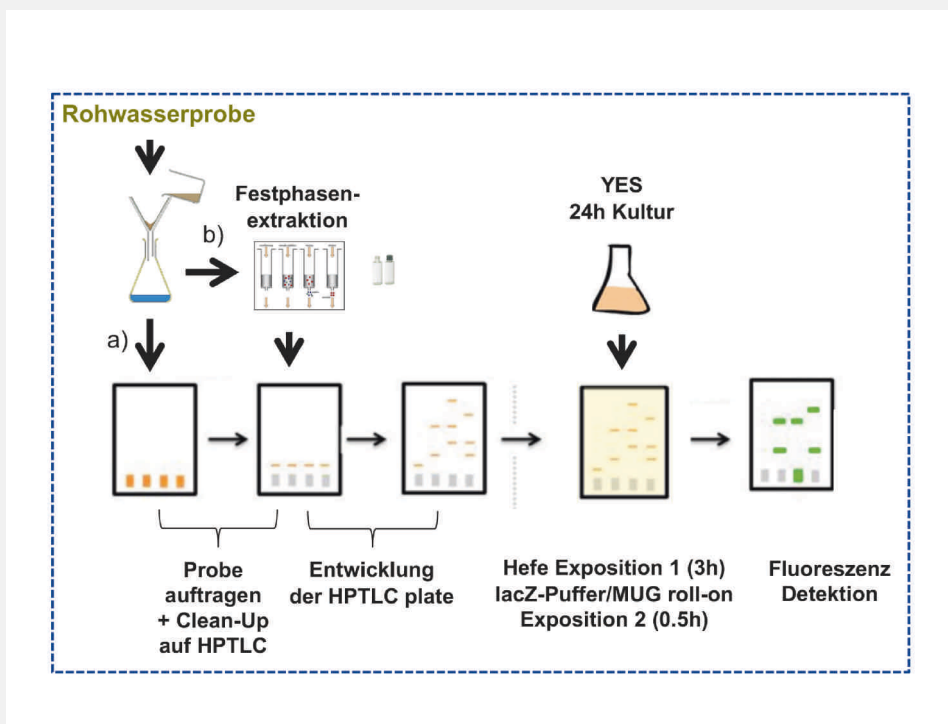


Fig. 2 Das planar-YES-Konzept (schematische Skizze), basierend auf dem Standard Yeast Estrogen Screen [4]. Der planar-YES kann mit nativen a) oder aufkonzentrierten b) Proben durchgeführt werden. Concept du planar-YES (croquis schématique), basé sur le Standard Yeast Estrogen Screen [4]. Le planar-YES peut être utilisé avec des échantillons natifs a) ou concentrés b).

**LC/MS-ANALYTIK**

Zur quantitativen Bestimmung der aufgestockten Spurenstoffe (*Tab. 2*) wurde eine Screeningmethode eingesetzt. Durch die Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers (*LTQ Orbitrap Velo Pro MS*), gekoppelt mit einer Flüssigkeitschromatografie (*Accela UHPLC System*), konnten die organischen Verbindungen über ein *Target*- oder ein *Non-Target-Screening* identifiziert werden [10]. Es erfolgte jeweils eine Einspritzung im positiv und negativ Elektrospray-Ionisations-Modus (*Tab. 3*) [11]. Für die Auswertung wurde die Software *Xcalibur* (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet.

Eluent ESI+:

- A) 0,1% Ameisensäure in Wasser
- B) 0,1% Ameisensäure in Methanol

Eluent ESI-:

- A) 5 mmol Ammoniumacetat in Wasser (pH 5,5)
- B) 5 mmol Ammoniumacetat in Methanol (pH 5,5)

Direktinjektion / Online-Anreicherung

Bei der Direktinjektion wurden die Proben direkt auf die analytische Säule (*Synergie 4u Fusion - RP 80A 100\*2,0 mm*;

Spurenstoffe	Elektrospray-Ionisations-Modus
Amidotrizoesäure	positiv
Iopromid	positiv
Acesulfam K	negativ
1H-Benzotriazol	positiv
Metformin HCl	positiv
17-α-Ethinylestradiol (EE2)	negativ
17-β-Estradiol (E2)	negativ
Dihydrotestosteron (DHT)	positiv
Testosteron	positiv

Tab. 3 Elektrospray-Ionisations-Modus für den Nachweis der aufgestockten Spurenstoffe

Mode de l'ionisation par électronébuleur pour la détection des micropolluants enrichis

Phenomenex) gegeben. Bei der Online-Anreicherung wurde vorgängig über Festphasen (Hypersil Gold 20\*2,1 mm 12 µm mit Hypercarb Guard 10\*2,1 mm 5µm; Thermo Scientific) angereichert.

**WIRKUNGSBEZOGENE ANALYTIK**

Eine wirkungsbezogene Analytik der nativen und behandelten Probewässer wurde mit folgenden Testsystemen durchgeführt:

Ames MicroPlate Fluctuation (MPF)

(Testkit von Xenometrix)

=> Nachweis chemischer Mutagene im 384er-Mikroplattenformat mit den beiden E.coli-Teststämmen TA98 und TA100 mit und ohne Leberextrakt (S9)

XenoScreen XL YES/YAS

(Testkit von Xenometrix)

=> Nachweis von östro- und androgen wirkenden Substanzen (agonistisch und antagonistisch) im 96er-Mikroplattenformat mit gentechnisch modifizierten Hefezellen von Saccharomyces cerevisiae

A-YES; A-YAS (Testkits von new diagnostics)

=> Nachweis von östro- und androgen wirkenden Substanzen im 96er-Mikroplattenformat mit gentechnisch modifizierten Hefezellen von Arxula adenivorans

planar-YES (Test der ZHAW)

=> Nachweis östrogen wirkender Substanzen mit gentechnisch modifizierten Hefezellen von Saccharomyces cerevisiae gemäss Schema in Figur 2

HPTLC/AMD in Kombination mit Biolumineszenzdetektion (Test der LW)

=> Nachweis toxischer Wirkungen auf den Stoffwechsel von Vibrio fischeri gemäss Schema in Figur 3 und 4

**ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

**LC/MS-ANALYTIK**

In den Figuren 5 und 6 ist erkennbar, dass das effektivste Oxidationsverfahren, in Bezug auf den Abbau der aufgestockten Spurenstoffe, die Kombination Ozonung + AOP ist.

Die Konzentrationen der estrogenaktiven Substanzen 17-alpha-Ethinylestradiol und 17-beta-Estradiol sanken in allen drei Oxidationsvarianten unter die Bestimmungsgrenzen von <10 bis <100 ng/l (abhängig von der Matrix). Die androgen wirkende Substanz Testosteron war nach

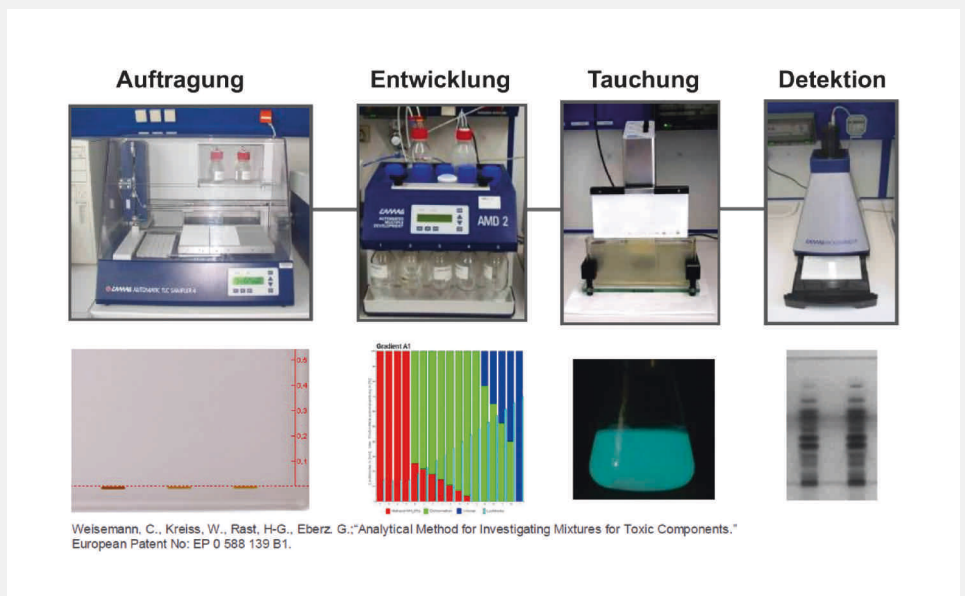


Fig. 3 Schematischer Ablauf der HPTLC/AMD-Analyse mit Biolumineszenzdetektion  
Un déroulement schématique de l'analyse HPTLC/AMD avec une détection de bioluminescence

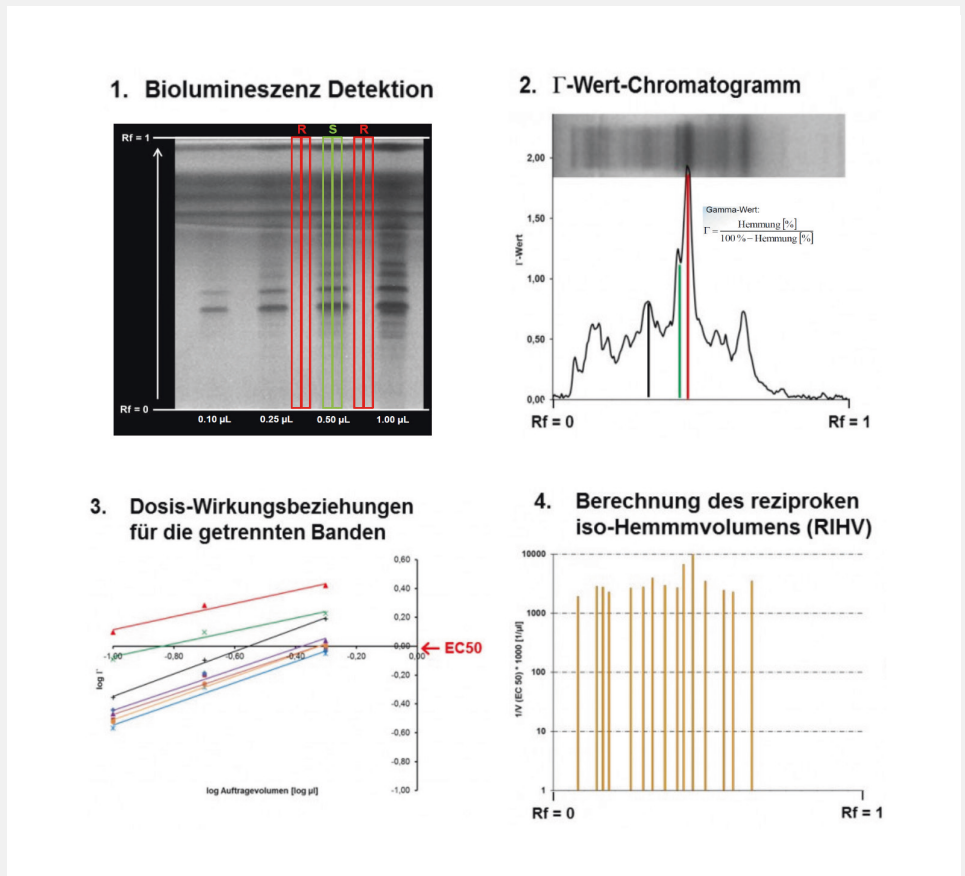


Fig. 4 Schematische Darstellung des Ablaufs zur Ermittlung des reziproken iso-Hemmvolumens (RIHV) für die getrennten Hemmzonen  
Représentation schématique du déroulement pour détermination de l'iso-volume d'inhibition réciproque (RIHV) pour les zones d'inhibition séparées

den Ozonungen ebenfalls nicht mehr quantifizierbar (<10 ng/l). Die höheren Konzentrationen an aufgestocktem Dihydrotestosteron im Zürichseewasser und Evian-Wasser wurde nur um ca. die Hälfte

reduziert. Metformin und Amidotri-zoesäure wiesen die geringsten relativen Abnahmen auf. Von den in der Literatur beschriebenen Transformationsprodukten konnten nach

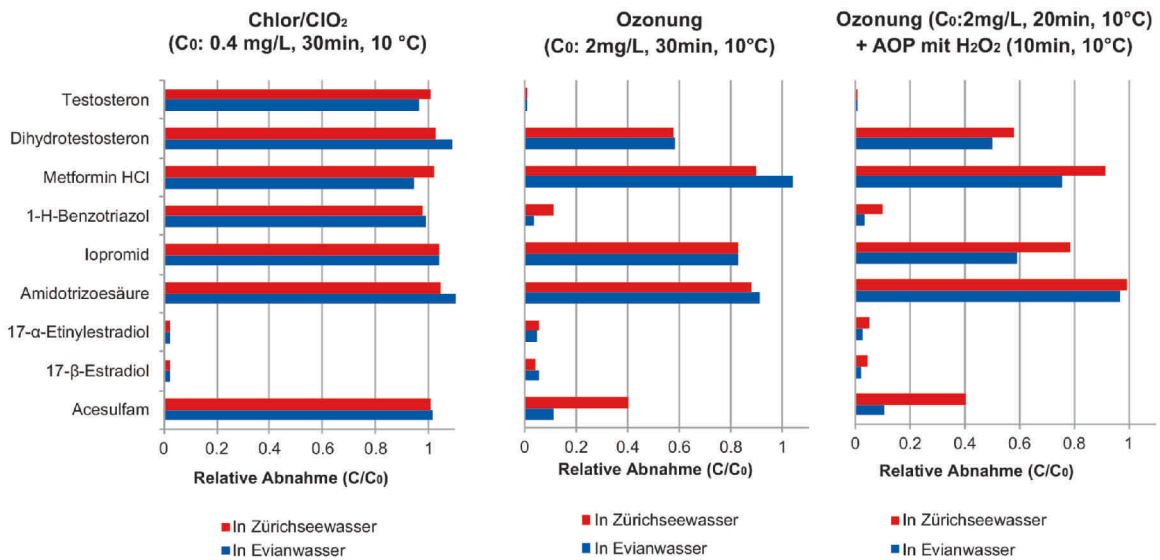


Fig. 5 Relative Abnahme (C/C<sub>0</sub>) der aufgestockten Spurenstoffe in Evian-Wasser und Zürichseewasser  
Réduction relative (C/C<sub>0</sub>) des micropolluants enrichis dans l'eau d'Evian et l'eau du lac de Zurich

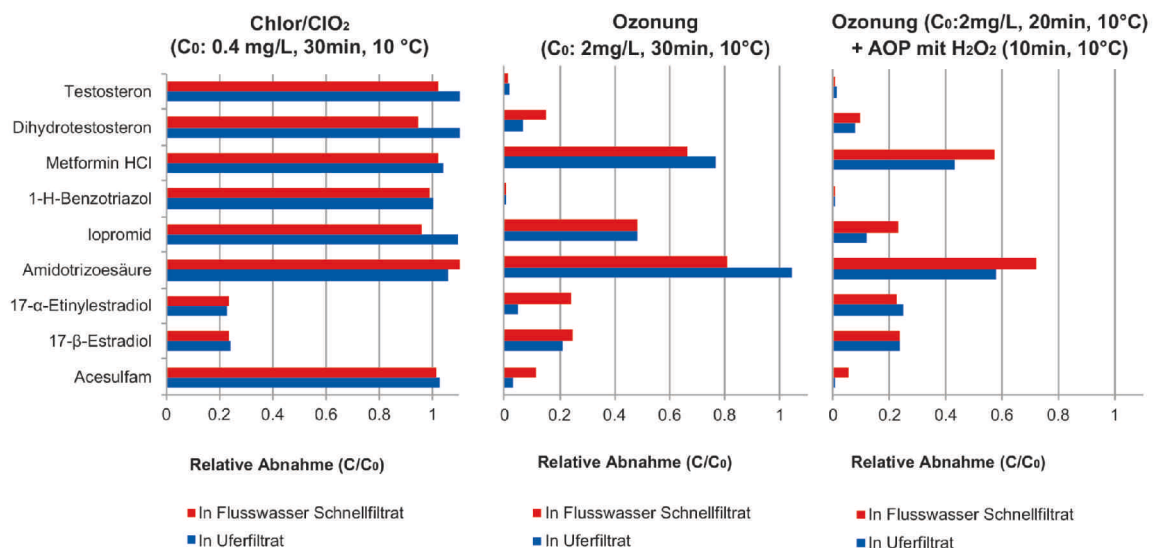


Fig. 6 Relative Abnahme (C/C<sub>0</sub>) der aufgestockten Spurenstoffe in Rheinwasser Schnellfiltrat und Uferfiltrat der Limmat  
Réduction relative (C/C<sub>0</sub>) des micropolluants enrichis dans l'eau du Rhin rapidement filtrée et de l'aquifère enrichi d'eau du Limmat

Chlorung etwa ein Drittel, nach Ozonung oder Ozonung + AOP knapp die Hälfte nachgewiesen werden (Tab. 4).

#### AMES-MPF

Keine der angereicherten *OxiScreen*-Proben zeigte einen mutagenen Effekt. Eine Probe gilt im *Ames*-MPF-Test dann als mutagen, wenn die Anzahl Reversionen höher als der Schwellenwert sind (*gestrichelte orange Linie*, Fig. 7), die-

ser Schwellwert ist testabhängig und wird durch die Negativkontrolle ermittelt. Eine Vorauswahl der eingesetzten Bakterien-Stämme (*PreScreen*) führte zu stabileren Ergebnissen (gegenüber dem Standardprotokoll), dies jedoch auf Kosten einer verlängerten Testdauer (ein zusätzlicher Arbeitstag).

Ausserhalb dieses Projekts wurden Ende 2014 und 2015 wiederholt unbehandelte Rheinwasserproben mittels *Ames*-MPF-

Test untersucht. Es konnten in vereinzelt Proben mutagene Wirkungen nachgewiesen werden, die sich jedoch bei Testwiederholung in keinem dieser Fälle bestätigte.

#### XENOSCREEN XL YES/YAS

Das getestete Produkt mit kürzerer Inkubationszeit (18 h) und *Lyticase*-Anwendung kam neu auf den Markt und war zu Beginn des Projekts noch nicht

Spurenstoff	Transformationsprodukte nach Chlorung		Transformationsprodukte nach Ozonung	
	Literatur Anzahl TPs	Gefundene TPs	Literatur Anzahl TPs	Gefundene TPs
17- $\beta$ -Estradiol	7	2 [29%]	7	5 [71%]
17- $\alpha$ -Ethinylestradiol	2	1 [50%]	8	3 [38%]
1H-Benzotriazol	Keine		2	1 [50%]
Metformin	2	0 [0%]	3	2 [67%]
Acesulfam K	Keine		3	0 [0%]
Amidotrizoensäure	Keine		Keine	
Dihydrotestosteron	Keine		Keine	
Testosteron	Keine		Keine	
Iopromid	Keine		Keine	
<b>Gesamt</b>	<b>10</b>	<b>3 [30%]</b>	<b>23</b>	<b>11 [48%]</b>

Tab. 4 Übersicht über die Anzahl der in der Literatur beschriebenen Transformationsprodukte (TP) und die mit der Screeningmethode gefundenen TP nach Chlorung respektive Ozonung [12–16]

Aperçu du nombre de produits de transformation (TP) décrits dans la littérature et détectés par la méthode de screening après chloration ou ozonation [12–16]

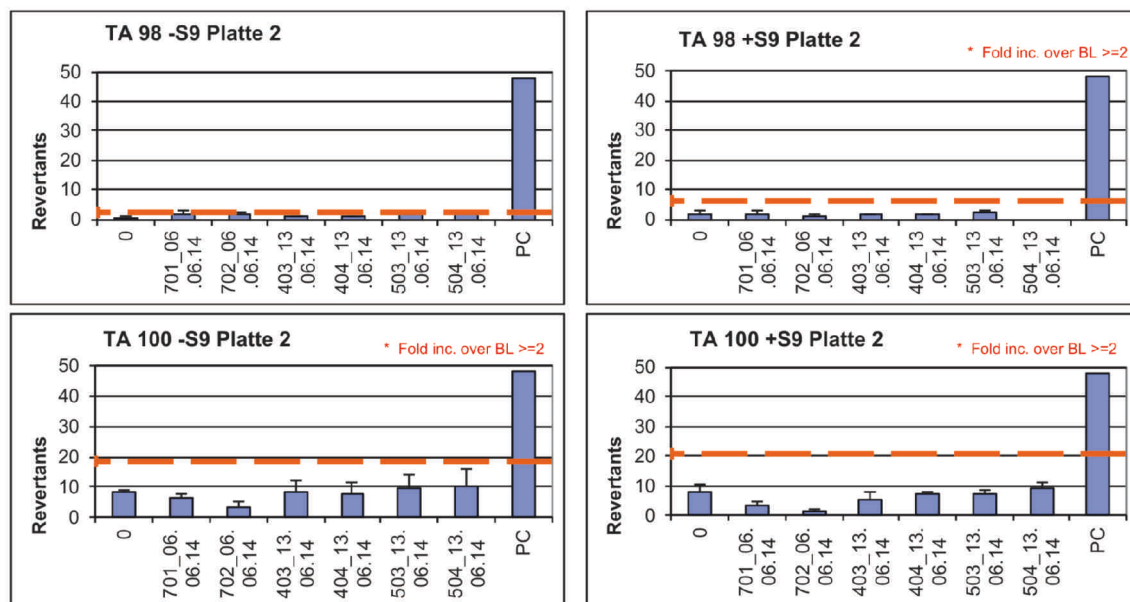


Fig. 7 Beispiel einer grafischen Auswertung der Ames-Testergebnisse von OxiScreen-Proben  
 0 = Negativ-Kontrolle; PC = Positiv-Kontrolle; TA98 und TA100 = E.coli-Stämme; S9 = Rattenleberextrakt.  
 Gestrichelte orange Linie = Schwellenwert für positiven mutagenen Befund

Exemple d'une évaluation graphique du test d'Ames sur les résultats d'échantillons d'OxiScreen  
 0 = contrôle négatif; PC = contrôle positif; TA98 et TA100 = souches E.coli; S9 = extrait de foie de rats.  
 Lignes orange pointillées = valeurs seuils pour présence de mutagènes

voll ausgereift. Die YES- und YAS-Agonist-Testsysteme waren brauchbar, die YES- und YAS-Antagonisten-Testsysteme überzeugten nicht (keine Quantifizierung durch Excel-Auswertemakro möglich). Eine bessere Standardisierung der Vorkultivierung der Hefezellen wäre aus unserer Sicht empfehlenswert, da stark unterschiedliche Zelldichten einen Einfluss auf die Messergebnisse haben können

[17]. Das Excel-Auswertemakro der Vertriebsfirma Xenometrix wertete alle Datenpunkte aus, die sich im Bereich des EC10 bis EC90 der Standardkurve befanden, auch wenn diese unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) lagen. Unterschiede in der Auswertung von verschiedenen YES-Testsystemen führen deshalb nicht immer zu denselben Ergebnissen [18]. Die Nachweisgrenze für den YES (EC10)

lag im besten Fall bei 1,5 ng/l EEQ und für den YAS (EC10) bei 37,8 ng/l DHTEQ.

#### A-YES; A-YAS

Die zu Beginn des Projekts auf den Markt gekommenen Testsysteme funktionierten insgesamt recht gut. Die Hefezellen wurden lyophilisiert geliefert und konnten nach kurzem Waschen und Reaktivieren verwendet werden. Unterschiedliche

Produktionschargen wuchsen allerdings nicht immer gleich gut, die Ursachen und ein Einfluss auf die Ergebnisse waren für die Anwender schwierig einzuschätzen. Bei signifikanten Abweichungen der Zelldichten in den Standardreihen wurde bei der Auswertung dafür ein Korrekturfaktor berechnet. Die mitgelieferten Estradiol-Standards waren teilweise nicht in Ordnung und verunmöglichten eine korrekte Auswertung ganzer Probenserien. Die Firma *new diagnostics* hat auf das Problem mit den Standards reagiert und verschickt nun anstelle der Lösungen in Wasser höherkonzentrierte in Ethanol. Insgesamt ist die Anwendung des Kits inklusive externer Auswertung relativ einfach und klar. Die Online-Auswertung übers Internet gestaltete sich aber teilweise mühsam, da das Programm auf dem externen Server langsam und nicht immer stabil lief. Oft gab es Abbrüche mit Verlust der eingegebenen Daten, die dann ein weiteres Mal eingegeben werden mussten. Die Nachweisgrenze für den A-YES (EC10) lag im besten Fall bei 5,7 ng/l EEQ und für den A-YAS (EC10) bei 25,7 ng/l DHTEQ.

#### PLANAR-YES

Die Ergebnisse des *planar*-YES liessen sich mit den Ergebnissen der anderen YES-Hefezellentests qualitativ und semiquantitativ vergleichen. Estrogene Aktivität kann damit sehr sensitiv nachgewiesen werden, mit Anreicherung über eine Festphase liegt die Nachweisgrenze bei 0,1 ng/l EEQ, bei direkt aufgetragenen Proben (500 µl) bei 2 ng/l EEQ. Trotz einer starken Reduktion der estrogenen Aktivität nach Oxidation der Probewässer wies das *planar*-YES-System in einigen Proben eine Restaktivität nach. Das Vorliegen von Artefakten liess sich dabei nicht in allen Fällen vollständig ausschliessen. Spots mit Autofluoreszenzen von unentwickelten Proben können dazu führen, dass die estrogene Gesamtaktivität überschätzt wird. Ein Vergleich zwischen unentwickelten und entwickelten Platten erlaubt jedoch ihre Unterscheidung. Ein fluoreszierender Indikatorfarbstoff scheint für solche Proben nicht die beste Wahl zu sein. Der *planar*-YES hat den grossen Vorteil, dass durch die Kopplung an die Dünnschichtchromatografie Informationen zu estro-

genaktiven Einzelsubstanzen gewonnen werden können. Ein ausführlicher Vergleich der Resultate des *planar*-YES mit den beiden anderen YES-Testsystemen ist im Abschlussbericht [19] der ZHAW zu finden.

#### HPTLC/AMD IN KOMBINATION MIT BIOLUMINESZENZDETEKTION

In der vergleichenden Auswertung (Fig. 8) ist ersichtlich, dass die toxischen Wirkungen auf den Stoffwechsel des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* mit einer Ausnahme (Rheinwasser Schnellfiltrat nach Chlorung) nach den Oxidationsbehandlungen abnahmen. Die grösste prozentuale Abnahme wurde mit der Kombination Ozonung + AOP erreicht (Fig. 9). Eine beispielhafte Polardiagramm-Darstellung der einzelnen Wirkungsbanden mit reziproken iso-Hemmvolmen (RIHV) für eine Uferfiltratsprobe vor und nach Oxidation ist in Fig. 10 zu sehen.

Der grösste Vorteil der Methode besteht darin, dass identifizierte Banden extrahiert und einer weitergehenden Analytik zugeführt werden können. Ein weiterer Vorzug der Hochleistungs-Dünnschicht-

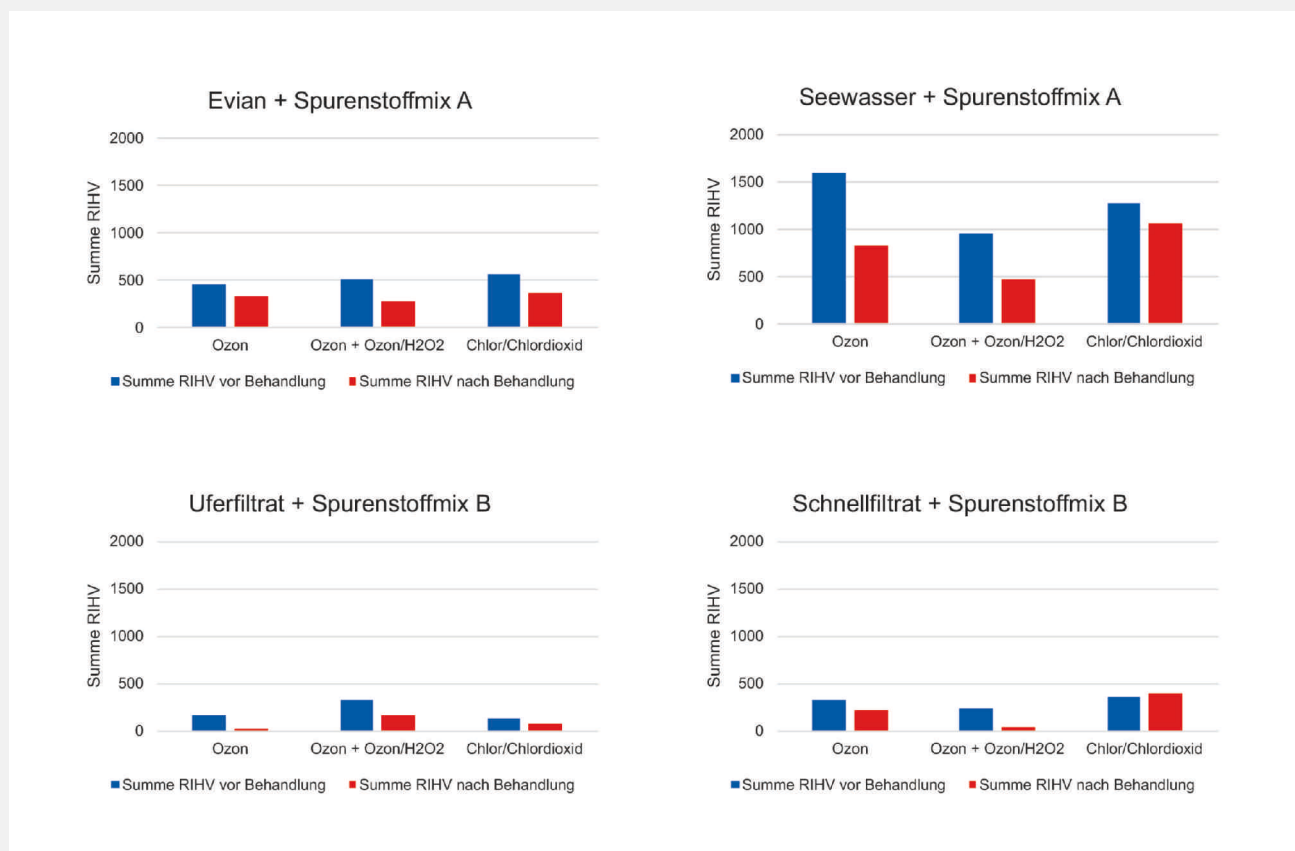


Fig. 8 Vergleich der Summe der reziproken iso-Hemmvolmen (RIHV) aller Hemmzonen vor und nach Oxidation der untersuchten Wässer mit dem aufgestockten Spurenstoffmix A und B (s. Tab. 2)

Comparaison de la somme des iso-volumes d'inhibition réciprocque (RIHV) de toutes les zones d'inhibition avant et après oxydation des eaux examinées et enrichies du mélange de micropolluants A et B (voir Tab. 2)

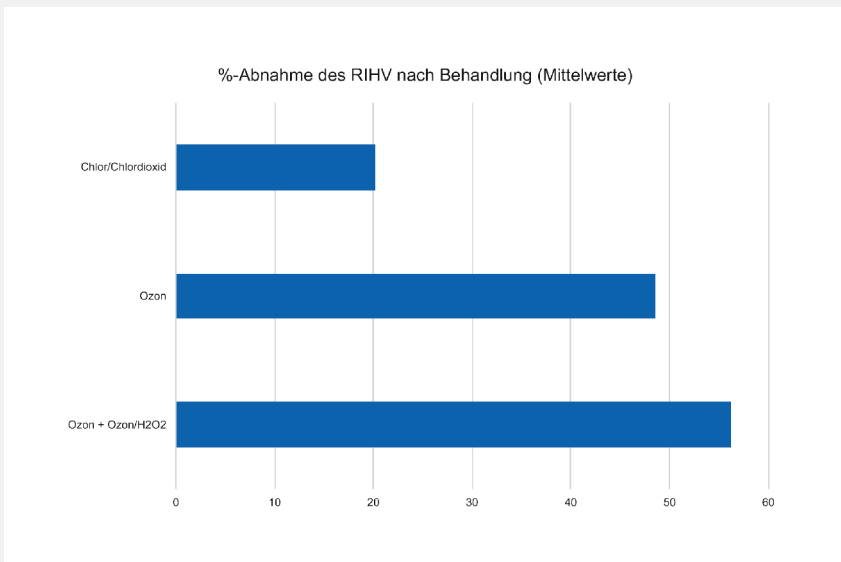


Fig. 9 Prozentuale Abnahme der Summe der reziproken iso-Hemmvolmen (RIHV) aller Hemmzonen nach den verschiedenen Oxidationsbehandlungen  
 Réduction en pourcentage de la somme des iso-volumes d'inhibition réciproque (RIHV) de toutes les zones d'inhibition en fonction des différents traitements d'oxydation

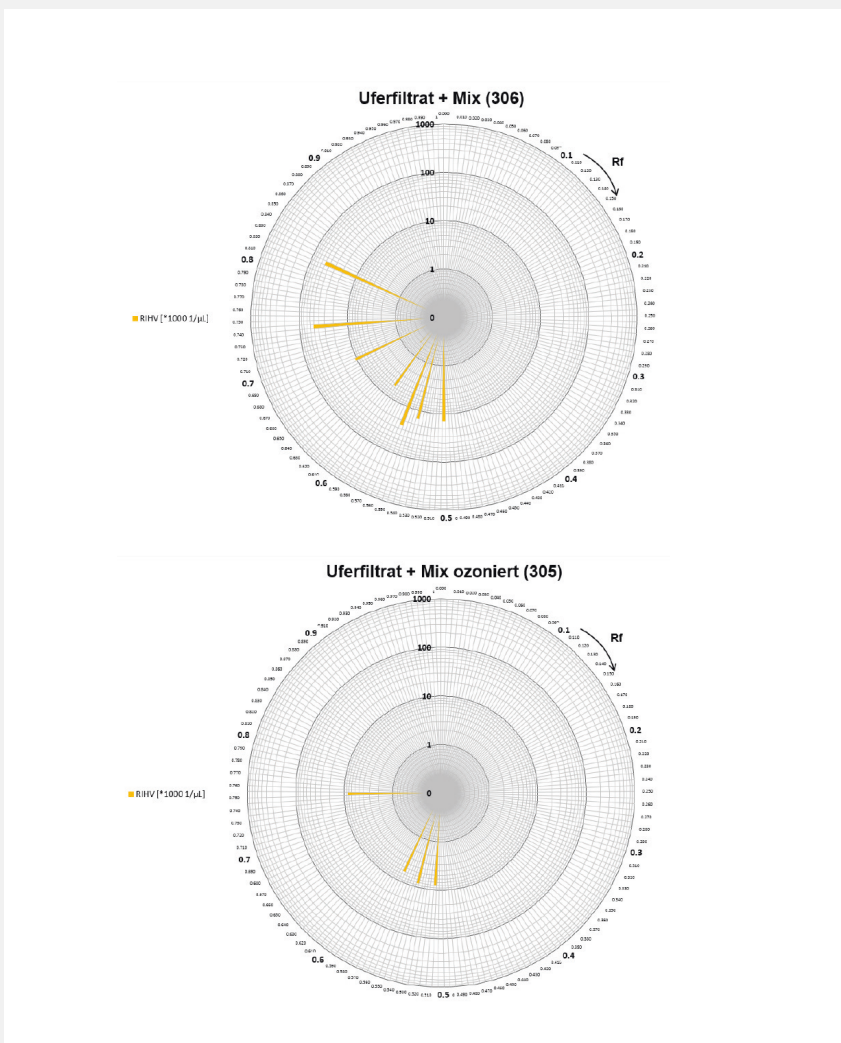


Fig. 10 Beispiel einer Darstellung der reziproken iso-Hemmvolmen (RIHV) vor und nach Ozonung einer Uferfiltratsprobe in einer Polardiagramm-Darstellung  
 Exemple d'une représentation des iso-volumes d'inhibition réciproque (RIHV) avant et après ozonation d'un échantillon de filtration par la rive par un diagramme polaire

chromatografie ist die grössere Matrixtoleranz im Vergleich zur Hochleistungs-Flüssigchromatografie (HPLC). Die automatische Mehrfachentwicklung (AMD) in Kombination mit einer Gradientenelution steigert die Trennleistung und hat einen fokussierenden Effekt auf die separierten Zonen. Die Fließmittel werden abgedampft und stören den nachfolgenden Biotest nicht. Die HPTLC/AMD- Biolumineszenzdetektion mit *Vibrio fischeri* ist um Grössenordnungen sensitiver als der standardisierte Küvettest nach DIN EN ISO 11348-1.

### SCHLUSSFOLGERUNGEN

Für die Wasserversorger ist es sehr beruhigend zu wissen, dass die angewendeten Oxidationsverfahren bei ihren Wässern zu einer Elimination oder zumindest Reduktion der gemessenen Wirkungen führen. Das effektivste Oxidationsverfahren in Bezug auf den Abbau des aufgestockten Spurenstoffmix ergab die Kombination Ozonung + AOP. Auch die toxischen Wirkungen auf den Stoffwechsel des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* wurden durch diese Behandlung am stärksten reduziert. Mutagene Wirkungen mittels Ames-MPF-Tests konnten in keinem der Probewässer nachgewiesen werden. Daraus kann man schliessen, dass aus den hier eingesetzten Verbindungen in Kombination mit dem angewendeten Oxidationsverfahren keine mutagenen Transformationsprodukte im messbaren Wirkungsbereich entstanden sind.

Die getesteten YES-, YAS-Tests der Firmen *Xenometrix* und *new diagnostics* wiesen zu Beginn des *OxiScreen*-Projekts noch Kinderkrankheiten auf, sind aber deutlich einfacher und schneller. Die Mikroplattensysteme sind automatisierbar (Pipettierautomaten, Mikroplattenreader) und brauchen nur Kleinstmengen an Probenvolumen und Reagenzien. Sehr tiefe Konzentrationen lassen sich mit diesen Testsystemen nur mit einem vorgängigen Anreicherungs-schritt bestimmen (Umweltqualitätsnorm von 17-alpha-Ethinylestradiol: 35 pg/l; Empfehlung des *Scientific Committee on Health and Environmental Risk*). Dies könnte problematisch sein, weil die Probenzusammensetzung durch den Anreicherungs-schritt potenziell verändert werden kann.

Die Entwicklung des planar-YES der ZHAW war zum Zeitpunkt des Projekts noch nicht abgeschlossen. Es konnte ge-



**DANKSAGUNG**

Ein grosses Dankeschön an alle Mitarbeitenden dieses Projekts: *Rahel Comte, Fiona Maager, Gabriella Siegrist, Michael Koss, Ingrid Grand, Jakob Helbing, Rolf Pfister, Mélanie Bertschinger, Marcel Leemann, Richard Wülser, Fabienne Eugster, Joël Jenzer, Beat Brüscheiler, Andrea Grimmer, Pascal Schmid, Stefan Weiss, Ruedi Winzenbacher.* Die Arbeit der WVZ und IWB wurde durch den Forschungsfonds Wasser – FOWA des Schweizerischen Verbandes des Gas- und Wasserfaches – SVGW teilfinanziert. Die Arbeit der ZHAW wurde finanziert vom BLV.

**ABKÜRZUNGEN**

AMD	automatische Mehrfachentwicklung
Ames-Test	Testverfahren, um chemische Mutagene zu identifizieren (nach Bruce Ames)
AOP	Advanced Oxidation Process
DHTEQ	Dihydrotestosterone Equivalent
DOC	organischer Kohlenstoff
EEQ	Estradiol Equivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatografie
LC	Flüssigchromatografie
MS	Massenspektrometrie
RIHV	reziprokes iso-Hemmolumen
YAS	Yeast Androgen Screen
YES	Yeast Estrogen Screen

zeigt werden, dass eine Differenzierung verschiedener Wirkstoffe mit diesem Verfahren möglich ist. In Bezug auf die Automatisierung ist dieses Testkonzept weniger weit als die vorgängig erwähnten Wirkungstests. In Bezug auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit hat sich der *planar-YES* seit dem Ende des *OxiScreen*-Projekts im Dezember 2015 nochmals stark weiterentwickelt. Die Kombination Dünnschichtchromatografie + Biotest hat auch das Potenzial, native Wasserproben in Zukunft direkt ohne vorherige Aufkonzentrierung verarbeiten zu können. Der Kombination von wirkungsbasiertem Biotest nach Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie mit automatisierter Mehrfachentwicklung (HPTLC/AMD) gehört sicherlich die Zukunft. Die Landeswasserversorgung (LW) nutzt

neben dem Leuchtbakterien-Hemmtest (basistoxische Wirkung) bereits einen Acetylcholinesterase-Hemmtest (neurotoxische Wirkung), einen *B. subtilis*-Hemmtest (antibiotische Wirkung), einen Umu-Test (gentoxische Wirkung) und einen YES-Test (östrogene Wirkung) [20]. Auch die ZHAW hat bereits erste Versuche durchgeführt, um weitere Biotests auf Dünnschichtplatten einsetzen zu können (umu-C-Test) [19].

**BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Aicher, L. (2012): *Microtox, Phase II-IV, Final Report. Studie für den Schweizerischen Verein des Gas- und Wasserfaches (SVGW)*
- [2] Flückiger-Isler, S.; Kamber, M. (2012): *Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames preincubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds. Mutation Research 747: 36–45*
- [3] Reifferscheid, G. et al. (2012): *International round-robin study on the Ames fluctuation test. Environmental and Molecular Mutagenesis 53(3): 185–197*
- [4] Routledge, E.J.; Sumpter, J.P. (1996): *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry 15(3): 241–248*
- [5] Fic, A.; Žegura, B.; Gramec, D.; Mašič, L.P. (2014): *Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. Chemosphere 112: 362–369*
- [6] Schönborn, A.; Grimmer, A.A. (2013): *Coupling Sample Preparation with Effect-Directed Analysis of Estrogenic Activity – Proposal for a New Rapid Screening Concept for Water Samples. Journal of Planar Chromatography 26(5): 402–408*
- [7] Spira, D.; Reifferscheid, G.; Buchinger, S. (2013): *Combination of High-Performance Thin-Layer Chromatography with a Specific Bioassay – A Tool for Effect-Directed Analysis. Journal of Planar Chromatography 26(5): 395–401*
- [8] Schulz, W. et al. (2008): *Use of Vibrio fischeri for Screening for Bioactivity in Water analysis. Journal of Planar Chromatography 21(6): 427–430*
- [9] Wülser, R. et al. (2013): *Oxidative Aufbereitung von Rheinwasser mit Ozon und Ozon/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AOP) im Labor und in einer Pilotanlage – Untersuchungen zum Abbau von Mikroverunreinigungen. Schlussbericht der IWB und WVZ*
- [10] Scheibner, O.; Bromirski, M.; Duczak, N.; Hemenway, T. (2011): *A Rapid Solution for Screening and Quantitating Targeted and Non-Targeted Pesticides in Water using the Exactive Orbitrap LC/MS. Bremen, San José: Thermo Fisher Scientific. Application Note: 535*

- [11] Uekötter, B. (2012): *Untersuchungen zur Entwicklung einer LC/MS-Methode für das Screening auf organische Spurenstoffe in Roh- und Reinwasser. Bachelorarbeit*
- [12] Huber, M.M.; Ternes, T.A.; von Gunten, U. (2004): *Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. Environmental Science & Technology 38(19): 5177–5186*

**> SUITE DU RÉSUMÉ**

haute performance (HPTLC), avec des systèmes de test biologiques, peuvent permettre dans l'idéal la détection de substances actives individuelles et une analyse secondaire.

Dans le projet *OxiScreen*, les questions suivantes ont été traitées: Les kits de test les plus récents pour la détection des perturbateurs endocriniens et mutagène sont-ils pratiques sur le terrain? Peut-on comparer les résultats des tests basés sur les cellules modifiées de levure (*XenoScreen XL YES, A-YES*) avec le système de test *planar-YES* en développement? Avec quelle efficacité sont appliqués les processus d'oxydation à un mélange de micropolluants (incl. perturbateurs endocriniens) dans les eaux naturelles? Une activité œstrogénique résiduelle est-elle détectable après traitement à l'ozone dans ces eaux? Les produits de transformation peuvent-ils être détectés dans des conditions d'oxydation pratiques avec chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse (LC/MS)? Comment agit le processus d'oxydation sur le métabolisme de la bactérie *Vibrio fischeri* luminescente? Les résultats du *planar-YES* se laisseraient comparer qualitativement et semi-quantitativement avec les résultats des autres tests de cellules de levure. Le *planar-YES* a le grand avantage, celui de permettre l'acquisition d'informations à travers le couplage à la HPTLC sur des substances individuelles actives sur l'œstrogène. Le procédé d'oxydation le plus efficace par rapport à la dégradation de mélanges de micropolluants est donné en combinant traitement à l'ozone + AOP. Les effets toxiques sur le métabolisme de la bactérie *V. fischeri* luminescente ont été réduits au maximum par ce traitement. Aucun effet mutagène n'a pu être détecté dans l'un des échantillons d'eau.

- [13] Maniero, M.G.; Bila, D.M.; Dezotti, M. (2008): Degradation and estrogenic activity removal of 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol by ozonation and  $O_3/H_2O_2$ . *Science of the Total Environment* 407(1): 105–115
- [14] Larcher, S.; Delbès, G.; Robaire, B.; Yargeau, V. (2012): Degradation of 17alpha-ethinylestradiol by ozonation – identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. *Environment International* 39(1): 66–72
- [15] Pereira, R.O.; Postigo, C.; de Alda, M.L.; Daniel, L.A.; Barceló, D. (2011): Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere* 82(6): 789–799
- [16] Happel, O.; Armbruster, D.; Scheurer, M.; Schmidt, T.C.; Brauch, H.J. (2015) Untersuchungen zur Umsetzung des Antidiabetikums Metformin bei der Wasserdeseinfektion durch Chlor. *Vom Wasser* 113: 96–99
- [17] Tiehm, A.; Huber, A.; Stange, C. (2015) Der Yeast-Estrogen-Screen (YES)-Assay: Evaluierung und Anwendung. Abschlussbericht, DVGW-Technologiezentrum Wasser, Band 68, ISSN: 1434–5765
- [18] Wagner, M. et al. (2013): Deriving bio-equivalents from in vitro bioassays: assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(8): 1906–1917
- [19] Grimmer, A.; Schmid, P.; Schönborn, A. (unveröffentlicht): HPTLC als Plattform für Bioassays im Lebensmittelsektor. Estrogene Aktivität von Oxidierungsprodukten (planar-YES) und Erweiterung auf zwei andere Testorganismen. Abschlussbericht ZHAW, IUNR, Forschungsgruppe Ökotechnologie
- [20] Winzenbacher, R.; Seitz, W.; Schulz, W. (2015): Bedeutung der Spurenstoffanalytik für die Wasserversorgung – Was, Wie, Warum? LW-Schriftenreihe, Jahresbericht



**Continental**  
The Future in Motion

**AQUAPAL®**

Der Beste fürs Trinkwasser

Der hochflexible Trinkwasserschlauch AQUAPAL® erfüllt höchste Anforderungen an Reinheit und Hygiene:

- ▶ Absolut geruchs- und geschmacksneutral
- ▶ Hochtemperaturbeständig und dämpfbar
- ▶ Resistent gegen handelsübliche Reinigungs- und Desinfektionsmittel sowie alle Desinfektionschemikalien gemäß DVGW-W291
- ▶ Für den Einsatz im Freien zugelassen
- ▶ Erfüllt alle Anforderungen der Trinkwasserverordnung
- ▶ FDA-konform, WRAS-geprüft
- ▶ 3 Jahre Garantie



Industrial Fluid Systems

**ContiTech**