

Stefanie Kahl

Beurteilung der Spurenstoffelimination in Pflanzenkläranlagen mittels Indikator- substanzen und Neubewertung der Bioabbaubarkeit von Acesulfam

**Beurteilung der Spurenstoffelimination in
Pflanzenkläranlagen mittels Indikatorsubstanzen und
Neubewertung der Bioabbaubarkeit von Acesulfam**

Von der Fakultät für Chemie und Mineralogie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Stefanie Kahl, M. Sc.

geboren am 04. August 1988 in Dresden

Angenommen aufgrund der Gutachten von:

Prof. Dr. Thorsten Reemtsma

Prof. Dr. Martin Jekel

Tag der Verleihung: 05. April 2019

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2013 bis September 2018 am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ im Department Analytik unter Leitung von Prof. Dr. Thorsten Reemtsma angefertigt.

Die Dissertation basiert auf zwei veröffentlichten Fachartikeln in Peer-Review Zeitschriften und wird durch bisher nicht veröffentlichte, entsprechend kenntlich gemachte Ergebnisse ergänzt.

Publikation 1

Kahl, S., Nivala, J., van Afferden, M., Müller, R. A., Reemtsma, T. Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators, *Water Research*, **2017**, 125, 490-500. © 2017 Elsevier

Publikation 2

Kahl, S., Kleinsteuber, S., Nivala, J., van Afferden, M., Reemtsma, T. Emerging biodegradation of the previously persistent artificial sweetener acesulfame. *Environmental Science & Technology*. **2018**, 52 (5), 2717-2725. © 2018 American Chemical Society

Elsevier und die American Chemical Society gestatten den Autoren die Verwendung der Artikel in Dissertationen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mit ihrem Engagement das Promotionsprojekt voran gebracht und so zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Reemtsma für die Begleitung dieser Promotion. Ich danke Ihnen für Ihre stete Diskussionsbereitschaft, Ihr Vertrauen und die ausgezeichnete Zusammenarbeit während dieser Zeit. All dies hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Monika Möder, Frau Dr. Jaime Nivala und Frau Dr. Sabine Kleinsteuber für die engagierte Betreuung. Ohne eure stets bereitwillig zur Verfügung gestellte Expertise, eure ansteckende Motivationsgabe und Begeisterung für das Thema hätte es die Arbeit in dieser Form nicht gegeben.

Ein großer Dank gilt Frau Gabriele Strenge für die Unterstützung bei den Analysen der Indikatorsubstanzen und die Betreuung einiger langwieriger Laborversuche. Deine humorvolle Art hat auch diese nie langweilig werden lassen und dein großer Erfahrungsschatz sowie deine Hingabe waren für mich eine wahre Inspiration.

Darüber hinaus möchte ich mich natürlich auch bei allen weiteren Beteiligten aus verschiedenen Departments des UFZ für ihren Einsatz bedanken, besonders bei Frau Katy Bernhard, Herrn Johannes Boog, Frau Grit Weichert und dem restlichen Langenreichenbach-Team sowie bei Frau Steffi Schrader und Frau Ute Lohse. Ebenso danke ich Herrn Volker Dreher und seinem Team für die Unterstützung bei Untersuchungen der Kläranlage des Abwasserzweckverbandes Heidelberg.

Herzlich bedanken möchte ich mich zuletzt bei allen Mitarbeitern des Departments Analytik für die große Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Meinen Mitdoktoranden danke ich darüber hinaus für den fachlichen Austausch und die großartige Zeit, im Büro, im Labor sowie auf Dienstreisen.

Bibliografische Beschreibung

Kahl, Stefanie

Beurteilung der Spurenstoffelimination in Pflanzenkläranlagen mittels Indikatorsubstanzen und Neubewertung der Bioabbaubarkeit von Acesulfam

Universität Leipzig, Fakultät für Chemie und Mineralogie

Dissertation

195 Seiten, 11 Abbildungen, 14 Tabellen, 170 Literaturstellen

Kurzfassung

Anthropogene organische Spurenstoffe können trotz geringer Konzentrationen (ng/L – µg/L) ein Risiko für die aquatische Umwelt darstellen. Sie sollten daher möglichst während der Abwasserbehandlung entfernt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung verschiedener Pflanzenkläranlagen und Bodenfilter, prominente Kleinkläranlagentypen, hinsichtlich des Potentials zur Entfernung organischer Spurenstoffe in gemäßigten Klimazonen überprüft.

Hierzu wurden zunächst sieben repräsentative Vertretersubstanzen als Prozessindikatoren für Bioabbau ausgewählt und ein spurenanalytisches Verfahren zur Quantifizierung in Abwasser entwickelt. Klassische Abwasserparameter und die Indikatoren wurden in fünf Pflanzenkläranlagen und einem Bodenfilter (Pilot-Maßstab) über ein Jahr (Publikation 1) analysiert. Dadurch konnten vorteilhafte Betriebsbedingungen zur Elimination (aerob) bioabbaubarer Spurenstoffe identifiziert werden. Außerdem hing die Reinigungsleistung stark vom dem Grad der Intensivierung ab. Anlagen mit aktiver Belüftung zeigten eine hohe Reinigungsleistung geringer Saisonalität, auch für die Indikatoren. Weitergehende Untersuchungen an Anlagen dieses Typs ergänzten die Erkenntnisse bzgl. der Performance über das Jahr um Erkenntnisse zur Anlaufzeit nach Inbetriebnahme und der Reaktion auf Havarien (Resilienz).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bioabbaubarkeit des Süßstoffs Acesulfam näher untersucht (Publikation 2). Vor Beginn der Arbeiten wurde dieser als persistent beschrieben. Die Ergebnisse zur Acesulfam-Entfernung in neun deutschen Kläranlagen sowie zum zeitlichen Verlauf der Acesulfam-Fracht in zwei deutschen Flüssen zeigten jedoch, dass die Entfernung von Acesulfam während der Abwasserbehandlung inzwischen verbreitet ist. Mittels Literaturdaten und eigenen Ergebnissen gelang zum ersten Mal eine Eingrenzung des Zeitraums der Entwicklung dieser Abbaufähigkeit. Außerdem wurde erstmals festgestellt, dass Acesulfam von Mikroorganismen katabolisch abgebaut wird, also als Kohlenstoffquelle dient. Ebenso konnten erstmalig Mikroorganismen identifiziert werden, die am Abbau beteiligt sein könnten. Weitergehende Untersuchungen ließen vermuten, dass mehreren Spezies der Familie *Bradyrhizobiaceae* dabei die größte Bedeutung zukommt.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass sich in (bepflanzten) Bodenfiltern bei geeigneten Betriebsbedingungen mikrobielle Gemeinschaften etablieren, die eine Vielzahl aerob bioabbaubarer Substanzen, inkl. anthropogener Spurenstoffe, abbauen können. Zudem deutet sich an, dass durch Adaptationsprozesse die Anzahl entfernbarer Substanzen perspektivisch weiter steigen und die Spurenstofffracht in Kläranlagenabläufen so weiter reduziert werden könnte.

Bibliographic description

Kahl, Stefanie

Assessment of micropollutants removal in treatment wetlands using indicator compounds and re-evaluation of acesulfame biodegradability

University of Leipzig, Faculty of Chemistry and Mineralogy

PhD thesis

195 Pages, 11 Figures, 14 Tables, 170 References

Abstract

Although occurring in low concentrations (ng/L – µg/L), anthropogenic trace organic compounds can pose a risk to the aquatic environment. They should therefore be removed during wastewater treatment. The present work investigated the potential of treatment wetlands, commonly used decentralized treatment systems, to remove anthropogenic trace organic compounds from (municipal) wastewater in temperate climates.

Firstly, seven representative substances acting as process indicator compounds for biodegradation were chosen and a trace-analytical method for quantitative determination in wastewater was developed. Standard water quality parameters and the indicator compounds were then analysed in influent and effluent of six steady-state treatment wetlands (pilot-scale) for one year (publication 1). Thus, beneficial conditions for eliminating (aerobically) biodegradable compounds, including trace organic compounds, were identified and a strong link between the overall treatment efficacy and the degree of intensification was observed. Aerated treatment wetlands showed most efficient and robust removal, even of the indicator compounds. Further studies on systems of this type provided insights into resilience and start-up time behaviour.

In the second part of this work the biodegradability of the artificial sweetener acesulfame was investigated (publication 2). This compound was often characterized as persistent. However, removal in nine German wastewater treatment plants and mass load decrease in two German rivers over the last years illustrated that acesulfame removal is now widespread in wastewater treatment. Along with literature data these results allowed narrowing down the time period during which the ability to biodegrade acesulfame likely evolved. It was proven for the first time that the pathway for acesulfame degradation is catabolic, which means that microorganisms use this compound as a source of carbon. Moreover, a first suggestion on which microorganism might be involved in acesulfame degradation could be made. Further studies suggested that several species of the family *Bradyrhizobiaceae* might be particularly important.

The results of the present work indicate that treatment wetlands are capable of efficiently removing (aerobically biodegradable) anthropogenic trace organic compounds: Under appropriate operating conditions microbial communities metabolizing such compounds can establish. The research on acesulfame moreover illustrated that microbial communities can adapt to new conditions and metabolize new xenobiotics. In the long term, this would increase the efficacy of treatment wetlands, which would further reduce the mass load of trace compounds present in the outlet and their discharged into the environment.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Danksagung	II
Bibliografische Beschreibung	III
Bibliographic description	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	VII
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Allgemeine Grundlagen	4
2.1. Abwasserbehandlung	4
2.1.1. Reinigungsstufen und –prozesse	5
2.1.2. Pflanzenkläranlagen und konventionelle Kläranlagen	7
2.2. Anthropogene Spurenstoffe	11
2.2.1. Studien zur Elimination anthropogener Spurenstoffe in Pflanzenkläranlagen.....	12
2.2.2. Indikatorsubstanzen.....	16
2.2.3. Markersubstanz Acesulfam.....	18
2.3. Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie	19
3. Reinigungsleistung der ausgewählten Pflanzenkläranlagen	21
3.1. Methoden	21
3.1.1. Anlagenbeschreibung und Durchführung der Studie	21
3.1.2. Entwicklung und Validierung der HPLC-MS/MS-Methode	26
3.1.3. Umgang mit linksseitig zensierten Daten	41
3.2. Ergebnisse und Diskussion	43
3.2.1. Einfluss des Designs und der Betriebsbedingungen auf die Reinigungsleistung von Pflanzenkläranlagen (Zusammenfassung Publikation 1).....	43
3.2.2. Untersuchungen zur Anlaufphase modifizierter belüfteter Anlagen	49
3.2.3. Resilienz von etablierten belüfteten Anlagen.....	56
3.3. Fazit	61
4. Bioabbau von Acesulfam	64
4.1. Methoden	64
4.1.1. Nachweis des Bioabbaus.....	64

4.1.2.	Erste Versuche zur Anreicherung ACE-abbauender Mikroorganismen	66
4.1.3.	Gewinnung definierter Mischkulturen	67
4.2.	Ergebnisse und Diskussion	69
4.2.1.	Untersuchungen zur Verbreitung des Acesulfam-Bioabbaus (Zusammenfassung Publikation 2)	69
4.2.2.	Anreicherung Acesulfam-abbauender Mikroorganismen im Säulenexperiment.....	75
4.2.3.	Abbau in definierten Mischkulturen	78
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	83
6.	Originalarbeiten.....	86
6.1.	Publikation 1	86
6.2.	Publikation 2.....	105
Literaturverzeichnis		i
Abbildungsverzeichnis		xv
Tabellenverzeichnis		xvii
Anhang.....		xix

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

ACE	Acesulfam
CBOD ₅	Biochemischer Sauerstoffbedarf, der innerhalb von fünf Tagen zum Abbau kohlenstoffhaltiger Verbindungen benötigt wird (<i>engl. five-day carbonaceous biochemical oxygen demand</i>)
BTZ	Benzotriazol
CAF	Coffein (<i>engl. caffeine</i>)
CBZ	Carbamazepin
DCL	Diclofenac
DN	Gehalt gebundenen, gelösten Stickstoffs (<i>engl. dissolved nitrogen</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Gehalt gelösten Sauerstoffs (<i>engl. dissolved oxygen</i>)
DOC	Gehalt gelösten organischen Kohlenstoffs (<i>engl. dissolved organic carbon</i>)
DSMZ	Leibniz-Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC	Elektrische Leitfähigkeit (<i>engl. electrical conductivity</i>)
E _H	Redoxpotential
ESI	Elektrospray-Ionisation (<i>engl. electrospray ionization</i>)
EW	Einwohnerwerte
H50p	Pflanzenkläranlage, horizontal durchströmt, 50 cm tief, bepflanzt
HA	Pflanzenkläranlage, horizontal durchströmt, komplett belüftet
HAp	Pflanzenkläranlage, horizontal durchströmt, komplett belüftet, bepflanzt
HM	Pflanzenkläranlage, horizontal durchströmt, belüftet zwischen 0 – 40% sowie 70 – 100% der Länge, bepflanzt
HMc	Pflanzenkläranlage, horizontal durchströmt, komplett belüftet, bepflanzt
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (<i>engl. high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
HRT	Hydraulische Verweilzeit (<i>engl. hydraulic residence time</i>)
IBU	Ibuprofen
IS	Interner Standard bzw. interne Standards
LC	Flüssigkeitschromatografie
LOD	Nachweisgrenze (<i>engl. limit of detection</i>)

LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>engl. limit of quantification</i>)
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NH ₄ -N	Stickstoff stammend aus Ammonium
NO ₃ -N	Stickstoff stammend aus Nitrat
NO _x -N	Summe der aus Nitrat und Nitrit stammenden Menge Stickstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
Q	Volumenstrom
R	Kleinkläranlage mit unbepflanztem Bodenfilter, alternierende Beschickung der zwei Kammern
RC	regenerierte Cellulose
RP	Umkehrphase (<i>engl. reversed phase</i>)
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>engl. ribosomal ribonucleic acid</i>)
RSD	relative Standardabweichung (<i>engl. relative standard deviation</i>)
SA	Amidosulfonsäure (<i>engl. sulfamic acid</i>)
SEP	Absetzbecken (<i>engl. septic tank</i>) der Pilotanlage Langenreichenbach
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (<i>engl. signal-to-noise ratio</i>)
TN	Gehalt organisch und anorganisch gebundenen Stickstoffs in unfiltrierter Probe (<i>engl. total nitrogen</i>)
TOC	Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs (<i>engl. total organic carbon</i>)
TSS	Gehalt suspendierter Feststoffe (<i>engl. total suspended solids</i>)
VA	Pflanzenkläranlage, vertikal durchströmt, belüftet
VAp	Pflanzenkläranlage, vertikal durchströmt, belüftet, bepflanzt (<i>Phragmites australis</i>)
VGp	Pflanzenkläranlage, Kiesbett, vertikal durchströmt, bepflanzt
VGp + VSp	zweistufige Pflanzenkläranlage bestehend aus Becken mit Kiesbett und nachgeschaltetem Sandfilter, beide vertikal durchströmt und bepflanzt
VSp	Pflanzenkläranlage, Sandbett, vertikal durchströmt, bepflanzt

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (Richtlinie 2000/60/EG) sieht zum Schutz der aquatischen Umwelt unter anderem die sukzessive Reduzierung der Belastung mit Stoffen vor, die „ein erhebliches Risiko für oder durch die aquatische Umwelt darstellen“ (European Parliament and Council 2000). Zu diesen zählen die sogenannten prioritären Stoffe (Richtlinie 2000/60/EG, Anhang X). Dies sind anthropogene Substanzen teils sehr geringer Umweltkonzentration (ng/L – µg/L), die aufgrund risikobezogener Bewertungen als bedenklich eingestuft werden (European Parliament and Council 2000, 2013). Allerdings können auch bisher nicht als prioritär eingestufte anthropogene Spurenstoffe, z. B. Pharmaka, als Einzelsubstanz (Escher *et al.* 2011, Fent *et al.* 2006) oder durch Mischungstoxizität (ECETOC 2001, European Commission 2012) ein Risiko darstellen. Dazu kommt, dass anthropogene Spurenstoffe kontinuierlich in die Umwelt eingetragen werden, was zur Akkumulation und möglicherweise dem Erreichen toxikologisch relevanter Konzentrationen führen kann. Dem Vorsorgeprinzip folgend sollte entsprechend die Freisetzung möglichst vieler dieser Substanzen vermieden oder wenigstens vermindert werden.

Abwasser enthält zahlreiche anthropogene Spurenstoffe und gilt als eine der Haupteintragsquellen anthropogener Spurenstoffe in die Umwelt. Der Abwasserbehandlung kommt daher eine wichtige Rolle bei der Reduzierung der Freisetzung dieser Substanzen zu. Kläranlagen sind jedoch bisher nicht für die Entfernung dieser speziellen, gering konzentrierten Stoffe ausgelegt, sodass in den letzten Jahren intensiv an der „vierten Reinigungsstufe“ zur Elimination anthropogener Spurenstoffe geforscht wurde (Abegglen & Siegrist 2012, Imhoff *et al.* 2018, Umweltbundesamt 2015, Wang & Wang 2016). Bisher vielversprechende Verfahren, wie Oxidations- und Adsorptionstechniken, sind allerdings kosten-, energie- und wartungsintensiv und deswegen nur bei großen Anlagen wirtschaftlich. Nichtsdestotrotz sind anthropogene Spurenstoffe auch in Regionen relevant, die auf dezentrale Abwasserbehandlung über Kleinkläranlagen angewiesen sind. Beispiele hierfür sind abgelegene Siedlungen (Gujer 2007) oder Gebiete, in denen aufbereitetes Abwasser (ortsnah) wiederverwendet wird (Tchobanoglous 2014). Anthropogene Spurenstoffe gelangen auch hier ins Abwasser und bei unzureichender Aufbereitung in die Umwelt. Die Effektivität der Entfernung dieser Substanzen durch Kleinkläranlagen muss daher untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

Pflanzenkläranlagen zählen zu den prominentesten Vertretern von Systemen, welche zur Aufbereitung häuslichen Abwassers weniger Einwohner als Kleinkläranlagen eingesetzt werden. Erste Systeme wurden Mitte des 20. Jahrhunderts in Europa entwickelt und seit den 1980er Jahren weltweit in zunehmendem Maße eingesetzt. Sie gelten heute als zuverlässige und

geeignete Systeme zur Abwasserreinigung (Kadlec & Wallace 2009, Vymazal 2011). Die Entfernung von anthropogenen Spurenstoffen, hauptsächlich Pharmaka, wurde bereits mehrfach in unterschiedlichsten Typen von Pflanzenkläranlagen untersucht (Conkle *et al.* 2008, Hijosa-Valsero *et al.* 2011a, Matamoros *et al.* 2007, Reyes-Contreras *et al.* 2012). Das Studiendesign unterschied sich dabei oft gravierend, z. B. hinsichtlich der Beschickungsmatrix, der analysierten Substanzen oder der Größe, der Art und des Zustands der Anlagen. Dies limitiert die Vergleichbarkeit der Studien bzw. eine Verallgemeinerung der Erkenntnisse. Außerdem wurde die Stabilität der Spurenstoffelimination gegenüber saisonalen Änderungen (Robustheit) kaum überprüft. Vermutlich ließen die oft große Analytauswahl und der damit verbundene hohe analytische Aufwand die notwendigen längerfristigen Untersuchungen mit engmaschiger Beprobung nicht zu. Die Auswahl aussagekräftiger Substanzen würde die Analytanzahl begrenzen und so einen höheren Probendurchsatz ermöglichen.

Ein geeignetes Konzept zur Reduktion der Analytanzahl wäre die Verwendung von Prozessindikatoren: Zur Einschätzung der Entfernungsleistung eines Prozesses, z. B. Bioabbau oder Adsorption, werden nur einige ausgewählte Substanzen analysiert. Diese repräsentieren jeweils Verbindungen gleichen Verhaltens unter den gegebenen Bedingungen, wie bspw. dem Redoxmilieu. Das prinzipielle Verhalten der Indikatorsubstanzen während eines Entfernungsprozesses und möglicher Umgebungsbedingungen sollte gut charakterisiert sein (Jekel *et al.* 2015). Aus dem Entfernungsgrad der Indikatoren kann dadurch auf Bedingungen innerhalb des untersuchten Systems geschlossen werden. Bei der Auswahl geeigneter Substanzen ist zu beachten, dass sich die generelle biologische Abbaubarkeit einer Substanz mit der Zeit verändern kann: Die Entwicklung von Stoffwechselwegen (mikrobielle Adaptation) für anthropogene Spurenstoffe (Xenobiotika) wurde wiederholt beobachtet (Copley 2009). Der übliche Grad der Bioabbaubarkeit eines Indikators für geringe oder mäßige Bioabbaubarkeit sollte daher regelmäßig überprüft werden. Gegebenenfalls ist dieser zu korrigieren sowie essentielle Randbedingungen aufzuklären, um reale Systeme weiterhin akkurat über die Elimination von Indikatorsubstanzen charakterisieren zu können. Mit der Hochleistungsflüssigkeits-chromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS, *engl. high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) steht eine selektive und sensitive Analysenmethode für das Monitoring anthropogener Spurenstoffe zur Verfügung (Jekel *et al.* 2015, Reemtsma *et al.* 2016, Richardson & Temes 2018, Wang & Wang 2016). Multianalytmethoden erlauben die Quantifizierung einer Vielzahl von Substanzen mit nur einer Injektion, wodurch die Analysenzeit verkürzt werden kann.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus den Erfordernissen der Reduzierung des Eintrages anthropogener Spurenstoffe in die Umwelt sowie der Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt, auch in Regionen mit dezentraler Abwasseraufbereitung.

Zunächst sollten geeignete Prozessindikatorsubstanzen ausgewählt und für diese Substanzen eine HPLC-MS/MS-Analysenmethode entwickelt werden. Anschließend sollten die Konzentrationen der Prozessindikatoren in Zu- und Ablaufproben verschiedener, parallel betriebener und mit dem gleichen kommunalen Abwasser beschickten Pflanzenkläranlagen (Pilot-Maßstab) bestimmt werden. Regelmäßige Analysen über ein komplettes Jahr sollten die saisonale Veränderlichkeit der Reinigungsleistung (Robustheit) der Systeme zugänglich machen und Vergleiche der unterschiedlichen Systemtypen erlauben. Außerdem sollten vorteilhafte (Betriebs-) Bedingungen für die Elimination dieser Substanzen ermittelt werden, z. B. um später eine gezielte Anpassung oder Weiterentwicklung der Anlagen und ihres Betriebes zu ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte gezielt das Verhalten des Süßstoffs Acesulfam untersucht werden. In Voruntersuchungen wurde für diesen merkliche Elimination in einigen Anlagen festgestellt, obgleich in der Literatur wiederholt Persistenz während biologischer Reinigungsprozesse berichtet wurde. Hierzu sollte einerseits untersucht werden, inwieweit Acesulfam in den unterschiedlichen Pflanzenkläranlagen eliminiert wird und welche Bedingungen die Entfernung begünstigen. Andererseits sollten Laborstudien zum mikrobiellen Abbau durchgeführt und analytisch verfolgt werden, um bspw. Transformationsprodukte sowie relevante Spezies zu identifizieren.

Die untersuchten Anlagen waren Teil einer Forschungsanlage, welche vom Umwelt- und Biotechnologischen Zentrum (UBZ) betrieben und gemeinsam untersucht wurde. Mikrobiologische Studien wurden in Zusammenarbeit mit dem Department Umweltmikrobiologie (UMB) durchgeführt.

2. Allgemeine Grundlagen

2.1. Abwasserbehandlung

Unter dem Begriff Abwasser werden Schmutzwasser, welches im Wasserhaushaltsgesetz (WHG 2009) als „durch häuslichen, gewerblichen, landwirtschaftlichen oder sonstigen Gebrauch in seinen Eigenschaften verändertes Wasser“ definiert ist, sowie Niederschlagswasser und ungewollt in die Kanalisation eindringendes Wasser (Fremdwasser) zusammengefasst (Imhoff *et al.* 2018). Abwasser enthält gelöste und ungelöste Stoffe, organische und anorganische Verbindungen, Mikroorganismen und Viren (Geller & Höner 2003, Imhoff *et al.* 2018). Laut der deutschen Abwasserverordnung (AbwV 1997) ist es Aufgabe der Abwasserbehandlung die Schmutz- und vor allem Schadstofffracht des Abwassers zu reduzieren, bevor es in ein Gewässer eingeleitet werden darf. Gleiches muss natürlich auch für Abwasser gelten, welches wiederverwendet werden soll, bspw. zur Bewässerung von Feldfrüchten, wie es in ariden und semi-ariden Regionen aus Mangel an Süßwasservorräten zunehmend praktiziert wird. Die genauen Anforderungen an die Qualität der verwendeten Abwässer werden dabei länderspezifisch definiert (Al Baz *et al.* 2008, Bischel *et al.* 2012, Kellis *et al.* 2013, Mized 2013). Berücksichtigt werden Stoffe und deren Transformationsprodukte, welche unerwünschte chemische und biologische Effekte hervorrufen, wie Sauerstoffzehrung durch biologischen Abbau von Ammonium und Kohlenstoffverbindungen. Die Abwasserreinigung dient folglich dem Gewässer-, Umwelt-, Gesundheits- und Ressourcenschutz (Gujer 2007, Schaum 2016, Tchobanoglous 2014) und sollte soweit erfolgen, wie es „nach dem Stand der Technik“ möglich ist (WHG 2009). In Deutschland sind die Mindestanforderungen an die Qualität des behandelten Abwassers, differenziert nach Herkunft des Rohabwassers und Größe der Abwasserbehandlungsanlage, in der Abwasserverordnung (AbwV, Anhang 1) festgelegt.

Aufgrund der zahlreichen Inhaltsstoffe wird die Abwasser- bzw. Ablaufqualität in der Praxis über physikalische, chemische und biologische (Summen-) Parameter definiert (AbwV 1997, Tchobanoglous 2014). Zu den üblicherweise erfassten physikalischen Eigenschaften zählen Färbung, Temperatur, Redoxpotential, elektrische Leitfähigkeit und der Gehalt suspendierter Stoffe (TSS, *engl. total suspended solids*). Wichtige chemische Parameter sind Einzelverbindungen wie Ammonium, Nitrat, (Schwer-) Metalle und gelöster Sauerstoff sowie Summenparameter wie der chemische oder biochemische Sauerstoffbedarf (CSB, BSB₅) und der Gesamtkohlenstoffgehalt. Die Giftigkeit des Abwassers gegenüber Wasserorganismen wie Algen oder Daphnien sowie der Gehalt coliformer Bakterien sind Beispiele für biologische Parameter.

2.1.1. Reinigungsstufen und –prozesse

In der Abwasserbehandlung werden physikalische, biologische und chemische Prozesse zur Verbesserung der Abwasserqualität (Reinigung) ausgenutzt (Gujer 2007, Imhoff *et al.* 2018, Kadlec & Wallace 2009, Tchobanoglous 2014). Es werden vier Reinigungsstufen unterschieden, die jeweils mehrere Schritte und entsprechende Verfahren beinhalten können. In der ersten, mechanischen Stufe werden grobe Feststoffe sowie aufschwimmende Stoffe entfernt, z. B. durch Siebung, Sedimentation, Flotation. Die zweite, biologische Stufe dient der Reduzierung des Gehalts von gelösten Inhaltsstoffen, z. B. organischen Verbindungen und anorganischen Salzen, sowie eines gewissen Maßes an feinen suspendierten Feststoffen. Bei der dritten, chemischen Aufbereitungsstufe werden hauptsächlich abiotische Prozesse ausgenutzt, wie die Fällung von Phosphat durch Zugabe von Eisensalzen oder die Desinfektion durch UV-Strahlung. Zur dritten Aufbereitungsstufe wird aber auch die Verbesserung der Stickstoffelimination durch mikrobielle Prozesse (Nitrifikation und Denitrifikation) gezählt. Die vierte Reinigungsstufe soll verbliebene Mikroverunreinigungen (anthropogene Spurenstoffe) entfernen, bspw. per Ozonung (Oxidation) oder Adsorption an Aktivkohle. Üblicherweise finden heutzutage Verfahren der ersten zwei oder drei Reinigungsstufen in der Abwasseraufbereitung Anwendung. Über den Nutzen der vierten Reinigungsstufe wird derzeit noch diskutiert, da z. B. die Wirtschaftlichkeit sowie die Auswirkungen gegebenenfalls gebildeter Transformationsprodukte noch nicht ausreichend bewertet sind (Imhoff *et al.* 2018), siehe hierzu auch Positionspapier des Umweltbundesamtes zu organischen Mikroverunreinigungen (Umweltbundesamt 2015).

Unabhängig von der Wahl der (erforderlichen) Reinigungsstufen und -verfahren ist die biologische Reinigung das Herzstück der Abwasseraufbereitung (Gujer 2007). Hierbei werden gelöste anorganische Verbindungen sowie gelöste oder zum Teil partikuläre organische Substanzen von Mikroorganismen (hauptsächlich Bakterien) metabolisiert (Braha & Groza 2006, Gujer 2007, Imhoff *et al.* 2018, Kadlec & Wallace 2009, Tchobanoglous 2014). Einerseits können diese Substanzen als Substrat für das Zellwachstum dienen. Die (gewachsene) Biomasse kann anschließend vom Wasser abgetrennt werden, wodurch die Fracht der Abwasserinhaltsstoffe verringert wird. Andererseits werden durch chemisch-physikalische Prozesse (Hydrolyse, Redoxreaktionen, Photolyse) sowie biologische Reaktionen Transformationsprodukte der Abwasserinhaltsstoffe gebildet. Gasförmige und flüchtige Produkte können dabei entweichen und so aus dem Abwasser eliminiert werden (Gujer 2007, Imhoff *et al.* 2018, Tchobanoglous 2014). Die Entfernbarkeit von Stoffen durch biologische Prozesse hängt neben den Substanzeigenschaften, wie Bioabbaubarkeit oder Adsorbierbarkeit (Imhoff *et al.*

2018), auch von den verfahrenstechnischen Bedingungen wie Temperatur oder Redoxmilieu (Sauerstoffverfügbarkeit) ab.

Bei Anwesenheit von gelöstem molekularem Sauerstoff (aerobes Milieu) werden organische Verbindungen durch heterotrophe Mikroorganismen oxidiert, idealerweise bis zur Mineralisation, also der Bildung anorganischer Verbindungen wie Wasser, Kohlenstoffdioxid oder Sulfat (Braha & Groza 2006, Gujer 2007). Aus stickstoffhaltigen organischen Verbindungen, z. B. Harnstoff, kann Ammonium freigesetzt werden (Ammonifikation), welches im aeroben Milieu hauptsächlich durch (chemo-) autotrophe Bakterien zu Nitrit und weiter zu Nitrat oxidiert wird (Nitrifikation; Abbildung 2-1) (Braha & Groza 2006, Gujer 2007, Kadlec & Wallace 2009, Tchobanoglous 2014). Liegt kein gelöster molekularer Sauerstoff vor, kann stattdessen Nitrat (sowie Nitrit) als Elektronenakzeptor (Oxidationsmittel) verwendet werden: Durch spezialisierte, zumeist heterotrophe Bakterien können vorhandene geeignete Kohlenstoffquellen oxidiert und Nitrat bzw. Nitrit über die Zwischenstufen nitroser Gase (NO , N_2O) zu molekularem Stickstoff umgesetzt werden (Reduktion; Denitrifikation) (Kadlec & Wallace 2009, Tchobanoglous 2014). Bedingungen, die durch die Abwesenheit molekularen, aber Anwesenheit gebundenen Sauerstoffs z. B. in Form von Nitrat und Nitrit gekennzeichnet sind, werden als anoxisch bezeichnet (Tchobanoglous 2014).

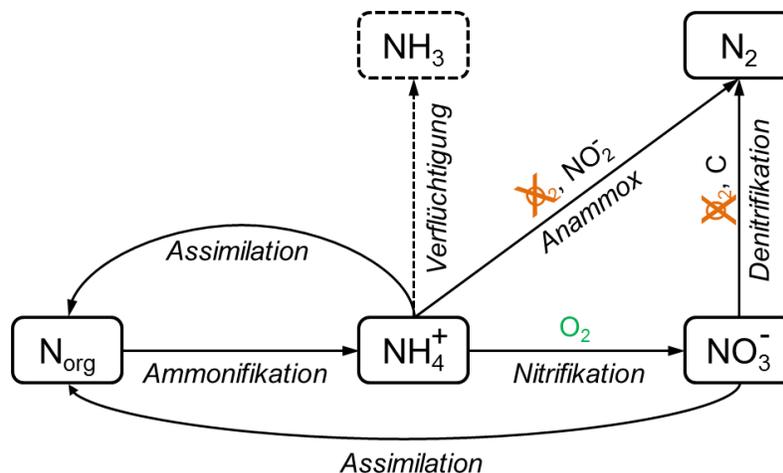


Abbildung 2-1. Schema der wichtigsten Schritte des Stickstoffkreislaufs in Untergrundpflanzenkläranlagen. Organisch gebundener Stickstoff (N_{org}) meint Verbindungen in Lösung sowie in Zellen (Mikroorganismen, Pflanzen). Höhere pH-Werte verschieben das Gleichgewicht $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ zunehmend in Richtung Ammoniak, welches ausgasen kann. C: geeignete, oxidierbare organische Verbindungen.

Liegen weder molekularer Sauerstoff noch Nitrat vor, spricht man von anaeroben Bedingungen. Unter diesen können bestimmte autotrophe Bakterien Ammonium und Nitrit zu molekularem Stickstoff synproportionieren (Anammox-Prozess) (Kadlec & Wallace 2009, Tchobanoglous

2014). Organische Verbindungen werden unter anaeroben Bedingungen durch Mikroorganismen zunächst hydrolysiert (falls nötig) und zu organischen Säuren (inkl. Essigsäure) oder Alkoholen, teils auch CO_2 und H_2 umgesetzt (Acidogenese). Verbleibende organische Zwischenprodukte können anschließend in Essigsäure, CO_2 und H_2 umgewandelt werden (Acetogenese). Zuletzt kann Methan gebildet werden, einerseits durch Spaltung von Acetat zu Methan und CO_2 , andererseits durch Reduktion von CO_2 mit H_2 unter Bildung von Methan und Wasser (Methanogenese) (Braha & Groza 2006, Imhoff *et al.* 2018, Tchobanoglous 2014). Anwendung finden anaerobe Reinigungsverfahren zumeist bei organisch hochbelasteten Abwässern als wirtschaftliche Alternative zur aeroben Behandlung. Da organische Zwischen- bzw. Transformationsprodukte im Abwasser zurückbleiben, empfiehlt sich im Anschluss eine aerobe Behandlung (Tchobanoglous 2014). Andernfalls können die in der Abwasserverordnung (AbwV 1997) definierten Qualitätsanforderungen für den Restgehalt bspw. abbaubarer (Kohlenstoff-) Verbindungen, repräsentiert durch den biologischen Sauerstoffbedarf (BSB_5), gegebenenfalls nicht erreicht werden (Vgl. Tabelle 2-1, nächstes Kapitel).

2.1.2. Pflanzenkläranlagen und konventionelle Kläranlagen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Behandlung kommunalen Abwassers hauptsächlich durch technische Pflanzenkläranlagen im Pilot-Maßstab untersucht. Klassischerweise werden nur Kleinkläranlagen mit bewachsenen Bodenfilter oder Teichen als Pflanzenkläranlagen (*engl. constructed wetlands*) bezeichnet (Geller & Höner 2003, Kadlec & Wallace 2009). Im Folgenden werden jedoch alle untersuchten Bodenfilter, mit und ohne Bepflanzung, als Pflanzenkläranlage bezeichnet. Im englischsprachigen Raum hat sich hierfür der Begriff *treatment wetlands* etabliert. Dieser umfasst Bodenfilter und Teiche mit und ohne Pflanzen sowie stark technisierte Varianten dieser Systeme (Kadlec & Wallace 2009).

Neben Pflanzenkläranlagen wurden ergänzend Untersuchungen an konventionellen Kläranlagen durchgeführt. Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Prozesse zur Abwasserreinigung werden in beiden Systemarten ausgenutzt. Es handelt sich jedoch um Anlagentypen grundlegend verschiedener Konzeption: Konventionelle Kläranlagen sind für die zentrale Behandlung des Abwassers einer oder mehrerer Gemeinden ausgelegt und weisen zumeist Ausbaugrößen von mehr als 10.000 Einwohnerwerten auf (Umweltbundesamt 2015). Das Abwasser wird über teils lange Wege per Kanalisation zur Anlage transportiert. Pflanzenkläranlagen sind naturnahe Kleinkläranlagen zur dezentralen Behandlung von Abwasser nahe an dessen Entstehungsort. Zumeist betrifft dies häusliches Abwasser weniger Haushalte. Ausbaugrößen bis 2000 Einwohnerwerte sind üblich (Rousseau *et al.* 2004). Es bestehen folglich Unterschiede in der Größe und der Kapazität der beiden Anlagentypen, in den

Anforderungen an die Ablaufqualität und im (nötigen) Grad der Technisierung sowie in den Bau- und Betriebskosten. Auch die Reaktortypen und das hydrodynamische Verhalten sind in der Regel verschieden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Pilot-Pflanzenkläranlagen mit Untergrundfluss untersucht. Um in Zulaufnähe Kolmation (Verringerung der Filterdurchlässigkeit) durch Feststoffe sowie einer übermäßigen Sauerstoffzehrung durch hohe organische Belastung vorzubeugen, wird diesen Systemen üblicherweise eine mechanische Vorreinigung des Abwassers vorgeschaltet (Geller & Höner 2003, Kadlec & Wallace 2009, Vymazal 2011). In dieser Arbeit wurde hierzu ein Absetzbecken eingesetzt. Bei Untergrundpflanzenkläranlagen fließt das Abwasser in horizontaler oder vertikaler Richtung durch einen oder mehrere aufeinanderfolgende (bepflanzte oder unbepflanzte) Bodenfilter (Abbildung 2-2). Die Bodenfilter können als Reaktoren mit immobilisierter Biomasse (Festbettreaktoren) (Braha & Groza 2006) angesehen werden: Das Abwasser fließt durch das System und wird dabei gereinigt. Das Bodenmaterial sowie gegebenenfalls vorhandene Wurzeln fungieren als Aufwachssubstrat für Mikroorganismen, aber auch als Filter für partikuläre Stoffe. Durch die Filterwirkung fällt nicht kontinuierlich (Sekundär-) Schlamm im Ablauf an, jedoch besteht das Risiko der Kolmation. Das Bodenmaterial muss in diesem Fall regeneriert bzw. erneuert werden. Je nach Art des Bodenmaterials können Adsorption oder Ionenaustausch als abiotische Prozesse zur Abwasserreinigung beitragen (Geller & Höner 2003, Gujer 2007, Kadlec & Wallace 2009). Die Pflanzen können Nährstoffe aufnehmen, bei Verrottung können diese allerdings wieder ins System abgegeben werden. Abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften können auch gelöste Spurenstoffe aufgenommen, in der Pflanze verteilt und gegebenenfalls metabolisiert werden. Ein weiterer Vorteil der Bepflanzung ist der Eintrag von Sauerstoff über die Wurzeln. Durch Evapotranspiration wird dem System über die Pflanzen allerdings Wasser entzogen, was bei der Abwasserbehandlung zum Zwecke der Wiederverwendung des Wassers bedacht werden sollte (Geller & Höner 2003, Kadlec & Wallace 2009, Petrie *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2014). Wie bei Festbettreaktoren üblich, treten in Untergrundpflanzenkläranlagen Konzentrationsgradienten entlang der Fließrichtung auf und die Bedingungen innerhalb des Systems, z. B. das Redoxmilieu, können sehr inhomogen sein (Kadlec & Wallace 2009, Zhang *et al.* 2014). Als Bepflanzung werden häufig Schilfrohrarten (*Phragmites*), als Filtermaterial Sand oder Kies verwendet.

In klassischen Untergrundpflanzenkläranlagen (Abbildung 2-2) limitiert die Sauerstoffverfügbarkeit den Grad der Reinigungsleistung (Kadlec & Wallace 2009, Nivala *et al.* 2013b). Zur Erhöhung des Sauerstoffeintrags und somit der Reinigungsleistung wurden

verschiedene Strategien entwickelt: In Anlagen mit vertikalem Fluss kann intermittierend beschickt werden, das System wird dabei abwechselnd komplett mit Abwasser befüllt und geleert. Alternativ könnte nur ein Teil des Systems dauerhaft unter Wasser stehen, sodass das Abwasser bei Beladung zuerst eine ungesättigte Zone passiert und Sauerstoff aufnehmen kann (Geller & Höner 2003, Kadlec & Wallace 2009). Auch Serien mehrerer Bodenfilter oder die aktive Belüftung sind gängige Methoden zur Erhöhung der Sauerstoffverfügbarkeit in Untergrundpflanzenkläranlagen (Kadlec & Wallace 2009).

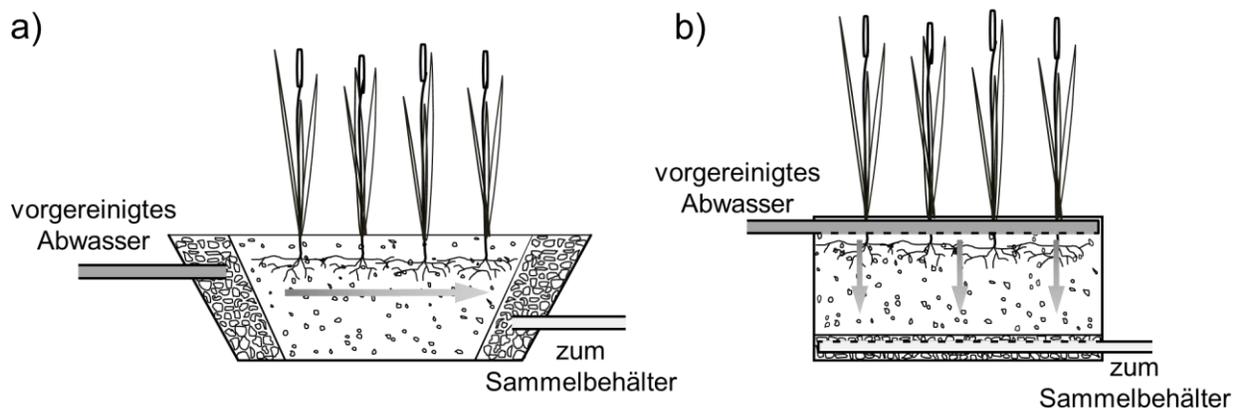


Abbildung 2-2. Schematische Darstellung eines a) horizontal durchströmten und b) vertikal durchströmten, bepflanzten Bodenfilters von Pflanzenkläranlagen.

In konventionellen Kläranlagen wird am häufigsten das Belebtschlammverfahren (*engl. activated sludge process*) eingesetzt (Gujer 2007, Tchobanoglous 2014). Hierbei ist die Biomasse suspendiert, zumeist in einem gut durchmischten, belüfteten (Rühr-) Reaktor, dem Belebungsbecken. Aufgrund der Durchmischung im Becken treten idealerweise keine Konzentrationsgradienten gelöster sowie partikulärer Stoffe innerhalb des Beckens auf und die Bedingungen (z. B. Redoxmilieu) sind sehr homogen. Da Biomasse zum Teil ausgetragen wird, muss diese in einem Nachklärbecken sedimentiert und dem Prozess als Rücklaufschlamm wieder zugeführt werden, um eine konstant hohe Biomassekonzentration aufrecht zu erhalten (Gujer 2007, Tchobanoglous 2014). Überschüssiger Schlamm aus der Nachklärung muss gesondert behandelt und entsorgt werden. Zur Verbesserung der Elimination von (Phosphor- und) Stickstoffverbindungen kann die Behandlung in mehreren Stufen und mit interner Rezirkulation (teil-) behandelten Abwassers erfolgen (Abbildung 2-3): In einem ersten, anaeroben Becken werden organische Verbindungen z. B. zu kurzkettigen Säuren und Alkoholen reduziert. Durch den immer noch hohen Kohlenstoffgehalt im Ablauf dieses Beckens kann im darauffolgenden, anoxischen Becken Denitrifikation stattfinden. Nitrat stammt dabei aus rezirkuliertem Ablauf des letzten, aeroben Beckens, in welchem Ammonium zu Nitrat oxidiert wird sowie die verbleibenden Kohlenstoffverbindungen weiter abgebaut (oxidiert) werden (Gujer

2007, Tchobanoglous 2014). Dieses Setup ermöglicht eine gute Nährstoffelimination und findet auch in der kommunalen Kläranlage Anwendung, welche sich in Nachbarschaft zu den untersuchten Pflanzenkläranlagen befindet und regelmäßig beprobt wurde (Kläranlage Langenreichenbach, Abwasserzweckverband Heidelberg).

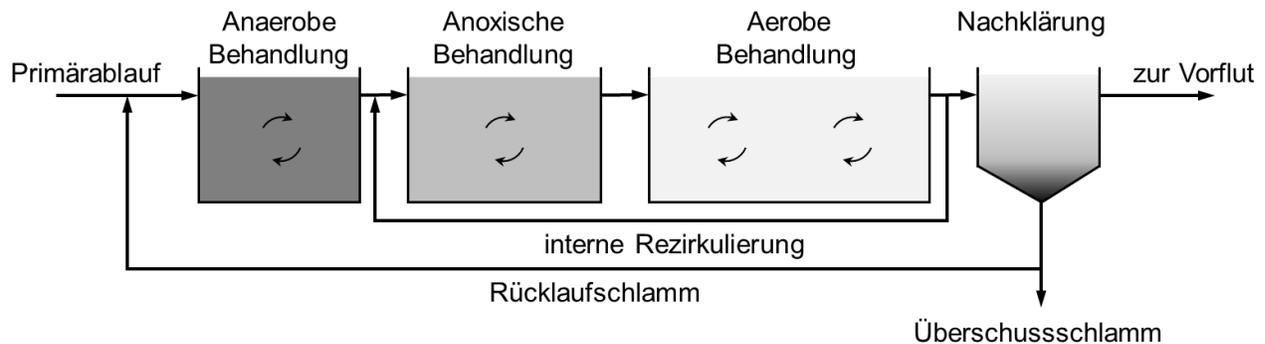


Abbildung 2-3. Teil-Fließschema der konventionellen Abwasserbehandlung mit verbesserter Nährstoffentfernung, modifiziert nach Tchobanoglous (2014). Primärablauf: Abwasser nach der ersten Reinigungsstufe (mechanische Behandlung), z. B. nach Rechen, Sand- und Fettfang sowie einem ersten Absetzbecken.

Die zu erreichende Ablaufqualität behandelten kommunalen Abwassers (zur Einleitung in ein Gewässer) sind in Anhang 1 der Abwasserverordnung für fünf Größenklassen von Kläranlagen definiert (AbwV 1997). Generell müssen Abwasseranlagen mit steigender Kapazität eine zunehmend bessere Ablaufqualität erreichen, um die Menge freigesetzter potentieller wie tatsächlicher Schadstoffe auch bei hohen Ablaufvolumina gering zu halten. Pflanzenkläranlagen werden bspw. Größenklasse 1 zugeordnet und müssen daher nur Grenzwerte bzgl. des Kohlenstoffgehalts im Ablauf einhalten (Tabelle 2-1). Der Großteil kommunaler Kläranlagen in Deutschland hat hingegen Ausbaugrößen, die den Größenklasse 4 oder 5 entsprechen (Umweltbundesamt 2015), wodurch strengere Anforderungen an den Restgehalt organischen Kohlenstoffs gestellt werden. Außerdem dürfen klar definierte Maximalgehalte von Ammonium, Gesamtstickstoff sowie Gesamtphosphor nicht überschritten werden (Tabelle 2-1).

Aufgrund der gravierenden Unterschiede in Auslegung, Design und vor allem Anforderungen an die Ablaufqualität ist ein direkter Vergleich der Gesamtreinigungsleistung von Pflanzenkläranlagen und konventionellen Kläranlagen nur bedingt möglich. Eine Gegenüberstellung der Eliminationsleistung für die derzeit kaum regulierten anthropogenen Spurenstoffe kann jedoch nützlich sein, um die Reinigungsleistung dieser Kleinkläranlagen mit dem „Stand der Technik“ zu vergleichen. Konventionelle Kläranlagen sind lang etablierte Systeme, höher technisiert als Pflanzenkläranlagen und müssen, wie oben erwähnt, in der Regel strengere Auflagen bzgl. der Ablaufqualität erfüllen. Die Entfernungsleistung konventioneller Kläranlagen kann demnach als Stand der Technik betrachtet werden. Eine

Einschätzung, welcher technische Aufwand erforderlich ist, um mit Kleinkläranlagen eine ähnliche Reinigung zu erzielen, ist besonders für Regionen von Relevanz, in denen die zentrale Abwasserbehandlung keine Option darstellt. Auch hier soll möglichst sauberes Wasser erhalten werden, um Gesundheits- und Umweltrisiken vorzubeugen. Generell sind Kläranlagen jedoch bisher nicht für die Entfernung anthropogener Spurenstoffe ausgelegt. Unzureichend oder überhaupt nicht entfernte Substanzen gelangen so mit dem Kläranlagenablauf ins Oberflächenwasser (Verlicchi *et al.* 2012). Um die eingeleitete Menge anthropogener Spurenstoffe zu verringern, werden zusätzliche Techniken zur Abwasserreinigung erforscht („vierte Reinigungsstufe“).

Tabelle 2-1. Anforderungen an die Ablaufqualität behandelten kommunalen Abwassers für die Eileitung in ein Gewässer lt. Abwasserverordnung (AbwV 1997). Die Größenklassen werden anhand des biochemischen Sauerstoffbedarfs von 5 Tagen (BSB₅) im Rohabwasser festgesetzt. Die BSB₅-Fracht im Rohabwasser kann mittels des Einwohnergleichwerts von 60 g/(Einwohner·d) BSB₅ (Gujer 2007, Imhoff *et al.* 2018) auf die Ausbaugröße in Einwohnerwerten (EW) umgerechnet werden. CSB: Chemischer Sauerstoffbedarf, NH₄-N: Ammoniumstickstoff, N_{ges}: Summe des Stickstoffs aus Ammonium, Nitrat und Nitrit, P_{ges}: Gesamtphosphor.

Größenklasse (GK) nach AbwV und Ausbaugröße der Kläranlage	CSB (mg/L)	BSB ₅ (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	N _{ges} (mg/L)	P _{ges} (mg/L)
GK 1: < 60 kg/d BSB ₅ (< 1.000 EW)	150	40	-	-	-
GK 2: 60 - 300 kg/d BSB ₅ (1.000 – 5.000 EW)	110	25	-	-	-
GK 3: 300 - 600 kg/d BSB ₅ (5.001 – 10.000 EW)	90	20	10	-	-
GK 4: 600 – 6.000 kg/d BSB ₅ (10.001 – 100.000 EW)	90	20	10	18	2
GK 5: > 6.000 kg/d BSB ₅ (> 100.000 EW)	75	15	10	13	1

2.2. Anthropogene Spurenstoffe

Unter dem Begriff „anthropogene Spurenstoffe“ werden Substanzen zusammengefasst, die industriell hergestellt, vom Menschen verwendet und freigesetzt werden oder wurden. In der Umwelt treten sie im ng/L- bis µg/L-Bereich auf (DWA 2015, Imhoff *et al.* 2018). In der Regel handelt es sich um nicht-natürliche, mitunter als xenobiotisch bezeichnete (Fatta-Kassinos *et al.* 2010), Verbindungen. Einige der anthropogenen Spurenstoffe kommen zwar in der Natur vor, werden aber vorwiegend durch anthropogene Einflüsse in die Umwelt eingetragen (Abegglen & Siegrist 2012, European Parliament and Council 2000). Beispiele sind Erdölbestandteile wie Benzol oder Steroidhormone wie Estradiol (Tchobanoglous 2014).

Aufgrund ihrer Definition über die Umweltkonzentration werden den anthropogenen Spurenstoffen organische und anorganische Substanzen verschiedenster chemisch-physikalischer Eigenschaften und (Struktur-) Klassen aus zahlreichen Anwendungsbereichen zugeordnet, z. B. Pestizide, Pharmazeutika, Nahrungsmittelzusatzstoffe und Transformationsprodukte der ursprünglich eingesetzten Substanzen (DWA 2015, Imhoff *et al.* 2018, Tchobanoglous 2014).

Trotz der geringen Umweltkonzentrationen können anthropogene Spurenstoffe negative Auswirkungen auf die Umwelt haben. Die europäische Wasserrahmenrichtlinie sieht daher die Überwachung und die Minimierung des Umwelteintrags von „prioritären Stoffen“ zur Reduzierung des Risikos ausgehend von diesen Substanzen vor (European Parliament and Council 2000, 2013). Diese prioritären Stoffe werden von der Europäischen Kommission auf Basis von Risikobewertungen vorgeschlagen, unter besonderer Berücksichtigung z. B. der aquatischen Ökotoxizität und eines weitverbreiteten Vorkommens. In Anhang X der Wasserrahmenrichtlinie sind zulässige Umweltkonzentrationen, sogenannte Umweltqualitätsnormen, der prioritären Stoffe definiert (European Parliament and Council 2013). Derzeit umfasst die Liste fast 40 Einzelstoffe und über zehn Substanzgruppen, wie z. B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine oder Cadmiumverbindungen. Doch auch Mischungen parallel auftretender anthropogener Spurenstoffe können toxische Effekte hervorrufen (Mischungstoxizität), selbst wenn alle Einzelsubstanzen unterhalb ihrer wirksamen Konzentration vorliegen (additive bzw. synergistische Toxizität) (ECETOC 2001, European Commission 2012). Die Liste möglicher Analyten aus der Gruppe der anthropogenen Spurenstoffe ist folglich lang.

2.2.1. Studien zur Elimination anthropogener Spurenstoffe in Pflanzenkläranlagen

Pflanzenkläranlagen werden seit längerem zur Entfernung spezieller organischer Kontaminanten, bspw. Phenole, Chlorkohlenwasserstoffe, Nitrobenzol oder Naphthalin, aus Industrieabwasser oder Deponiesickerwasser eingesetzt (Haberl *et al.* 2003, Kadlec & Wallace 2009). Anthropogene Spurenstoffe im Konzentrationsbereich von ng/L bis µg/L konnten erst mit der Verfügbarkeit hochsensitiver Analysemethoden erfasst werden (Li *et al.* 2014). Eine Übersicht der vor Beginn der eigenen Monitoringstudie verfügbaren Literatur zur Elimination anthropogener Spurenstoffe in Pflanzenkläranlagen, welche als zweite Reinigungsstufe verwendet wurden, ist in Tabelle 2-2 zusammengestellt. Studien, in denen Pflanzenkläranlagen nur zur Nachbehandlung (*tertiary treatment*), z. B. nach Passieren einer konventionellen Kläranlage, eingesetzt wurden, wurden nicht in die Übersicht aufgenommen.

In den in Tabelle 2-2 aufgeführten Studien wurden verschiedenste anthropogene Spurenstoffe analysiert. Die Analyten wurden für gewöhnlich aufgrund hoher Verwendungsmengen und verbreiteten Vorkommens im kommunalem Abwasser der jeweiligen Region ausgewählt. Am häufigsten wurde deshalb die Eliminierung von Pharmaka, z. B. Ibuprofen, Ketoprofen, Naproxen, Clofibrinsäure, Diclofenac und Salicylsäure, untersucht. Aufgrund der Unterschiede in Größe, Alter, Konfiguration, Beladungsmatrix, Standort und Beprobungszeitraum der untersuchten Anlagen sind die genauen Eliminationseffizienzen gleicher Analyten in verschiedenen Studien nur bedingt vergleichbar. Die Gesamtheit der Studien erlaubt jedoch eine Einschätzung, über welchen Prozess die Analyten vornehmlich entfernt werden (Sorption, Bioabbau, Aufnahme durch Pflanzen) und welche Bedingungen eine effektive Elimination ermöglichen. So wurde z. B. im Review-Artikel von Verlicchi & Zambello (2014) zusammengefasst, dass anoxische oder aerobe Bedingungen sowie erhöhte Temperaturen den Bioabbau der meisten untersuchten Pharmaka begünstigen. Ebenso wird im Übersichtsartikel von Li *et al.* (2014) berichtet, dass durch erhöhte Temperatur und Sonneneinstrahlung im Sommer die Aktivität der Pflanzen und Mikroorganismen gesteigert und somit die Elimination vieler der untersuchten Pharmaka verbessert wird. Diese Schlussfolgerungen wurden auch in vielen der in Tabelle 2-2 aufgeführten Studien gezogen. Besonders hilfreich für Rückschlüsse dieser Art sind Studien, die parallel die Reinigungsleistung verschiedener Pflanzenkläranlagendesigns gleichen Ausmaßes, gleicher Beschickungsmatrix und gleichen Beobachtungszeitraumes untersuchen. Äußere Einflüsse wie unterschiedliche klimatische Bedingungen oder Abwasserzusammensetzung können hier als Ursache für voneinander abweichende Eliminationseffizienz der unterschiedlichen Anlagen ausgeschlossen werden.

Alle in Tabelle 2-2 aufgeführten Studien verfolgten die Elimination anthropogener Spurenstoffe in den Anlagen über kurze Zeiträume oder mit wenigen Beprobungen über längere Zeiträume. Regelmäßige, engmaschige Beprobungen über mehr als drei aufeinanderfolgende Monate bzw. ein ganzes oder mehrere Jahre wurden nicht durchgeführt. Zur Beurteilung der Robustheit der Anlagen gegenüber den saisonal veränderlichen Bedingungen ist dies jedoch notwendig. Dass entsprechende Beprobungen nicht durchgeführt wurden, könnte durch die Art der Analysenmethode begründet gewesen sein: In den zusammengestellten Studien (Tabelle 2-2) wurden die Spurenstoffe zunächst mittels Festphasenextraktion angereichert. Außerdem wurden sie sehr häufig mit Methoden der Gaschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) analysiert. Polare Stoffe müssen hierfür zunächst derivatisiert werden, was die Probevorbereitung noch zeit- und arbeitsaufwändiger gestaltete. Heute stehen zur Analyse polarer Stoffe hochsensitive LC-MS/MS-Methoden zur Verfügung, die einen höheren Probedurchsatz und damit engmaschige Beprobung sowie Langzeit-Monitoring erlauben.

Tabelle 2-2. Übersicht von Studien zur Elimination organischer anthropogener Spurenstoffe mittels Pflanzenkläranlagen aus vorbehandeltem realem Abwasser (z. B. mittels Absetztank) oder aus synthetischem Abwasser. Studien, die die Eignung als Nachbehandlungsmethode (*“tertiary treatment“*) prüfen, wurden nicht einbezogen, da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Eignung von Pflanzenkläranlagen als zweite Reinigungsstufe lag. Abkürzungen sind am Ende der Tabelle erklärt.

Referenz	Untersuchte Anlagen			Beprobung	Abwasser-matrix	Untersuchte anthropogene Spurenstoffe		
	An-zahl	Größe	Konfiguration ^a			An-zahl	Substanzen/Stoffklassen ^b	Analysen-methode ^c
Matamoros <i>et al.</i> (2005)	2	54 – 56 m ²	HSSF	April/Mai 2004	Haushalt, dotiert	3	Pharmaka	SPE, HPLC-UV
Matamoros & Bayona (2006)	2	54 – 56 m ²	HSSF	Mai 2004, Mai 2005, Juli 2005	Haushalt	11	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Matamoros <i>et al.</i> (2007)	2	5 m ² 10 m ²	VSSF, Sandfilter (je 4 HLR getestet)	Juni/Juli 2006	kommunal	13	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Conkle <i>et al.</i> (2008)	1	> 35000 m ²	Hybridsystem: 3 Teiche, 1 SF, 1 natürliches Feuchgebiet	Mai 2007	kommunal	15	Pharmaka	SPE, LC-MS/MS
Matamoros <i>et al.</i> (2008)	2	0,55 m ²	SSF, Batch-Betrieb	Juli 2004	synthetisch, dotiert	5	Pharmaka (inkl. TP)	1) SPE, HPLC-UV 2) SPE, Derivatisierung, GC-MS
Matamoros <i>et al.</i> (2009)	5 4 2	15 – 4000 m ²	HSSF VSSF Sandfilter	Mai – Juli 2006	Haushalt	13	PPCP (inkl. TP)	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Avila <i>et al.</i> (2010)	1	2x 0,65 m ² , 1,65 m ²	Mehrstufiges System: 2 parallele HSSF, 1 HSSF	Mai 2009	kommunal, dotiert	5	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Hijosa-Valsero <i>et al.</i> (2010a)	3	230 – 1073 m ²	Hybridsysteme (Teiche, SFs, HSSFs), 3 Standorte	Juli/August 2008	kommunal	9	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Hijosa-Valsero <i>et al.</i> (2011a)	7	1 m ²	SF, FW-SSF, HSSF (z. T. unbepflanzt)	November 2009	kommunal	20	Pharmaka (Antibiotika)	SPE, HPLC- MS/MS
Hijosa-Valsero <i>et al.</i> (2011b)	3 + 2	2,4 m ²	Mehrstufige Systeme: je 2 parallele HSSF, 1 HSSF, 2 Standorte	Je eine Woche in Sommer und Winter 2008	kommunal	12	PPCPs	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Reyes-Contreras <i>et al.</i> (2011)	1	2x 75 m ²	Hybridsystem (SF, HSSF)	Februar 2008, Juni/Juli 2009	kommunal	12	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS

Tabelle 2-2. (Fortsetzung)

Referenz	Untersuchte Anlagen		Beprobung	Abwasser- matrix	An- zahl	Untersuchte anthropogene Substanzen/ Stoffklassen ^b	Spurenstoffe Analyse- methode ^c
	An- zahl	Größe					
Zhang <i>et al.</i> (2011),	6	0,72 m ²	HSSF (z. T. unbepflanzl.; je 2 HRT getestet)	Mai 2010	synthetisch, dotiert	Pharmaka	SPE, HPLC-UV
Reyes- Contreras <i>et al.</i> (2012)	7	1 m ²	SF, FW-SSF, HSSF (z. T. unbepflanzl.)	Juli – September 2007, Januar – März 2008, Juli – September 2008, Januar – März 2010, Juli – September 2010 Zeitraum unklar	kommunal	PPCP	SPE, Derivatisierung, GC-MS
Zhang <i>et al.</i> (2012a)	6	0,72 m ²	HSSF (z. T. unbepflanzl.; je 3 HRT getestet)	2 Kampagnen, aber Zeitraum unklar	synthetisch, dotiert	Pharmaka	SPE, HPLC-UV
Zhang <i>et al.</i> (2012b)	3	0,72 m ²	HSSF (2 HRT und 2 Bela- dungsmodi getestet)	2 Kampagnen, aber Zeitraum unklar	synthetisch, dotiert	Pharmaka	SPE, HPLC-UV
A <i>et al.</i> (2013)	12	0,48 m ²	VSSF, UVSSF, SF, HSSF (z. T. unbepflanzl.)	August 2011, Februar 2012	kommunal	Pharmaka (Antibiotika)	SPE, HPLC- MS/MS
Avila <i>et al.</i> (2013)	3	2x 0,65 m ² , 1,65 m ²	Mehrstufige Systeme: je 2 parallele HSSF, 1 HSSF	November/De- zember 2009	kommunal, dotiert	PPCP	SPE, HPLC-UV
Liu <i>et al.</i> (2013)	2	1 m ²	VSSF	Zeitraum unklar	Ablauf/Anaerob- reaktor (Schwei- nefarm), dotiert	Pharmaka (Antibiotika)	SPE, HPLC- MS/MS

^a Arten von Anlagen: Untergroundpflanzenkläranlage mit horizontalem Fluss (HSSF) bzw. vertikalem Fluss (VSSF), ggf. auch entgegen der Schwerkraft (UVSSF); Pflanzenkläranlage Zu- und Abfluss über Wasseroberfläche (SF; inkludiert Systeme mit und ohne Bodenmaterial), bzw. mit Zufluss über Wasseroberfläche und Abfluss über Bodenmedium (FW-SSF); Beladungsrate (HLR) bzw. hydraulische Verweilzeit (HRT).
^b Pharmaka und Körperpflegemittel (PPCP, engl. *pharmaceuticals and personal care products*), Transformationsprodukte (TP).
^c Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE); Trennung mittels Gaschromatografie (GC) bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC); Detektion über Massenspektrometrie (MS), Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) oder mittels Lichtabsorption im ultravioletten Spektrum (UV).

2.2.2. Indikatorsubstanzen

Um Langzeitmonitoringstudien für anthropogene Spurenstoffe durchführen zu können, sind schnelle, wirtschaftliche Analysemethoden erforderlich. Entsprechend muss aus der Vielzahl dieser Substanzen eine vernünftige Auswahl getroffen werden. Ein praktikabler Ansatz hierfür ist die Verwendung repräsentativer Einzelsubstanzen, sogenannte Indikatoren (Drewes *et al.* 2013, Jekel *et al.* 2015, Pal *et al.* 2014). Dies können Vertreter für Stoffe gleicher Substanzklassen, biologischer Effekte (Wirkung), Eintragsquellen oder chemisch-physikalischer Eigenschaften sein. Auch die Gruppierung nach Verhalten bei natürlichen bzw. technischen Prozessen, wie Photolyse oder Aktivkohlefiltration, kann sinnvoll sein. Solche Prozessindikatoren können einerseits dazu verwendet werden, den Betrieb und die Effektivität eines Aufbereitungsverfahrens (für die repräsentierte Stoffgruppe) zu überprüfen und zu überwachen: Die Entfernungsleistung des beobachteten Verfahrens wird mit der für den Indikator typischen Elimination während des (dominierenden) Entfernungsprozesses, bspw. in konventionellen Kläranlagen, verglichen. Wird die Indikatorsubstanz schlechter als erwartet eliminiert, kann dies bedeuten, dass das Verfahren nicht optimal funktioniert oder betrieben wird. Erfolgt eine bessere Entfernung als erwartet, können überlagerte Prozesse, z. B. Photolyse und Bioabbau anstelle eines reinen Bioabbaus, vorliegen. Die tatsächlich beobachtete Entfernung von Prozessindikatorsubstanzen lässt andererseits Rückschlüsse auf Bedingungen in einem System zu, da das Verhalten der Indikatoren während des Entfernungsprozesses gut charakterisiert ist (Jekel *et al.* 2015). Diese Funktion der Indikatoren ist besonders von Vorteil, wenn ein inhomogenes System, wie es bspw. ein Bodenfilter darstellt, vorliegt und nicht an jeder Stelle Bedingungen wie Sauerstoffgehalt oder Redoxpotential durch direkte Messung ermittelt werden können.

Generell sind bei der Auswahl geeigneter Indikatoren einige Kriterien zu beachten. Nach Jekel *et al.* (2015) sollte es sich um Substanzen handeln, die möglichst gleichmäßig freigesetzt werden und in ausreichender Konzentration, hier im Abwasser, auftreten. Sie sollten mit vergleichsweise geringem analytischem Aufwand nachweisbar sein. Besonders bei Quellenindikatoren müssen die möglichen Eintragsquellen bekannt sein. Das Verhalten von Prozessindikatoren bei im System möglicherweise auftretenden Prozessen, z. B. Hydrolyse, Photolyse, Sorption oder Bioabbau, muss bekannt sein. Dies schließt die Kenntnis wichtiger physikalisch-chemischer Parameter, z. B. Löslichkeit oder Flüchtigkeit, der Indikatoren ein.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Effizienz von Pflanzenkläranlagen, teils auch von konventionellen Kläranlagen hinsichtlich der biologischen Entfernung von polaren, organischen anthropogenen Spurenstoffen beurteilt werden. Zweckmäßigerweise wurden daher Indikatoren

ausgewählt, die den Grad des Bioabbaus in diesen Systemen beschreiben helfen. Es erfolgte dabei keine Differenzierung zwischen Transformations- und Mineralisationsprozessen. Die Indikatoren für biologischen Abbau wurden unter Berücksichtigung der Kriterien von Jekel & Dott (2013), später in Jekel *et al.* (2015) zusammengefasst, ausgewählt. Zusätzlich sollten nur polare Substanzen berücksichtigt werden, da diese sehr mobil sind (wenig bis keine Sorption, geringe bis keine Flüchtigkeit) und dadurch in der Umwelt weit verbreitet werden können. Photolyse durch Sonneneinstrahlung kann in Untergrundpflanzenkläranlagen ausgeschlossen werden. Die photolytische Abbaubarkeit der ausgewählten Indikatorsubstanzen spielte daher keine Rolle. In kommunalem Abwasser sollten die Indikatoren in Konzentrationsbereichen vorkommen, die die Anwendung von Direktinjektionsmethoden in der HPLC-MS/MS erlauben. Dies wurde mittels Literaturrecherche und Voruntersuchungen abgesichert. Außerdem musste die Bioabbaubarkeit der Indikatoren unter verschiedenen Redoxbedingungen charakterisiert sein, um Rückschlüsse auf vorhandene Bedingungen in den Systemen ziehen zu können. Zusammen genommen sollten die Indikatoren ein breites Spektrum an Bioabbaubarkeit in verschiedenen Redoxmilieus abdecken. Letztlich wurden Coffein (CAF) und Ibuprofen (IBU) als Vertreter für leicht aerob bioabbaubare, Naproxen (NPX) und 1H-Benzotriazol (BTZ) als Vertreter mäßig aerob bioabbaubarer Substanzen sowie Carbamazepin (CBZ) und Acesulfam (ACE) als Repräsentanten nicht aerob bioabbaubarer anthropogener Spurenstoffe ausgewählt. Die individuellen Bioabbaubarkeiten unter aeroben, anoxischen und anaeroben Bedingungen sind in Tabelle 2-3 zusammengestellt.

Tabelle 2-3. Verwendung und Abbauverhalten der ausgewählten Prozessindikatoren für Bioabbau unter verschiedenen Redoxbedingungen, sortiert nach abnehmender Bioabbaubarkeit unter aeroben Bedingungen.

Analyt	Kürzel	Verwendung	Bioabbaubarkeit unter ... Bedingungen		
			aerob	anoxisch	anaerob
Coffein	CAF	Stimulans	hoch	mäßig bis hoch	mäßig bis hoch
Ibuprofen	IBU	Nichtsteroidales Antirheumatikum	hoch	gering	gering
Naproxen	NPX	Nichtsteroidales Antirheumatikum	mäßig bis hoch	mäßig bis hoch	mäßig bis hoch
Benzotriazol	BTZ	Korrosions-/ Frostschutzmittel	gering bis mäßig	gering	gering
Diclofenac	DCL	Nichtsteroidales Antirheumatikum	gering bis hoch	gering	gering
Acesulfam	ACE	Synthetischer Süßstoff	gering	gering	gering
Carbama- zepin	CBZ	Antikonvulsivum	gering	gering bis mäßig	gering bis mäßig

(Bradley *et al.* 2007, Fernandez-Fontaina *et al.* 2012, Froehner *et al.* 2011, Herzog *et al.* 2014, Jekel & Dott 2013, Lahti & Oikari 2011, Liu *et al.* 2011, Monsalvo *et al.* 2014, Quintana *et al.* 2005, Suarez *et al.* 2010, Zwiener & Frimmel 2003)

Die ausgewählten Verbindungen sollten explizit weder Substanz- noch Wirkungsklassen, sondern ausschließlich Substanzen mit gleicher oder ähnlicher Bioabbaubarkeit, in Abhängigkeit vom Redoxmilieu, repräsentieren.

2.2.3. Markersubstanz Acesulfam

Zu Beginn der Studie wurde ACE als schwer bioabbaubar beschrieben und daher als Indikator mit persistenten Eigenschaften ausgewählt. Buerge *et al.* (2009) sowie Scheurer *et al.* (2011) beobachteten, dass ACE in neun deutschen und vier schweizerischen konventionellen Kläranlagen nicht eliminiert wurde und in Oberflächen- sowie Grundwasser nachweisbar war. Persistenz wurde bspw. ebenfalls beobachtet in Untersuchungen von Kläranlagen in Spanien (Ordonez *et al.* 2012), China (Gan *et al.* 2013) oder Südkorea (Ryu *et al.* 2014). Auch in Laborstudien mit Rücklaufschlamm einer Kläranlage und Rohabwasser (Batch-Versuch) (Buerge *et al.* 2009) bzw. in einem Säulenversuch mit Bodenmaterial und Rohabwasser (Buerge *et al.* 2011) wurde kein ACE-Abbau beobachtet. ACE wurde deshalb als persistent angesehen und galt als qualitative Markersubstanz für den Eintrag kommunalen Abwassers in die aquatische Umwelt (Buerge *et al.* 2009, Engelhardt *et al.* 2013, Scheurer *et al.* 2011). Buerge *et al.* (2009) beschrieben auch eine Korrelation zwischen der ACE-Konzentration eines Sees und der Menge eingetragenen, behandelten Abwassers.

Einzelbefunde zeigten, dass ACE unter bestimmten Bedingungen eliminiert werden kann. So berichteten Buerge *et al.* (2009) von 60% ACE-Elimination in einer der zehn untersuchten Kläranlagen. Scheurer *et al.* (2009) beobachteten 27% bzw. 41% Elimination in zwei Kläranlagen und auch bei Scheurer *et al.* (2011) trat in einer von fünf Anlagen Elimination (25%) auf. Diese Befunde sowie mögliche Ursachen für einen Abbau wurden jedoch nicht explizit diskutiert oder untersucht. In Laborstudien von Buerge *et al.* (2011) mit ACE versetztem Bodenmaterial wurde nach zwei bis drei Monaten mehr als 60% des ACE-Gehalts entfernt. Tran *et al.* (2014) berichteten, dass in einem Batch-Versuch mit nitrifizierendem Belebtschlamm ca. 20% ACE entfernt wurden. In beiden Studien wurde vermutet, dass dieser Abbau durch spezielle mikrobielle Gemeinschaften verursacht wurde, welche sich von den üblicherweise in Kläranlagen auftretenden Gemeinschaften unterschieden. Burke *et al.* (2014) vermuteten schließlich entsprechend der Ergebnisse mehrerer Säulenversuche eine starke Abhängigkeit des ACE-Abbaus von den äußeren Bedingungen (Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit).

Mitte 2014, direkt vor dem Start der eigenen praktischen Arbeiten, waren dies jedoch Einzelbefunde. Es existierten weder Berichte über großflächige ACE-Elimination während der konventionellen Abwasserbehandlung noch wurde genau aufgeklärt, wie und unter welchen

Bedingungen ACE bioabbaubar ist. ACE galt weiterhin als nicht bioabbaubar und wurde deshalb als Indikatorsubstanz für unter allen Redoxbedingungen persistentes Verhalten verwendet. Vermehrte Befunde über Elimination in der Abwasserbehandlung bzw. Bioabbau traten erst kürzlich auf (Bourgin *et al.* 2018, Burke *et al.* 2017, Cardenas *et al.* 2016, Castronovo *et al.* 2017, Falås *et al.* 2016, Hermes *et al.* 2018, Jones *et al.* 2017, Völker *et al.* 2017, Yang *et al.* 2017). Die entsprechenden Studien werden im Rahmen der Vorstellung von Publikation 2 diskutiert.

2.3. Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie

Die Analyse organischer Spurenstoffe in Abwasser erfordert sensitive und gleichzeitig (substanz-) selektive Techniken. Weit verbreitet ist deshalb der Einsatz chromatografischer Trennmethoden, insbesondere der Flüssigchromatografie (LC, *engl. liquid chromatography*) gekoppelt mit der Massenspektrometrie (MS) (Richardson & Kimura 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC, *engl. high performance liquid chromatography*) in Umkehrphase (RP, *engl. reversed phase*) als Trennmethode unter Verwendung von Direktinjektion eingesetzt. Gekoppelt wurde die HPLC an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisation (ESI) zur Detektion. Die Techniken werden im Folgenden näher erläutert.

Bei der LC mit RP verteilen sich die Probenkomponenten zwischen polaren mobilen Flüssigphasen und unpolaren stationären Festphasen. Unterschiedlich starke Wechselwirkungen (Verteilungskoeffizienten) mit diesen Phasen führen zur Retardierung der Komponenten. Weniger polare Analyten wechselwirken stärker mit der unpolaren stationären Phase, werden daher stärker zurückgehalten und eluieren später als polare Analyten. Um den Trennprozess zu verbessern wird oft die Gradienten-Methode angewandt: Sukzessives Herabsetzen der Polarität der mobilen Phase erhöht die Elutionskraft für weniger polare Analyten. Dadurch eluieren diese früher und konzentrierter als bei isokratischer Elution (Corradini 2011, Kellner *et al.* 2004, Niessen 2006).

Um die getrennten Komponenten mittels MS nachweisen zu können, müssen sie in Ionen und in die Gasphase überführt werden. Bei der ESI wird die Analysenlösung bzw. das Eluat der Flüssigchromatografie mittels eines Inertgases (N₂) und einer Spraykapillare unter Atmosphärendruck versprüht. Die anliegende, positive oder negative elektrische Hochspannung überträgt eine entsprechende Ladung auf die Tröpfchen. Die geladenen Tröpfchen bewegen sich dann zur Gegenelektrode am Einlass zum Massenspektrometer, wobei aus diesen durch Wärmeeinwirkung sukzessiv Lösungsmittel verdampft. Die Oberflächenladungsdichte erhöht

sich, bis die Abstoßung zwischen gleichen Ladungen größer wird als die Oberflächenspannung. Es kommt zur *Coulomb*-Explosion und zur Freisetzung von ein- oder mehrfach geladenen Ionen in die Gasphase. Es werden vornehmlich protonierte oder deprotonierte Molekülionen ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) gebildet, aber auch eine Adduktbildung durch Anlagerung von z.B. Acetat oder Natriumionen ist möglich. Mittels ESI werden kaum Fragmentationen gebildet, da nur wenig Energie übertragen wird (weiche Ionisation).

Im Massenanalysator werden die Ionen unter Hochvakuum nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt. Als Massenanalysatoren finden z.B. Quadrupole oder Flugzeitanalysatoren (TOF, *engl. time of flight*) Anwendung. Die Kombination mehrerer Massenanalysatoren erlaubt die Durchführung von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol für MS/MS-Analysen sowie das *multiple reaction monitoring* (MRM) als Messmodus verwendet. Hierbei werden nur die ausgewählten Ionen (Fragmentierungsreaktionen) erfasst, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N , *engl. signal-to-noise ratio*) sinkt. Gleichzeitig verbessern sich die Nachweisgrenzen, da mehr Scans pro ausgewähltem m/z durchgeführt werden können. Im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer fungieren im MRM-Modus der erste und der letzte Quadrupol als Massenfilter. Im zweiten Quadrupol werden die einströmenden Ionen durch Kollision mit Inertgasmolekülen, z.B. Argon oder Stickstoff, abhängig von der gewählten Kollisionsenergie substanzspezifisch mehr oder weniger stark fragmentiert (kollisionsinduzierte Dissoziation). Zur eindeutigen Identifizierung wird bei LC-MS/MS-Untersuchungen empfohlen, für jede Substanz mehrere Ionen bzw. Massenübergänge zu erfassen. Zusätzlich müssen deren Signale in der Probe das gleiche relative Intensitätsverhältnis und die gleiche Retentionszeit aufweisen wie im Referenzstandard (European Commission 2015, Gross 2011, Kellner *et al.* 2004, Kushnir *et al.* 2005, Niessen 2006, Skoog *et al.* 2013).

Die Direktinjektion wird in der HPLC eingesetzt, wenn die Zielanalyten in der Probe in ausreichender Konzentration vorliegen. Die Probenvorbereitung kann sich dadurch bspw. auf Filtration beschränken, wodurch der Aufwand deutlich reduziert wird. Jedoch gelangen bei Direktinjektion alle in der Probe enthaltenen Komponenten auf die Trennsäule. Hochkomplexe Matrices, wie unverdünnte biologische Proben, sollten daher nicht direkt injiziert werden. In jedem Fall muss eine gute chromatografische Trennung erreicht werden, da eine Koelution von Matrixbestandteilen und Zielanalyten die Ionisierung des Analyten beeinflussen kann (Matrixeffekte). Das Analytsignal in der Probe kann sich dadurch signifikant vom Signal in matrixfreier Lösung (z. B. Kalibrierstandard) unterscheiden. Die Effektivität der Ionisierung des Zielanalyten kann erhöht (Ionenverstärkung) oder vermindert werden (Ionensuppression). Beide

Effekte können zu einer fehlerhaften Quantifizierung führen, wenn extern kalibriert wird und sich Kalibriermatrix und Probenmatrix stark voneinander unterscheiden (Matuszewski *et al.* 2003, Niessen 2006, Panuwet *et al.* 2016, Skoog *et al.* 2013). Um diese Effekte zu minimieren, kann über interne Standards als relative Bezugsgröße quantifiziert werden. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Interne Standards sind probenfremde, dem Analyt (möglichst) ähnliche und dadurch ähnlichen Prozessen unterworfen, simultan bestimmbare Substanzen (Adamovics 1997). Am besten eignen sich isotope markierte Varianten der Analyten: Isotopologe besitzen praktisch die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften und verhalten sich in der HPLC-MS/MS hinsichtlich chromatografischer Trennung (Wechselwirkungen, Retentionszeit) und Ionisierung (inkl. Matrixeffekte) nahezu identisch (Niessen 2006, Skoog *et al.* 2013). Isotope markierte Standards werden daher häufig als interne Bezugsgröße zur automatischen Korrektur von Matrixeffekten eingesetzt. Sie werden jeder Probe in gleicher Menge vor der Probenvorbereitung zugegeben, um auch Analytverluste während dieser, z. B. durch unvollständige Extraktion, der Lagerung sowie der Einbringung in das Analysengerät zu kompensieren (Kellner *et al.* 2004, Niessen 2006, Skoog *et al.* 2013).

3. Reinigungsleistung der ausgewählten Pflanzenkläranlagen

3.1. Methoden

3.1.1. Anlagenbeschreibung und Durchführung der Studie

Pflanzenkläranlagen

Die untersuchten Untergrundpflanzenkläranlagen sind Teil der Pilotanlage Langenreichenbach (Sachsen, Deutschland). Diese wurde im Jahr 2000 konstruiert, 2009 grundlegend überholt und beherbergt 15 Bodenfilter verschiedener Bauart und Betriebsweise. Die Pilotanlage wird mit kommunalem Abwasser beschickt, welches der Druckleitung vor der benachbarten kommunalen Kläranlage (Abwasserzweckverband Heidelberg) entnommen wird. Dieses Rohabwasser gelangt zunächst in den Absetztank der Pilotanlage (16,5 m³, ca. 2 d Aufenthaltszeit; Kürzel: SEP). Zu- und Abflussrate des Absetztanks waren während aller Arbeiten konstant. Der Ablauf des Tanks fungiert als Zulauf für alle Pflanzenkläranlagen, die als Einzelsysteme bzw. erste Stufe mehrstufiger Systeme betrieben werden. Die Abläufe aller Systeme der Pilotanlage werden zur finalen Aufbereitung in die konventionelle Kläranlage geleitet.

Es wurden drei Teilstudien mit verschiedenen Pflanzenkläranlagen durchgeführt:

- (1) Für eine Ein-Jahres-Monitoringstudie wurden drei Systeme klassischer sowie drei Systeme intensiver Bauart untersucht. Zu den Systemen klassischer Art gehörten ein horizontal durchströmtes System (H50p), ein größtenteils ungesättigtes, vertikal

durchströmtes System (VGp) sowie ein zweistufiges System (VGp + VSp) bestehend aus VGp und einem nachfolgenden, hauptsächlich ungesättigtem Sandfilter (VSp). Unter den intensivierten Systemen waren je eine aktiv belüftete Pflanzenkläranlage mit horizontalem (HAp) bzw. vertikalem (VAp) Fluss sowie ein System bestehend aus zwei Kammern, in denen das Wasser hin und her gepumpt wird (R). Der gemeinsame Zulauf sowie alle individuellen Abläufe wurden zwischen Juni 2014 und Mai 2015 beprobt. Die Ergebnisse dieser Teilstudie sind in Publikation 1 (s. Kapitel 3.2.1 und 6.1) dargestellt.

- (2) Ebenfalls über ein Jahr verfolgt wurde das Anlaufen zweier intensivierter Anlagen mit horizontalem Fluss und aktiver Belüftung. Eines der Systeme wurde über die komplette Länge gleichmäßig belüftet (HMc), das andere nur bis 40% und ab 70% der Länge (HM). Als Vergleich diente ein bereits seit Jahren eingelaufenes System mit ebenfalls horizontalem Fluss und vollständiger Belüftung (HAp). HM und HMc wurden im September 2014 in Betrieb genommen und bis einschließlich August 2015 beprobt. Die Beprobung des Ablaufs von HAp und des gemeinsamen Zulaufs wurde nach Teilstudie 1 entsprechend um drei Monate verlängert.
- (3) Die Reaktion auf kurzfristige Betriebsstörungen (Resilienz), konkret auf den Ausfall der Belüftung, sowie das Verhalten nach Behebung des simulierten Defektes wurde an zwei weiteren aktiv belüfteten, unbepflanzten Systemen untersucht. Eines war vertikal (VA), das andere horizontal (HA) durchströmt. Die Beprobung der Abläufe sowie des gemeinsamen Zulaufs erfolgte Anfang Juni bis Ende Juli 2015 sowie Ende Juni bis Mitte August 2015.

Eine Übersicht und kurze Charakterisierung der untersuchten Pflanzenkläranlagen ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Systeme sind außerdem in Abbildung A-1 bis Abbildung A-6 schematisch dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Pilotanlage Langenreichenbach und aller beim Start der Monitoringkampagne (Juni 2014) vorhandenen Systeme sowie deren schematische Darstellung kann im Artikel von Nivala *et al.* (2013a) nachgelesen werden.

Stichproben der Abläufe der jeweils untersuchten Pflanzenkläranlagen sowie des gemeinsamen Zulaufs wurden, sofern nicht anders angegeben, gleichzeitig entnommen. Diese Art der Beprobung (*engl. grab sampling*) ist in Pflanzenkläranlagen-Studien die üblichste Probenahmemethode (Verlicchi & Zambello 2014). Da dabei die Verweilzeit des Wassers im System (HRT, *engl. hydraulic residence time*) nicht berücksichtigt wird, sind die ermittelten Konzentrationen sowie daraus berechnete Entfernungen mit einer gewissen Unsicherheit behaftet (Kadlec & Wallace 2009). Aus logistischen Gründen war eine Beprobung entsprechend der individuellen HRT aller Systeme nicht möglich. Überdies liegt in Pflanzenkläranlagen keine

ideale Pfropfenströmung vor, sodass die HRT kein Einzelwert ist, sondern eine Verteilung aufweist, welche sich über das Dreifache der theoretischen HRT erstrecken kann (Kadlec & Wallace 2009). Kadlec & Wallace (2009) empfehlen daher, Messwerte des Zu- bzw. Ablaufs über einen Zeitraum von mindestens drei HRT zu mitteln und nur diese Mittel zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Berechnung der frachtbasierten Entfernungen (Formel 3-1) die entsprechenden Zu- und Ablaufkonzentrationen (c_{in} , c_{out}) sowie die Flussraten (Q_{in} , Q_{out}) pro Monat und über den gesamten Beobachtungszeitraum gemittelt. In Studie 1 traten innerhalb einer Saison (warme bzw. kalte Periode) teils sehr großen Schwankungen der Reinigungsleistung auf. Diese werden von einem Medianwert über die gesamte Saison nicht abgebildet. Daher wurden hier die Eliminationen jedes inkludierten Probenahmetages berechnet. Um trotzdem der Empfehlung zur Mittelung zu folgen, wurde diese dann in einem Boxplot für die jeweilige Periode zusammengefasst. Zur Berechnung der Frachten wurde für jeden Probenahmetag der Monatsmedian der Flussraten verwendet.

$$\text{Entfernung, frachtbasiert (\%)} = 100 \times \left(\frac{Q_{in}c_{in} - Q_{out}c_{out}}{Q_{in}c_{in}} \right) \quad \text{Formel 3-1}$$

Über den Tagesverlauf zu erwartende Schwankungen der Abwasserzusammensetzung sollten auf der Seite des Zulaufs durch den Absetztank (HRT = 2 d) abgemildert werden. Auf der Ablaufseite wurden die (verbleibenden) Schwankungen durch die vergleichsweise hohe HRT der Pflanzenkläranlagen (≥ 3 d) weiter abgeschwächt.

Die Beprobung der Systeme in Teilstudie 1 und 2 erfolgte wöchentlich, sofern der Probenahme keine größeren Regenereignisse voraus gingen oder Störungen der Anlage vorlagen. Zur Berechnung der monatlichen sowie jährlichen Flussrate aller Systeme wurden tägliche Flussraten während und nach großen Regenereignissen nicht verwendet. Im August 2014 wurden Wartungsarbeiten am Absetztank durchgeführt, sodass keine Beprobung stattfand. Aufgrund eines Pumpenausfalls konnte von VGp sowie VGp + VSp im Februar 2015 jeweils nur eine Probe entnommen werden. Für Studie 1 konnten insgesamt je 42 Proben des Zulaufs (SEP) sowie des Ablaufs von H50p, R, VAp sowie HAp und je 40 Proben des Ablaufs von VGp sowie VGp + VSp gesammelt werden. In Studie 2 wurden 45 Probenahmen durchgeführt. Neben den sieben Indikatoren (CAF, IBU, NPX, BTZ, DCL, ACE, CBZ; Vgl. Tabelle 2-3 in Kapitel 2.2.2) wurden folgende Parameter bestimmt (Methoden s. Publikation 1 in Kapitel 6.1): Redoxpotential (E_H), Temperatur (T), gelöster Sauerstoff (DO, *engl. dissolved oxygen*), elektrische Leitfähigkeit (EC, *engl. electrical conductivity*), Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs (TOC, *engl. total organic carbon*) sowie organisch und anorganisch gebundenen Stickstoffs (TN, *engl. total nitrogen*) und suspendierter Feststoffe (TSS, *engl. total suspended*

solids), Stickstoff stammend aus Ammonium ($\text{NH}_4\text{-N}$) oder Nitrat und Nitrit ($\text{NO}_x\text{-N}$), Biochemischer Sauerstoffbedarf, der innerhalb von fünf Tagen zum Abbau kohlenstoffhaltiger Verbindungen benötigt wird (CBOD₅, engl. *five-day carbonaceous biochemical oxygen demand*). Der Gesamt-Phosphorgehalt wurde nicht bestimmt.

Tabelle 3-1. Charakterisierung der untersuchten Untergrundpflanzenkläranlagen inkl. Beschickung während der untersuchten Zeiträume und Zuordnung zu den drei Teilstudien. Studie 1: Juni 2014 – Mai 2015, Studie 2: September 2014 – August 2015, Studie 3: Juni – August 2015. Außer R, VA und HA waren alle Systeme bepflanzt (*Phragmites australis*), „Tiefe“ meint die effektive Tiefe (maximale Füllhöhe) des Systems. Die Anlagen sind in Abbildung A-1 bis Abbildung A-6 schematisch dargestellt.

Anlagen-kürzel	Systemtyp	Tiefe (cm)	Sättigungszustand	Substrat	Grundfläche (m ²)	Beschi-ckung (L/d)	Teil-Studie
Klassische Designs							
H50p	HF	50	gesättigt	Kies (8-16 mm)	5,6	200	1
VGp	VF	85	untere 30 cm gesättigt	Kies (4-8 mm)	6,2	576	1
VGp + VSp	VF	je 85	untere 30 cm gesättigt (VGp), ungesättigt (VSp)	Kies (4-8 mm) Sand (1-3 mm)	2 x 6,2	576	1
Intensivierte Designs							
R	Fluss alter-nierend	95	alternierend, untere 45 cm stets gesättigt	Kies (8-16 mm)	13,2	1460	1
VAp	VF, belüftet	85	gesättigt	Kies (8-16 mm)	6,2	576	1
HAp	HF, belüftet	100	gesättigt	Kies (8-16 mm)	5,6	770	1, 2
HMc	HF, belüftet	100	gesättigt	Kies (8-16 mm)	5,6	576	2
HM	HF, teil-belüftet ^a	90	gesättigt	Kies (8-16 mm)	5,6	576	2
VA	VF, belüftet	85	gesättigt	Kies (8-16 mm)	6,2	576	3
HA	HF, belüftet	100	gesättigt	Kies (8-16 mm)	5,6	576	3

^a keine Belüftung des Systems zwischen 40% und 70% der Länge

Teilstudie 3 wurde als Ergänzung zu den Untersuchungen von Boog *et al.* (2018) durchgeführt. Boog *et al.* (2018) untersuchten die Resilienz der Kohlenstoff- und Stickstoffentfernung in HA und VA nach simuliertem Ausfall der aktiven Belüftung während einer warmen sowie einer kalten Periode (Juni – August 2015; Januar – Februar 2016). Die genaue Durchführung der Studie inkl. der Ergebnisse bzgl. der klassischen Abwasserqualitätsparameter kann dort nachgelesen werden. Ergänzend wurden in Proben aus dem Sommer 2015, die zuvor unfiltriert bei -20 °C gelagert worden waren, entsprechend der in Publikation 1 beschriebenen Methode die Indikatoren quantifiziert (s. Kapitel 6.1). Zunächst sollte durch Analyse von Stichproben aus den Wochen vor dem Abschalten der Belüftung (störungsfreier Betrieb) die Basisperformance von HA und VA bzgl. der Indikator-Konzentrationen erfasst werden (n = 5 – 6). Anschließend wurde der Ausfall der Belüftung durch Abschalten der Pumpen für sechs Tage simuliert. Es

wurden währenddessen und während der folgenden acht Tage nach Wiedereinschalten der Belüftung mehrmals täglich Stichproben des Zu- und Ablaufs von HA und VA entnommen (Autosampler). Einige dieser Proben wurden neben den in Boog *et al.* (2018) bereits dargestellten Parametern auch bzgl. der Indikatorkonzentration charakterisiert ($n = 21 - 23$). Die Indikatorkonzentrationen im Zulauf der Anlage wurden ebenfalls erfasst ($n = 12 - 14$).

Kommunale Kläranlage

Die kommunale Kläranlage Langenreichenbach wurde begleitend zu Studie 1 beprobt, um die Performance der konventionellen Abwasseraufbereitung und der dezentralen Behandlung über Pflanzenkläranlagen (Pilot-Maßstab) zu vergleichen. Die Pilot-Anlage wurde in direkter Nachbarschaft zur kommunalen Kläranlage gebaut, sodass die Abläufe der Pflanzenkläranlagen nicht direkt in ein Oberflächengewässer eingeleitet, sondern zunächst der konventionellen Behandlung unterzogen werden konnten. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass auch bei schlechter Reinigungsleistung der Pflanzenkläranlagen kein Ablauf mit hoher Schad- und Schmutzstofffracht in die Umwelt eingetragen wird.

Die kommunale Kläranlage ist zweistraßig konzipiert und besitzt eine Kapazität von 16.000 Einwohnerwerten bei einem Zulauf von ca. $1100 \text{ m}^3/\text{d}$. Zufließendes Abwasser stammt größtenteils aus Trennsystemen der umliegenden Gemeinden und wird mittels Rechen sowie Sand- und Fettfang vorgereinigt. Das Abwasser ist häuslich, mit einem geringen gewerblichen Anteil (Fleischverarbeitung). Die biologische Abwasserreinigung (C, N, P) erfolgt in der Kläranlage mittels Belebtschlammverfahren (aerob und anaerob) inkl. Nachklärung (Vgl. Abbildung 2-3, Kapitel 2.1.2). Phosphor wird biologisch und chemisch entfernt.

Probenahmen erfolgten auf der Anlage routinemäßig alle zwei Stunden durchflussproportional per Autosampler. Die Analyse von CBOD_5 (Methode s. Publikation 1 in Kapitel 6.1), $\text{NH}_4\text{-N}$ und $\text{NO}_3\text{-N}$ (beide: Küvettentests, Hach-Lange GmbH) wurde durch das Anlagenpersonal einmal wöchentlich in einer 24h-Mischprobe von Zulauf (nach Rechen und Sandfang) und Ablauf (nach der Nachklärung) bestimmt. Für die Analyse der Indikatoren wurden im August, Oktober und Dezember 2014 sowie Januar, März und May 2015 jeweils 24h-Mischproben von zwei aufeinanderfolgenden Tagen hergestellt ($n = 12$). Da nur Messwerte für den Zulaufstrom, nicht für den Ablaufstrom, vorlagen und außer bei großen Niederschlagsereignissen das Ablaufvolumen dem Zulaufvolumen entspricht, wurden für die konventionelle Kläranlage Entfernungen auf Basis der Zu- und Ablaufkonzentrationen (c_{in} , c_{out}) anstelle der Frachten berechnet (Formel 3-2).

$$\text{Entfernung, konzentrationsbasiert (\%)} = 100 \times \left(\frac{c_{\text{in}} - c_{\text{out}}}{c_{\text{in}}} \right) \quad \text{Formel 3-2}$$

3.1.2. Entwicklung und Validierung der HPLC-MS/MS-Methode

Die Einschätzung der Spurenstoffentfernung in den Pflanzenkläranlagen sowie konventionellen Kläranlagen erfolgte durch Ermittlung der Entfernung von sieben ausgewählten Indikatorsubstanzen. Jeder Indikator wurde über interne Kalibration mittels eines individuellen isotoptenmarkierten (deuterierten) Standards quantifiziert. Die Strukturen der 14 Substanzen sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt. Für die sieben Substanzen und sieben internen Standards wurde eine gemeinsame RP-HPLC-MS/MS-Methode mit Direktinjektion entwickelt. Die Probenvorbereitung bestand lediglich aus der Filtration der Proben und Zugabe der internen Standards. Eine kurze Zusammenfassung der Methode ist in Publikation 1 veröffentlicht (s. Kapitel 6.1). Im Folgenden sollen die weiteren Validierungsparameter ergänzend gezeigt werden.

Die HPLC-MS/MS-Methode wurde durchgeführt mit einem Agilent 1260 Infinity HPLC-System und einem QTRAP 5500 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (AB Sciex), angesteuert über die Software Analyst 1.6.2 (AB Sciex). Die Trennung der Analyten erfolgte mittels einer Umkehrphasen-Trennsäule (Ascentis Express C18, 50 x 3 mm x 2,7 µm, Supelco/Sigma Aldrich), bei einer Flussrate von 300 µL/min und 35 °C. In der Gradientenelution (Abbildung 3-1) dienten Reinstwasser mit 0,1 Vol.-% Essigsäure (A) bzw. Methanol mit 0,1 Vol.-% Essigsäure (B) als mobile Phasen. Die Gradientenmethode hatte eine Laufzeit von 12,5 min. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nur während der ersten 7 min, wobei das Eluat der ersten 0,5 min ebenfalls verworfen wurde.

Für jeden Analyten (Indikatoren, interne Standards) wurden die zwei intensivsten Massenübergänge ausgehend vom Molekülion detektiert. Der intensivste Übergang diente der Quantifizierung (*Quantifier*), der andere zur Identitätsbestätigung (*Qualifier*). Zur Erhöhung der Ionenausbeute wurden die Geräteparameter des Massenspektrometers, z. B. die Kollisionsenergie, für jeden Übergang optimiert. Ionen beider Polaritäten wurden im *polarity switching* Modus (schnelles Umschalten der angelegten Spannung) nebeneinander analysiert. Die Isotopologe von BTZ, CAF, CBZ und NPX wurden im positiven Ionisierungs- und Messmodus erfasst, ACE-, DCL- und IBU-Isotopologe im negativen Modus. Alle Substanzen außer den ACE-Isotopologen wurden im *scheduled* MRM-Modus (sMRM) detektiert. Hierbei wurden die Massenübergänge nur innerhalb eines festgelegten Zeitfensters von 60 s um die Retentionszeit detektiert. Beispielchromatogramme einer Standardmischung aller Analyten sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Retentionszeiten, Vorläufer- und Produktionen sowie die optimierten Massenspektrometereinstellungen können Table S2 in den SI von Publikation 1 entnommen werden (s. Kapitel 6.1).

Die festgelegte Konzentration der IS in allen Proben orientierte sich an den durchschnittlichen Indikatorkonzentrationen in Realproben (Abwasser vor und nach Behandlung) sowie ausreichender Signalintensität der IS. Die festgelegten Zielkonzentrationen der IS sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2. Chemische Strukturen der ausgewählten Indikatoren und der entsprechenden isotonenmarkierten, internen Standards (IS) sowie Konzentrationen der IS in allen Proben. Die Konzentration von ACE-d₄ bezieht sich auf die freie Säure.

Indikator	Struktur Indikator	Interner Standard (IS)	Struktur IS	Konzentration IS (ng/mL), alle Proben
CAF		CAF-d ₉		7,50
IBU		IBU-d ₃		40,0
NPX		NPX-d ₃		7,50
BTZ		BTZ-d ₄		7,50
DCL		DCL-d ₄		5,00
ACE		ACE-d ₄		17,5
CBZ		CBZ-d ₁₀		5,00

Die Quantifizierung der Indikatorsubstanzen erfolgte mit den genannten internen Standards, die vor der Messung jeder Probe zugegeben wurden. Den Fragmentierungen der Indikatoren wurden dabei gleiche Fragmentierungsreaktionen der IS zugeordnet. Die Kalibrierung war eine Funktion der relativen Peakfläche in Abhängigkeit von der relativen Konzentration (Indikator/IS). Die konstante Konzentration der IS in allen Proben resultiert in einer konstanten Peakfläche der entsprechenden Massenübergänge in den Kalibrierlösungen, während die Konzentration der Indikatoren und die Peakflächen der Massenübergänge stiegen (Abbildung 3-2a). Daraus ergaben sich lineare Kalibrierfunktionen (Abbildung 3-2c).

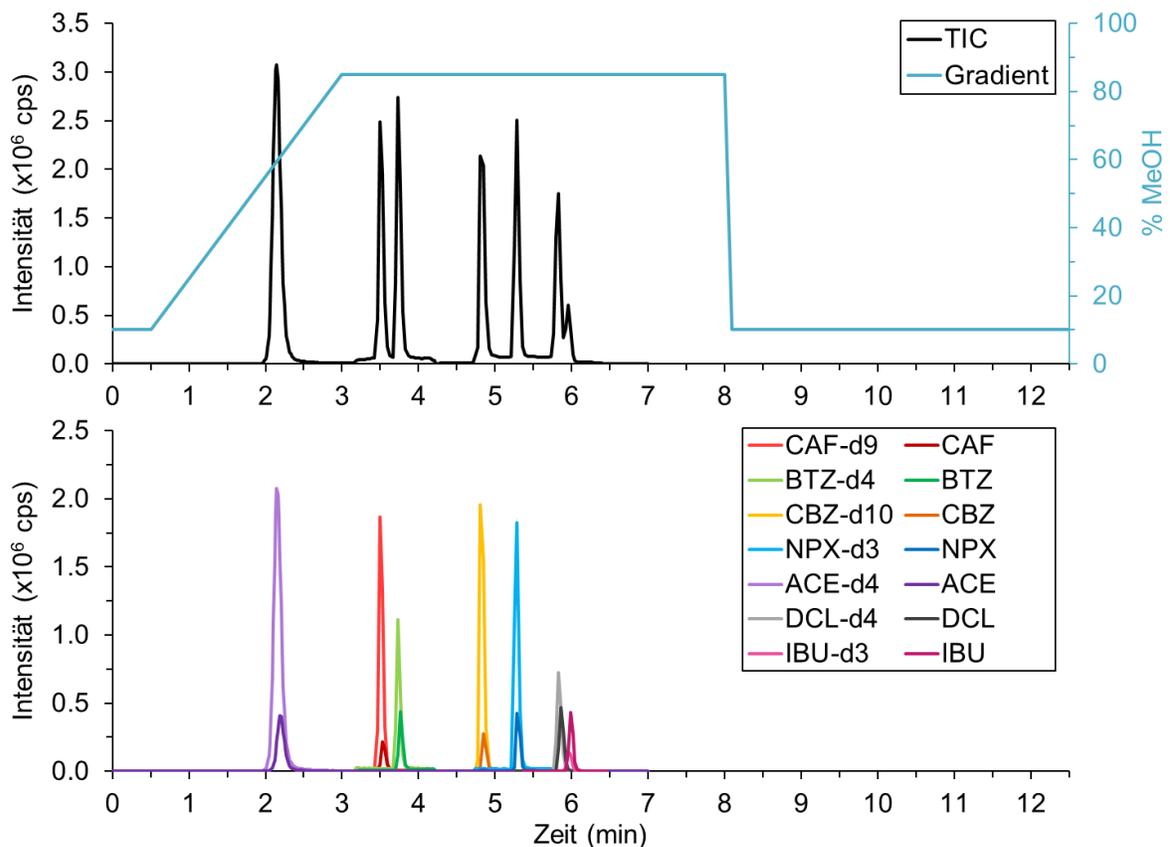


Abbildung 3-1. Oben: Chromatogramm des Totalionenstroms (TIC, engl. total ion current) und Gradientenprogramm der mobilen Phase (A: Reinstwasser mit 0,1% Essigsäure, B: Methanol mit 0,1% Essigsäure). Unten: Chromatogramm mit allen *Quantifizier*-Übergängen der Indikatoren sowie internen Standards. Konzentration der Analyten: 0,5 – 10 ng/mL (Indikatoren) bzw. 5,0 – 40 ng/mL (interne Standards).

Dies traf für DCL nicht zu: Entsprechend der natürlichen Häufigkeit von ^{35}Cl (75,77%; Holleman & Wiberg (2007)) liegen DCL bzw. DCL- d_4 rechnerisch am häufigsten (relative Häufigkeit: 57,41%; siehe Abbildung A-7) als Molekül mit zwei ^{35}Cl -Atomen vor. Der häufigste respektive intensivste Massenübergang (Decarboxylierung) von DCL- d_4 ist damit ausgehend vom Molekülionen m/z 298 ($[\text{DCL-}d_4 - \text{H}]^+$) zu beobachten. Dieses m/z weist allerdings auch das

Molekülon von DCL mit zwei ^{37}Cl (relative Häufigkeit: 5,87%) auf, wodurch das Signal von $^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}\cdot\text{DCL}\text{-d}_4$ überlagert wird. Die Peakfläche des Massenübergangs von DCL-d₄ stieg folglich mit zunehmender DCL-Konzentration (Abbildung 3-2b) und resultierte in einer quadratischen Kalibrierfunktion (Abbildung 3-2c). Die stellt einen systematischen Fehler dar.

Alternative, von Isotopologen des DCL (bezogen auf Chlor) unbeeinflusste DCL-d₄-Übergänge können von den Molekülonen m/z 300 ($[^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4\text{-H}]^-$) bzw. m/z 302 ($[^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4\text{-H}]^-$) ausgehen. Aufgrund der höheren relativen Häufigkeit (36,72%; Berechnung Vgl. Abbildung A-7) wurde nur die Eignung von $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4$ als alternativer Quantifizier-Übergang geprüft. Hierzu wurden drei Reinstwasserproben mit 5 ng/mL DCL-d₄ und 0,6 ng/mL bzw. 6 ng/mL bzw. 30 ng/mL DCL versetzt und die Massenübergänge der Decarboxylierung von DCL und DCL-d₄-Isotopologen verfolgt.

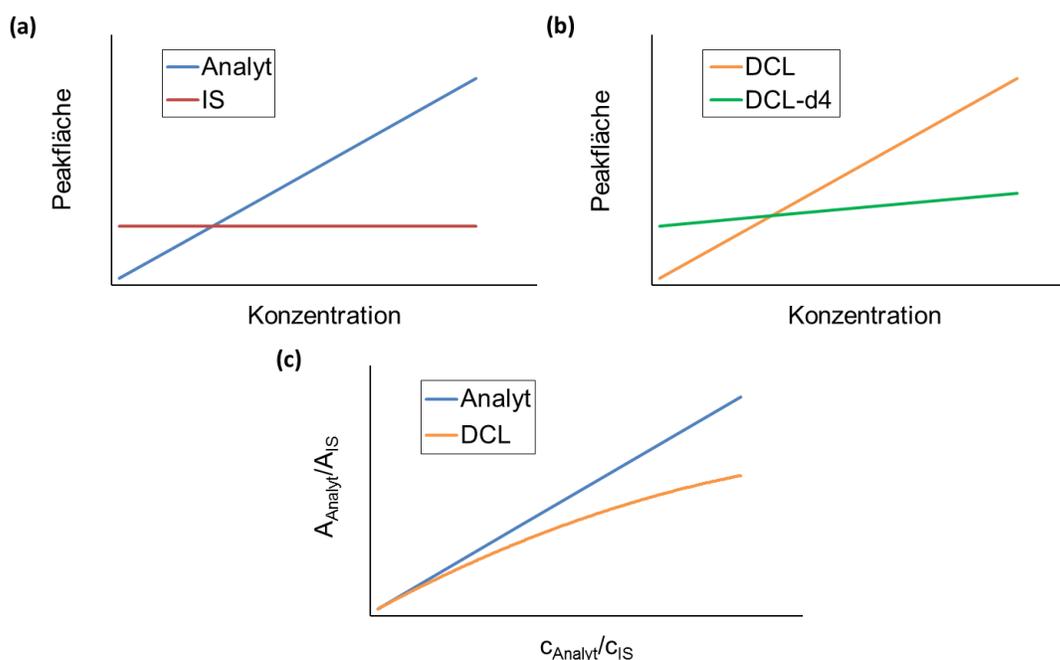


Abbildung 3-2. Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Peakfläche gewählter Massenübergänge von der Konzentration des Analyten (Konzentration in Kalibrierstandards veränderlich) bzw. internen Standards (IS, Konzentration in Kalibrierstandards konstant) für alle Analyten und IS außer DCL und DCL-d₄ (a) sowie für DCL und DCL-d₄ (b). Diese unterschiedlichen Verläufe der Massenübergänge der IS resultieren in verschiedenen Kalibriergeradenverläufen (c).

Die Peakfläche des Übergangs von $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4$ (m/z 300 \rightarrow m/z 256) blieb, im Gegensatz zum Übergang von $^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4$, bei steigender DCL-Konzentration konstant. Bei Verwendung von $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}\text{-DCL}\text{-d}_4$ als Bezug für den Übergang von DCL ergab sich eine lineare Kalibrierfunktion. Allerdings war, aufgrund der geringeren relativen Häufigkeit und keiner

Überlagerung durch $^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl-DCL}$, die Peakfläche dieses Übergangs deutlich niedriger als die von $^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl-DCL-d}_4$. Mittels der drei Reinstwasserproben wurden Kalibrierungen erstellt und die DCL-Gehalte in zwei Realproben (Zulauf und Ablauf einer Pflanzenkläranlage) berechnet. Unter Verwendung von $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl-DCL-d}_4$ als IS-Übergang ergaben sich höhere DCL-Konzentrationen (4,20 bzw. 2,63 $\mu\text{g/L}$) als mit $^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl-DCL-d}_4$ (3,69 bzw. 2,03 ng/mL). Dennoch wurde in allen folgenden Experimenten der Übergang von $^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl-DCL-d}_4$ als IS verwendet: Zum einen war die Peakfläche dieses Übergangs deutlich größer als die von $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl-DCL-d}_4$, dieses Isotopologe lässt sich also sensitiver nachweisen. Des Weiteren weichen die mit den beiden Methoden (Verwendung von $^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl-DCL-d}_4$ oder $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl-DCL-d}_4$ als IS) ermittelten Werte nicht gravierend voneinander ab (relative Differenz: 12% bzw. 23%). Ob eine Methode Ergebnisse näher am wahren Wert liefert und deshalb hätte bevorzugt werden müssen, konnte aufgrund des Fehlens zertifizierter Referenzstandards nicht überprüft werden. Die Ergebnisse verschiedener Proben können außerdem verglichen werden, solange eine der beiden Methoden durchgängig verwendet wird. Für zukünftige Studien könnte ^{13}C -markiertes DCL als IS verwendet werden, um dieses Überlagerungsproblem zu vermeiden.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Leistungsfähigkeit einer analytischen Methode lässt sich durch Nachweisgrenze (LOD, *engl. limit of detection*) und Bestimmungsgrenze (LOQ, *engl. limit of quantification*) beschreiben. Diese Grenzen sollten zweckmäßigerweise in Probenmatrix bestimmt werden, um gegebenenfalls auftretende signalverändernde Einflüsse der Matrix (Matrixeffekte) zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit stand keine analytfreie oder analytarmer Realprobe (Abwasser) zur Verfügung. Die direkte Bestimmung von LOD und LOQ der sieben Indikatoren in Originalmatrix, z. B. mittels Leerwertmethode nach DIN 32645 (DIN 2008), war dadurch nicht möglich. Stattdessen wurden LOD und LOQ der deuterierten internen Standards bestimmt und diese gleichzeitig als LOD und LOQ der Indikatoren angenommen. Isotopologe verhalten sich naturgemäß nahezu identisch, die deuterierten Formen der Indikatoren kommen jedoch in der Umwelt nicht vor (Kellner *et al.* 2004, Niessen 2006).

Zur Bestimmung von LOD und LOQ wurde nach der S/N-Methode vorgegangen (Wellnitz & Gluschke 2005): Aus Mehrfachmessungen einer analytfreien Realprobe (Leerprobe) werden Mittelwert (\bar{y}_{blank}) und Standardabweichung (N_σ) des Signalrauschens (Signalhöhe) um die Retentionszeit des jeweiligen Analyten ermittelt (Abbildung 3-3). Aus diesen Größen lassen sich LOD und LOQ in Form von Signalhöhen (y_{LOD} , y_{LOQ}) nach Formel 3-3 und 3-4 berechnen:

$$y_{LOD} = \bar{y}_{blank} + 3 \cdot N_\sigma \quad \text{Formel 3-3}$$

$$y_{LOQ} = \bar{y}_{blank} + 9 \cdot N_{\sigma}$$

Formel 3-4

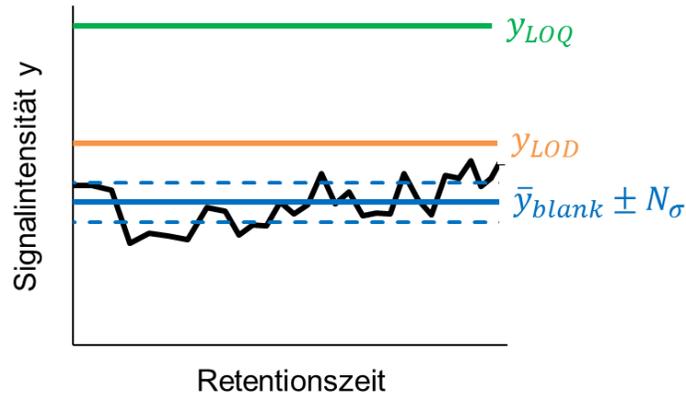


Abbildung 3-3. Schematische Darstellung der Kenngrößen im S/N-Verfahren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD bzw. LOQ): Mittelwert (\bar{y}_{blank}) und Standardabweichung (N_{σ}) des Signalgrundrauschens (schwarze Linie) sowie daraus resultierende Signalthöhen y_{LOD} und y_{LOQ} (Formel 3-3, 3-4).

Um aus y_{LOD} und y_{LOQ} Konzentrationen für LOD und LOQ zu berechnen, muss zunächst eine Kalibriergerade erstellt werden: Die Realprobe wird mit steigenden Gehalten des bzw. der Analyten versetzt, analysiert und eine Kalibriergerade (Signalhöhe y in Abhängigkeit von der Analytkonzentration c) erstellt. Die Konzentrationen sollten dabei so gewählt werden, dass sie LOD und LOQ einschließen und im linearen Bereich einer Kalibrierfunktion liegen. Durch Verrechnen des Anstiegs der so erhaltenen Kalibriergeraden mit y_{LOD} und y_{LOQ} ergeben sich konzentrationsbasierte Werte für LOD und LOQ (c_{LOD} , c_{LOQ}):

$$c_{LOD} = \frac{y_{LOD}}{m}$$

Formel 3-5

$$c_{LOQ} = \frac{y_{LOQ}}{m}$$

Formel 3-6

Aufgrund des großen Sicherheitsfaktors von $3N_{\sigma}$ bzw. $9N_{\sigma}$ sind die berechneten Werte für LOD und LOQ vergleichsweise großzügig bemessen. In der vorliegenden Arbeit war eine solch strenge Methode zur Ermittlung dieser Grenzen wünschenswert, da Proben verschiedenster Komplexität (Zulauf vs. Ablauf) analysiert wurden und in allen LOD und LOQ sicher detektierbar sein sollten. In Proben mit weniger komplexen Matrices können oft auch Konzentrationen detektiert werden, die unterhalb der nach den o. g. (strengen) Regeln berechneten Konzentration für LOQ oder gar LOD liegen. Anhand bestimmter Qualitätsparameter, z. B. Mindestgröße des $S/N=3$ für LOD, kann entschieden werden, ob solche Werte dennoch berücksichtigt werden.

Die Ermittlung von LOD und LOQ der IS und die Übertragung dieser Grenzwerte auf die (nicht isotopenmarkierten) Analyten (Indikatoren) können in manchen Fällen kritisch sein. Zunächst müssen von beiden Isotopologen identische Fragmentierungsreaktionen verfolgt werden, damit Einflüsse auf die Ionisierung und die Ionenausbeute in gleicher Weise wirken und vergleichbare Sensitivität erreicht werden kann. Dies war in der vorliegenden Arbeit der Fall. Da die Retentionszeit von Isotopologen (nahezu) identisch ist, treten die gleichen koeluiierenden Verbindungen auf. Der Einfluss solcher (koeluiierender) Komponenten, die zufällig die gleichen Massenübergänge zeigen wie der Analyt (Indikator) oder der IS, kann sich jedoch unterscheiden; die Höhe des Grundrauschens (in analytfreier Probe) wäre somit verschieden. Die Bestimmung von LOD und LOQ des IS und die Übertragung dieser Grenzen auf den Indikator wäre somit nicht ganz korrekt: Läge bspw. beim Indikator ein höheres Grundrauschen vor als beim IS, würden die tatsächlichen Grenzen für den Indikator unterschätzt. Ebenso kann es ein Problem sein, wenn das Signalauschen unterschiedliche Verläufe aufweist. Das mittlere Rauschen als Grundlage zur Berechnung von LOD und LOQ wäre unter Umständen für den Indikator und den IS verschieden.

Im Folgenden wird das praktische Vorgehen beschrieben, um trotz solcher gegebenenfalls auftretenden Umstände LOD und LOQ der IS ermitteln und auf die Analyten übertragen zu können. Zunächst wurde eine Stichprobe des Ablaufs einer Pflanzenkläranlage (R, s. Tabelle 3-1) filtriert (RC-Membran, 0,45 μm) und mehrfach mit der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode analysiert (Leerprobe bzgl. der IS, $n = 6$). Die Signalhöhen der als Quantifier benutzten Massenübergänge der IS im Intervall ± 30 s um die Retentionszeit bzw. für ACE-d₄ zwischen 1,60 – 4,98 min wurden erfasst und mit der Höhe des Rauschens des Übergangs des entsprechenden Indikatoren in dieser Probe verglichen. Die Massenübergänge von ACE und ACE-d₄, IBU und IBU-d₃ sowie NPX und NPX-d₃ zeigten vergleichbares Rauschen; in Reinstwasser wurde für die undeuterten Spezies kein Signal erfasst. LOD und LOQ von ACE, IBU und NPX, zunächst in Form von Signalhöhen, wurden daher mittels des Rauschens des Massenübergangssignals der IS in der Ablaufprobe ermittelt (Tabelle 3-3). Die Höhe des Rauschens der Massenübergänge der Isotopologe von BTZ, CAF, CBZ und DCL unterschieden sich jeweils voneinander, entweder durch die Höhe des Rauschens (BTZ), durch das Auftreten eines (Stör-) Peaks beim Massenübergang des Indikatoren bereits in Reinstwasser (CBZ, DCL) oder beides (CAF). In diesen Fällen wurden \bar{y}_{blank} und N_{σ} aus der Signalhöhe der Massenübergänge der Indikatoren (BTZ, CAF, CBZ, DCL) in Reinstwasser bestimmt, da deren Signalhöhen größer waren als das Rauschen der entsprechenden IS und zur sicheren Bestimmung der Indikatorgehalte erst überwunden werden müssen. Die ermittelten Werte für

\bar{y}_{blank} , N_{σ} , y_{LOD} und y_{LOQ} für alle besagten Analyten (ACE-d₄, BTZ, CAF, CBZ, DCL, IBU-d₃, NPX-d₃) sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Nach Bestimmung von \bar{y}_{blank} und N_{σ} sowie Berechnung von y_{LOD} und y_{LOQ} wurden Konzentrationsreihen (niedriger Konzentrationsbereich) der IS im gleichen Ablauf von R, der auch zur Bestimmung des Grundrauschens (einiger Analyten) verwendet wurde, hergestellt. Aliquote dieser Probe wurden mit steigender Menge IS-Mix versetzt, filtriert (RC-Membran, 0,45 μ m) und analysiert. Anschließend wurden lineare Ausgleichsfunktionen für den Zusammenhang der Signalthöhe des IS und dessen Konzentration erstellt (Tabelle A-1). Die zuvor ermittelten y_{LOD} und y_{LOQ} wurden durch den Anstieg (m) dieser Geraden dividiert, um konzentrationsbasierte Grenzen (c_{LOD} , c_{LOQ}) zu erhalten (Formel 3-5, 3-6). Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Tabelle 3-3. Matrices zur Bestimmung des Grundrauschens (\bar{y}_{blank}) und dessen Standardabweichung (N_{σ}) sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD bzw. LOQ) für die Indikatoren, als Signalthöhe (y_{LOD} , y_{LOQ}) bzw. Konzentration (c_{LOD} , c_{LOQ} ; Formel 3-3 bis 3-6). cps: *counts per second*, Maß für die Signalstärke (Höhe).

Indikator	Rauschen von ..., bestimmt in ...	\bar{y}_{blank} (cps)	N_{σ} (cps)	y_{LOD} (cps)	y_{LOQ} (cps)	c_{LOD} (μ g/L)	c_{LOQ} (μ g/L)
ACE	ACE-d ₄ , Ablauf	3,40E+01	2,11E+01	9,72E+01	2,24E+02	0,001	0,003
BTZ	BTZ, Reinstwasser	7,61E+03	2,50E+03	1,51E+04	4,78E+04	0,107	0,339
CAF	CAF, Reinstwasser	9,21E+03	9,63E+03	3,81E+04	9,59E+04	0,194	0,487
CBZ	CBZ, Reinstwasser	1,02E+03	2,02E+03	7,07E+03	1,92E+04	0,018	0,048
DCL	DCL, Reinstwasser	2,10E+03	3,49E+03	1,26E+04	3,35E+04	0,119	0,317
IBU	IBU-d ₃ , Ablauf	2,94E+03	4,05E+02	4,15E+03	6,58E+03	0,808	1,280
NPX	NPX-d ₃ , Ablauf	1,06E+04	9,21E+02	1,33E+04	1,89E+04	0,061	0,086

Die ermittelten Bestimmungsgrenzen (LOQ) bewegten sich zwischen 3 ng/L (ACE) und 1,28 μ g/L (IBU). Wie oben erwähnt sind diese Grenzwerte nach einer recht strengen Bestimmungsmethode auf Basis der IS ermittelt worden. Inwieweit diese die (sicher) detektierbaren Konzentrationen der Indikatoren über- oder unterschätzen, wurde im Nachgang anhand des üblichen Arbeitsbereiches beurteilt.

Es ist zu beachten, dass in Proben, die deutlich höhere Matrixeffekte aufweisen als die verwendete Stichprobe des Ablaufs einer Pflanzenkläranlage, wie z. B. der Zulauf, die bestimmten Grenzen zu niedrig sein können. Sollten Proben analysiert werden, die große

Matrixeffekte verursachen, aber nur sehr geringe Indikatorkonzentrationen enthalten, müssten für diese LOD und LOQ individuell (für jede Matrix) bestimmt werden. Bei Kenntnis des Matrixeinflusses könnten Korrekturfaktoren in die Quantifizierung einbezogen werden

Kalibrierbereich

Die für die interne Kalibrierung genutzten Konzentrationen der Indikatorkonzentrationen kann in Tabelle 3-4, die Konzentration der IS in Tabelle 3-2 eingesehen werden. Es wurden in jeden Analysenlauf alle Kalibrierstandards inkludiert, um tagesaktuelle Kalibrierfunktionen zu erhalten.

Zunächst wurden alle Punkte der Indikatoren und IS in die Kalibrierung einbezogen, die folgende Kriterien erfüllten:

- (1) Die Signale (Peaks) der Quantifier- und Qualifier-Massenübergänge treten zur korrekten Retentionszeit (± 15 s) auf,
- (2) Das Signal des Quantifier-Überganges weist $S/N \geq 5$ und das Signal seines Qualifier-Überganges $S/N \geq 3$ auf,
- (3) Die Signale der beiden Übergänge liegen im substanzspezifischen Peakflächenverhältnis ($\pm 20\%$) zueinander vor.

Messpunkte, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden nicht in der Kalibrierung berücksichtigt. Gleiches galt für Messpunkte, deren gemäß der vorläufigen Kalibrierfunktion berechnete Ist-Gehalte außerhalb des Toleranzbereiches von $\pm 20\%$ Abweichung vom Soll-Gehalt lagen (Ausreißer). Zudem wurden Konzentrationen eliminiert, die weit über der höchsten Probenkonzentration im jeweiligen Probenbatch lagen, sofern bereits ausreichend Kalibrierpunkte (> 3) vorhanden waren. Die typischerweise einbezogenen Kalibrierpunkte sind in Tabelle 3-4 farbig markiert.

Tabelle 3-4. Indikatorkonzentrationen in den Kalibrierlösungen (Std., in Reinstwasser; Konzentration der internen Standards s. Tabelle 3-2); Standard 8 wurde erst ab 27.1.2015 in die Kalibrierreihe aufgenommen. grün: typischerweise in die tägliche Kalibrierung einbezogene Standards; orange: Standards deren Konzentration unterhalb des ermittelten LOQ (Vgl. Tabelle 3-3) lag, die aber trotzdem regelmäßig die Qualitätskriterien erfüllten und in der Kalibrierung berücksichtigt wurden

Std.	Konzentration ($\mu\text{g/L}$)						
	ACE	BTZ	CAF	CBZ	DCL	IBU	NPX
1	0,045	0,024	0,015	0,01	0,12	0,200	0,04
2	0,225	0,120	0,075	0,05	0,60	1,00	0,20
3	0,450	0,240	0,150	0,10	1,2	2,00	0,40
4	2,25	1,20	0,750	0,50	6,0	10,0	2,0
5	4,50	2,40	1,50	1,0	12	20,0	4,0
6	11,25	6,00	3,75	2,5	30	50,0	10
7	22,5	12,0	7,50	5,0	60	100	20
8	33,75	18,0	11,25	7,5	90	150	30

Mitunter erfüllten auch Konzentrationen unterhalb des zuvor ermittelten LOD oder LOQ die o. g. Qualitätskriterien und wurden zur Berechnung der Kalibrierfunktion mit herangezogen. Dies betraf alle Indikatoren außer ACE, da dessen niedrigste Konzentration in der Kalibrierreihe weit über dem ermittelten LOQ lag. Dies verdeutlichte, dass LOD und LOQ nach der S/N-Methode tatsächlich eher großzügig bemessen waren (siehe oben).

Trotz Verdünnung überstieg der Coffeingehalt von Zulaufproben oft den Kalibrierbereich. Die Gehalte wurden in diesen Fällen extrapoliert und sind deshalb mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Diesem Problem hätte mit einer weiteren Verdünnung der entsprechenden Probe und erneuter Analyse begegnet werden können. Da in Ablaufproben CAF allerdings fast nie detektiert wurde und folglich die Entfernung von CAF fast immer als (nahezu) quantitativ angesehen werden konnte, wurde auf eine erneute Analyse und Ermittlung des konkreten CAF-Gehalts im Zulauf verzichtet.

Präzision

Der Einfluss zufälliger Fehler auf die Analysenergebnisse eines Messverfahrens, also die Abweichung zwischen Ergebnissen von Wiederholungsmessungen, wird über die Präzision charakterisiert (Danzer 2007, Kellner *et al.* 2004). Sie wird durch Mehrfachmessungen identischer Proben bestimmt. Es wird unterschieden zwischen der Präzision innerhalb des gleichen Messtages (*engl. intraday precision*) und zwischen verschiedenen Messtagen (*engl. interday precision*).

Beide Maße sollten in der vorliegenden Arbeit für niedrige und hohe Konzentrationen der Indikatoren bestimmt werden. Theoretisch hätten hierfür ein (Pflanzen-) Kläranlagenzulauf (hohe Indikatorkonzentration) und ein Ablauf einer Anlage mit hoher Reinigungsleistung (niedrige Indikatorkonzentration) oder ein reiner und ein dotierter Ablauf verwendet werden können. Allerdings hätte es bei Verwendung von Realproben für Carbamazepin kein niedriges Konzentrationsniveau gegeben, da es aufgrund der hohen Persistenz im Kläranlagenzulauf in ähnlichen Konzentrationen vorkam wie im Ablauf. Daher wurden *inter-* und *intraday precision* nicht in Realprobe(n), sondern mithilfe gespikter Reinstwasserproben bestimmt. Durch das Vorliegen genau bekannter (Soll-) Konzentrationen der Indikatoren konnte zudem auch die Richtigkeit der ermittelten Konzentrationen bestimmt werden.

Es wurden zwei Kalibrierstandards niedriger und ein Standard hoher Konzentration herangezogen (Tabelle 3-5). Die Konzentrationen von BTZ und CAF im niedrig konzentrierten Standard lagen unterhalb des berechneten (strengen) LOQ, die Peaks erfüllten aber die Qualitätsanforderungen bzgl. der Auswertbarkeit und Quantifizierbarkeit (siehe oben). Die

intraday precision wurde aus drei Messungen am selben Tag, die *interday precision* aus den Tagesmitteln (Doppelbestimmungen) von vier Tagen berechnet. Die Mittelwerte sowie relativen Standardabweichungen (RSD, *engl. relative standard deviation*) der bestimmten Indikatorkonzentrationen sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5. Soll-Konzentration sowie Mittelwert (MW) und relative Standardabweichung (RSD) der ermittelten Indikatorkonzentrationen in Reinstwasser mit niedriger (niedrig) und höherer Indikatorkonzentration (hoch) zur Beschreibung der *intraday* und *interday precision*.

Analyt	Soll-Konzentration (µg/L)		<i>Intraday precision</i> (n = 3)				<i>Interday precision</i> (n = 4x2)			
	niedrig	hoch	Std. niedrig		Std. hoch		Std. niedrig		Std. hoch	
			MW (µg/L)	RSD (%)	MW (µg/L)	RSD (%)	MW (µg/L)	RSD (%)	MW (µg/L)	RSD (%)
Acesulfam ^a	0,45	11,25	0,485	0,72	11,3	1,0	0,417	7,8	11,0	6,3
Benzotriazol	0,24	6	0,199	2,8	6,12	2,7	0,229	6,9	5,99	1,0
Coffein	0,15	3,75	0,174	17	3,65	0,42	0,127	9,9	3,63	7,6
Carbamazepin	0,1	2,5	0,092	6,1	2,53	5,5	0,095	4,8	2,42	6,2
Diclofenac ^a	1,2	30	1,27	4,8	30,1	7,2	1,17	4,5	28,8	8,9
Ibuprofen	2	50	1,61	5,9	50,5	8,0	1,85	2,0	48,2	6,2
Naproxen	0,4	10	0,387	5,7	9,94	2,7	0,371	5,7	9,68	6,3

^a Konzentration der freien Säure

Die mittleren Konzentrationen in den mehrfach analysierten Proben wichen von den Soll-Indikatorkonzentrationen (Tabelle 3-5) betragsmäßig um maximal 20% ab (relative Differenz bezogen auf die Soll-Konzentration), wobei die größten Abweichungen bei den niedrigen Indikatorkonzentrationen auftraten. Für CAF, DCL, IBU und NPX entsprechen diese Konzentrationen ungefähr den in Voruntersuchungen detektierten Ablaufkonzentrationen der Pflanzenkläranlagen. Die Sollkonzentrationen im höheren Konzentrationsbereich kommen den Zulaufkonzentrationen von ACE, BTZ und CBZ sowie den Ablaufkonzentrationen einiger Anlagen nahe. Von den Sollgehalten wichen die ermittelten Konzentrationen um $\pm 5\%$ ab. In allen Mehrfachmessungen und bei beiden Konzentrationsniveaus betrug die relative Standardabweichung (RSD) der ermittelten Gehalte für die Indikatoren weniger als 10% (Tabelle 3-5). Einzige Ausnahme war CAF, dessen *intraday precision* bei niedriger Konzentration mit 17% RSD ermittelt wurde. CAF weist bereits in blank-Proben (Reinstwasser) ein im Vergleich zu den anderen Analyten starkes Signal auf, welches die o. g. Qualitätskriterien (z. B. $S/N \geq 5$) erfüllt und stets als Nullpunkt in die Kalibrierung einbezogen wurde. Bei geringen zugesetzten CAF-Gehalten erhöhte sich das Signal (Peakfläche) nur wenig, die relative Signalerhöhung war gering. Der durch zufällige (absolute) Fehler, z. B. messtechnische Schwankungen, verursachte relative Fehler (absoluter Fehler bezogen auf das Signal) ist bei kleinen Signalen größer als bei intensiven, sodass sich Ergebnisse aus Mehrfachmessungen prozentual stärker unterscheiden.

Um den Einfluss zufälliger Fehler auf das Messergebnis auch bei geringen Indikatorkonzentrationen etwas abzumildern, wurden Realproben stets doppelt analysiert und der Mittelwert der beiden erhaltenen Konzentrationen als Analysenergebnis festgehalten.

Basierend auf der ermittelten *intraday precision* und *interday precision* kann die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode als präzise angesehen werden. Die Werte stimmen mit der Präzision anderer HPLC-MS/MS-Methoden zur Analyse anthropogener organischer Spurenstoffe gut überein: Huntscha *et al.* (2012) und Pailler *et al.* (2009) berichteten für die Bestimmung von BTZ, CBZ, DCL und NPX bzw. IBU und DCL in Reinstwasser (mittels HPLC-MS/MS nach Festphasenextraktion) eine *intraday precision* von maximal 11% RSD. Die *interday precision* betrug 8 – 14% RSD (Grundwasser, Oberflächenwasser) bzw. 15 – 16% RSD (Reinstwasser).

Analytverluste bei der Probenvorbereitung (Filtration)

Um zu überprüfen, wie groß der Analytverlust durch die Filtration ist, wurde Reinstwasser mit den Indikatorsubstanzen sowie IS gespikt, filtriert (regenerierte Cellulose (RC), 0,45 µm Porengröße 15 mm Durchmesser) und analysiert. Das Probenvolumen entsprach dem üblicherweise zu filtrierenden Volumen der Realproben (1 mL), die Indikatorkonzentrationen lagen zwischen 0,5 µg/L und 10 µg/L bzw. zwischen 2,5 µg/L und 50 µg/L. Die IS wurden in ihrer Standardkonzentration (5 – 40 µg/L) zugegeben (Tabelle A-2).

In der Literatur werden bei der Bestimmung von Gehaltsunterschieden, z. B. durch Verluste via Sorption, in der Regel 20% Abweichung als signifikant betrachtet (Deo & Halden 2010, Hillebrand *et al.* 2013). In der vorliegenden Filtrationsstudie betrugen die Unterschiede der Peakflächen von Indikatoren bzw. IS zwischen filtrierter und unfiltrierter Probe stets weniger als 20%, größtenteils sogar weniger als 10% (Tabelle A-2). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Filtration kein (nennenswerter) Analytverlust auftritt. Die Ermittlung und Einbeziehung eines Korrekturfaktors für Verluste während der Probenvorbereitung im Sinne einer Wiederfindung zur Berechnung der tatsächlichen Analytkonzentration war nicht erforderlich.

Das Verhältnis der Peakflächen der Indikatoren und zugehörigen IS blieb dabei konstant. Dies ergänzt die Untersuchungen zur Methodenpräzision und verdeutlicht, dass die Signale von Indikator und IS, wie beabsichtigt, in gleicher Weise beeinflusst werden. Der IS als relative Bezugsgröße erlaubt die akkurate Quantifizierung des Indikators.

Matrixeffekte

Isotopologe verhalten sich (theoretisch) gleich, sodass Matrixeffekte in der MS deren Signale gleichermaßen beeinflussen müssten. Die Quantifizierung des Analyten über seinen

koeluvierenden, isotoopenmarkierten Standard (IS) sollte Matrixeffekte folglich kompensieren (Panuwet *et al.* 2016, Reemtsma 2003). Negative Effekte (Ionensuppression) können jedoch das Analytsignal soweit verringern, dass es nicht mehr erfassbar oder quantifizierbar ist. Da dies im niedrigen Konzentrationsbereich besonders kritisch ist, wirken sich solche Effekte negativ auf die Bestimmungsgrenzen der Methode aus. Im Zuge der Methodvalidierung müssen die gegebenenfalls auftretenden Matrixeffekte deshalb abgeschätzt und gegebenenfalls Maßnahmen zu deren Verminderung, bspw. durch Verdünnung der Probe (Panuwet *et al.* 2016), getroffen werden.

Matuszewski *et al.* (2003) empfehlen zur Quantifizierung von Matrixeffekten den Vergleich der Signale einer nach der Aufbereitung dotierten Probe und eines Referenzstandards, z. B. reine mobile Phase. Zunächst werden die jeweiligen Responsefaktoren ($RF = \frac{Signal}{Konzentration}$) berechnet. Die Matrixeffekte (ME) werden aus den ermittelten Responsefaktoren der beiden Probenarten berechnet ($ME(\%) = \left(1 - \frac{RF_{Probe}}{RF_{Referenzstandard}}\right) \times 100$) (Reemtsma *et al.* 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Matrixeffekte mithilfe der isotoopenmarkierten internen Standards ermittelt. Diese sind in den Realproben nicht enthalten, sodass Standard und Realprobe mit gleichen Konzentrationen der IS versetzt und direkt die Peakflächen im Chromatogramm verglichen werden konnten. Zur Ermittlung der Matrixeffekte wurden je fünf Proben des Ablaufs verschiedener Pflanzenkläranlagen (HAp, VAp, R, VSp, VGp, H50p; Vgl. Tabelle 3-1) sowie des gemeinsamen Zulaufs (SEP) mit den IS versetzt (Konzentration siehe Tabelle 3-2), anschließend filtriert und mittels HPLC-MS/MS doppelt analysiert. Als Vergleich wurden fünf jeweils dreifach analysierte Reinstwasserproben (Kalibrierstandards 2, 3, 5 – 7, s. Tabelle 3-4) herangezogen. Theoretisch würde durch Zugabe der IS vor Filtration die Summe aus Matrixeffekten und Analytverlusten erfasst. Da die Filtration keine Analytverluste verursachte (siehe oben), würden Unterschiede in der Signalintensität der IS jedoch ausschließlich durch Matrixeffekte verursacht.

Die mittlere Peakfläche (\bar{A}) jedes IS in den Realproben (\bar{A}_{Probe}) wurde auf jenes der Standards (\bar{A}_{Std}) bezogen und die Matrixeffekte (außer für DCL) nach Formel 3-7 berechnet. Aufgrund der Beeinflussung des Quantifier-Überganges von DCL-d₄ durch den Übergang von ³⁷Cl³⁷Cl-DCL (siehe oben) wurde zur Berechnung der Matrixeffekte für DCL-d₄ anders verfahren: Zunächst wurden die DCL-Gehalte in den Realproben auf Basis einer vier-Punkt-Kalibrierung quantifiziert (interne Kalibrierung, quadratische Funktion analog Abbildung 3-2c). Anschließend wurden die Peakflächen von DCL-d₄ in den Kalibrierstandards gegen deren DCL-Gehalt aufgetragen und eine Ausgleichsgerade ermittelt (Abbildung A-8). Die im ersten Schritt ermittelte DCL-

Konzentration der Realproben wurde in diese Ausgleichsfunktion eingesetzt, um einen Wert für die Peakfläche von DCL-d₄ zu erhalten, welche bei gegebenem DCL-Gehalt in Reinstwasser auftreten würde. Zuletzt wurden diese theoretischen Peakflächen (\bar{A}_{Soll}) sowie die tatsächlich bestimmten Peakflächen von DCL-d₄ in den Realproben (\bar{A}_{Ist}) ermittelt und die Matrixeffekte nach Formel 3-8 berechnet.

$$ME(\%) = \left(\frac{\bar{A}_{Std} - \bar{A}_{Probe}}{\bar{A}_{Std}} \right) \times 100 \quad \text{Formel 3-7}$$

$$ME_{DCL}(\%) = \left(\frac{\bar{A}_{Soll} - \bar{A}_{Ist}}{\bar{A}_{Soll}} \right) \times 100 \quad \text{Formel 3-8}$$

Positive Werte aus Formel 3-7 und 3-8 zeigen Effekte der Signalsuppression (negative Matrixeffekte), negative Werte signalverstärkende Effekte (positive Matrixeffekte) an. Um die durchschnittlichen Matrixeffekte der jeweiligen Probenart, z. B. Ablauf des Systems HAp, zu erhalten wurden die Matrixeffekte in den entsprechenden Einzelproben gemittelt (Tabelle 3-6).

Die mittleren Matrixeffekte für die verschiedenen Probenarten ließen anhand der Vorzeichen vermuten, dass eher signalverstärkende als –unterdrückende Effekte auftraten (Tabelle 3-6). Allerdings betrug die Unterschiede zwischen der Signalstärke in Realprobe und der Signalstärke im Standard betragsmäßig größtenteils weniger als 10%, womit davon ausgegangen werden kann, dass nur vernachlässigbar geringe Matrixeffekte auftreten. Einzig im Ablauf der Anlage H50p und dem Zulauf (SEP) war eindeutig eine Signalsuppression bei NPX-d₃ zu erkennen. Die Matrixeffekte wurden hier mit durchschnittlich 23% bzw. 34% berechnet (Tabelle 3-6). Diese beiden Matrizes enthielten offenbar höhere Gehalte von Störkomponenten mit der gleichen Retentionszeit wie NPX bzw. NPX-d₃. Dass allgemein vergleichsweise hohe Gehalte an Störkomponenten vorhanden sein würden, wurde erwartet: Der Zulauf war nur leicht vorbehandeltes Abwasser und somit die komplexeste der untersuchten Matrizes. Das System H50p erbrachte nur eine mäßige Aufreinigung des Abwassers (Nivala *et al.* 2013b), sodass hinsichtlich der Zusammensetzung eine große Ähnlichkeit zum Zulauf zu erwarten war.

Angesichts der Komplexität der Matrizes (Abwasser) war es überraschend und als sehr positiv zu beurteilen, dass nur für eines von sieben Parr Isotopologen (NPX, NPX-d₃) signalverändernde Effekte auftraten und dies auch nur in zwei von sieben untersuchten Probenarten. Durch die Verwendung einer Direktinjektion wurden mögliche Störkomponenten in den Proben nicht abgetrennt. Über die chromatografische Trennung wurden die Analyten jedoch scheinbar größtenteils von störenden Matrixkomponenten separiert. Wahrscheinlich koeluierten immer noch einige Matrixkomponenten mit den Analyten, doch scheinen diese keinen

signifikanten Einfluss auf die meisten Analytsignale verursacht zu haben. Zulaufproben von (Pflanzen-) Kläranlagen sowie vermutlich wenig gereinigtes Abwasser, wie der Ablauf des Systems H50p, wurden zur Verringerung der Matrixeffekte verdünnt. Dies hatte zudem den positiven Effekt, dass die in solchen Proben oft auftretenden, hohen Indikatorkonzentrationen an den linearen Bereich der Kalibriergeraden angepasst werden konnten.

Tabelle 3-6. In verschiedenen (Real-) Probenarten ermittelte Matrixeffekte (ME), basierend auf der Signalveränderung (Peakflächenunterschied) im Vergleich zu Reinstwasser.

Matrix	Matrixeffekte (%)						
	ACE-d ₄	BTZ-d ₄	CAF-d ₉	CBZ-d ₁₀	DCL-d ₄	IBU-d ₃	NPX-d ₃
<i>Pflanzenkläranlagenabläufe</i>							
HAp	0	-4	-3	-4	1	-4	7
VAp	-7	-11	-8	-13	-6	-10	3
R	-4	-5	-1	-4	0	-3	7
VSp	-2	-7	-3	-7	-2	-7	7
VGp	-6	-6	-3	-6	-3	-7	8
H50p	-6	-1	5	4	4	4	23
<i>Pflanzenkläranlagenzulauf</i>							
SEP	-7	3	9	10	6	4	34

Letztlich wurden weder durch Filtration nennenswerte Analytverluste verursacht noch in der MS starke Matrixeffekte beobachtet, auch da bspw. die Proben mit den größten beobachteten Matrixeffekten vor der Analyse mit Reinstwasser verdünnt wurden. Die Verwendung interner Standards und die interne Kalibration wären für die geplanten Untersuchungen also theoretisch nicht nötig gewesen; die Quantifizierung der Indikatoren hätte extern erfolgen können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Indikatoren trotzdem mittels der IS als interne Bezugsgröße quantifiziert. Dies sollte vor allem sicherstellen, dass, sollte eine längere Lagerung der Proben vor der Analyse notwendig werden (z. B. durch Gerätedefekte), gegebenenfalls auftretende Veränderungen der Analytkonzentration durch Sorptionseffekte oder (Bio-) Abbau kompensiert würden. Außerdem war zu Beginn der Arbeit nicht auszuschließen, dass auch komplexere Proben (z. B. unverdünnter Kläranlagenzulauf) mit geringen Indikatorgehalten zu analysieren wären, welche stärkere Matrixeffekte zeigen könnten als die während der Methodvalidierung untersuchten Proben. Da die Anzahl der Analyten und entsprechend der zu verwendenden IS streng limitiert war (je 7), war dieses Vorgehen trotz der hohen Probenzahlen wirtschaftlich vertretbar.

Anwendung

Die entwickelte HPLC-MS/MS-Analysenmethode wurde verwendet, um die Konzentrationen der Indikatoren in Zu- und Abläufen von Pflanzenkläranlagen und konventionellen Kläranlagen zu ermitteln und dadurch die Entfernungsleistung dieser Anlagen hinsichtlich der Indikatoren und

anthropogenen Spurenstoffe im Allgemeinen einzuschätzen. Die HPLC-Methode sowie die MS-Parameter zur Detektion von ACE wurden zudem in den Studien zum Bioabbau von ACE verwendet.

Die Methode erfasst die Zielmoleküle (Indikatoren) ausschließlich in ihrer Ausgangsform. Negative Befunde bzgl. des Vorhandenseins der Indikatorsubstanzen bedeuten nur, dass die Substanzen nicht in ihrer ursprünglichen Form detektierbar sind. Ob die Verbindung oder deren Transformationsprodukte noch im System, bspw. in Zellen der Biomasse, vorhanden sind oder über Mineralisationsprodukte vollständig entfernt werden, kann nicht differenziert werden.

3.1.3. Umgang mit linksseitig zensierten Daten

In den untersuchten Realproben wurden regelmäßig Analytkonzentrationen unterhalb des LOQ sowie unterhalb der üblicherweise noch detektierbaren Konzentration (unterhalb des LOQ, aber Qualitätskriterien, s. Absatz „Kalibrierbereich“ des vorhergehenden Kapitels, erfüllt) festgestellt. Der resultierende Datensatz ist „linksseitig zensiert“, da genaue Werte unterhalb eines bestimmten Grenzwertes nicht ermittelbar und somit unbekannt sind. Statistische Berechnungen sind mit Datensätzen, die neben konkreten Werten unbestimmte Werte enthalten, nicht möglich. Es existieren verschiedene Strategien, um Unbestimmten einen Wert zuzuweisen und den Datensatz statistisch auswerten zu können (Helsel 2010, Helsel 2006). Der einfachste Weg ist das Ausschließen der Datenpunkte, welche unterhalb des Grenzwertes liegen, z. B. alle Werte „< LOQ“. Speziell für Datensätze mit einem deutlichen Anteil von Werten „< LOQ“, z.B. in der vorliegenden Arbeit IBU- oder CAF-Gehalte in Ablaufproben, ist dies jedoch kritisch: Durch Nicht-Berücksichtigung geringer Konzentrationen unterhalb des Grenzwerts werden Lage- und Streumaße verzerrt und für den Datensatz nicht mehr repräsentativ. Die am häufigsten verwendete Strategie zum Umgang mit linksseitig zensierten Datensätzen ist das Ersetzen der Unbestimmten mit einem festgelegten Wert (Helsel 2010). Gängig sind die Substitution durch den Grenzwert, einen Bruchteil des Grenzwerts, z. B. die Hälfte, oder Null. Diese Methode ist schnell, kann jedoch eine Verteilung der Daten verursachen, die deutlich von der Verteilung der wahren Werte abweicht. Ergebnisse statistischer Tests könnten dadurch ungenau und gegebenenfalls nicht reproduzierbar (Helsel 2006) werden. Die wohl akkurateste und wenn möglich zu bevorzugende Art des Umgangs mit zensierten Daten ist das Abschätzen unbestimmter und fehlender Werte mittels statistischer Methoden und Modelle (Helsel 2010, Helsel 2006). Die betreffenden Werte können z.B. auf Basis einer angenommenen Verteilung der Daten modelliert werden. Allerdings muss die gewählte Methode auf den Rohdatensatz und den gewünschten Zweck (z.B. Mittelwertberechnung) abgestimmt sein. So sind z. B. einige Methoden nicht für Datensätze geeignet, die nur wenige detektierte Werte und/oder Ausreißer

enthalten (Helsel 2006). Beides kam in der vorliegenden Arbeit jedoch häufiger vor, sodass die Modellierung unbestimmter und fehlender Werte nicht bzw. nicht mit vertretbarem Zeitaufwand möglich war.

Aufgrund ihrer Einfachheit wurde daher die Methode der Substitution von Nicht-Detektierten (Indikatoren, klassische Abwasserparameter) angewendet. Ersetzt wurden nur die unbestimmten Werte, nicht die z. B. aufgrund nicht analysierter Probe fehlenden Werte. Als Substitutionswert wurde die Hälfte des LOQ der jeweiligen Methode gewählt. Um die eventuell auftretenden, negativen Einflüsse dieser Methode abzuschwächen, wurde wie folgt vorgegangen:

- (1) Sofern für die Indikatoren in der HPLC-MS/MS kein Signal (Peak) detektiert wurde, wurde die Konzentration des Indikators mit der Hälfte des LOD ersetzt. War ein Peak zu erkennen, konnte jedoch keine Konzentration berechnet werden (Software-Ausgabe: Konzentration „< 0“), wurde die Hälfte des LOQ als Konzentration eingesetzt. Die Verwendung von zwei statt eines Wertes bei der Substitution sollte die tatsächliche Verteilung der Daten besser abbilden und die Verzerrung der Datenbasis abmildern.
- (2) Aus in vorherigen Kapiteln erwähnten Gründen wurden zum Teil Indikatorkonzentrationen unterhalb des LOQ berechnet. Die Signale erfüllten dabei die gesetzten Qualitätsanforderungen, sodass die ermittelten Konzentrationen mit keiner erhöhten Unsicherheit behaftet sein sollten und unverändert in den Datensatz eingepflegt werden konnten.
- (3) In der HPLC-MS/MS wurden in Realproben mitunter auch Signale (Peaks) der Indikatoren berücksichtigt, die hinsichtlich ihres S/N die üblichen Kriterien für die Quantifizierung (siehe Abschnitt „Kalibrierbereich“) knapp nicht erfüllten. Die resultierenden Konzentrationswerte sind daher mit hoher Unsicherheit behaftet. Jedoch spiegeln sie die natürliche Verteilung der Daten wahrscheinlich besser wider als es substituierte, feste Konzentrationen würden. Dies sollte die von Helsel (2006) postulierte Unsicherheit dieser Parameter verringern.
- (4) Bei den konventionellen Abwasserparametern wurde stets die Hälfte des LOQ verwendet, da nur dieser Grenzwert vorlag. Da im Vergleich zu den Indikatoren deutlich weniger Werte Datenpunkte aufgrund des Unterschreitens eines Grenzwerts fehlten, war die Substitution mit nur einem Wert akzeptabel.
- (5) Wie bereits erwähnt wurden Werte, die aufgrund nicht vorhandener Proben oder nicht durchgeführter Analysen fehlten, nicht ersetzt. Außerdem wurden unplausible Analysenergebnisse, wie z. B. solche, die mehrere Größenordnungen über dem üblichen

Wertebereich lagen, eliminiert und nicht ersetzt. Dies waren die einzigen beiden Gründe für fehlende Datenpunkte.

Diese Maßnahmen sollten gewährleisten, dass jeder Datensatz nur wenige fehlende Werte aufweist, jedoch durch die eingesetzten Werte die Verteilung, Lage- und Streumaße nicht maßgeblich verändert würden.

3.2. Ergebnisse und Diskussion

3.2.1. Einfluss des Designs und der Betriebsbedingungen auf die Reinigungsleistung von Pflanzenkläranlagen (Zusammenfassung Publikation 1)

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift Water Research unter dem Titel "Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators" publiziert. Im Folgenden angegebene Abbildungen (Fig.) und Tabellen (Tab.) beziehen sich auf Darstellungen im Artikel.

Die Auswahl von sieben Indikatorsubstanzen ermöglichte das wöchentliche Monitoring mehrerer Pflanzenkläranlagen verschiedener Bauart bzgl. der Eliminationsleistung für anthropogene Spurenstoffe über einen kompletten Jahresverlauf. Alle Systeme wurden mit dem gleichen Zulauf (vorbehandeltes kommunales Abwasser) beschickt. Zwischen Juni 2014 und Mai 2015 wurde der Ablauf von drei Pflanzenkläranlagen klassischer und drei Anlagen intensivierter Bauart (Tab. 1) sowie der gemeinsame Zulauf wöchentlich beprobt (Stichproben, n = 40 – 42) und bzgl. klassischer Abwasserparameter sowie der Indikatoren analysiert. Entfernungsgrade wurden frachtbasiert berechnet und Einzelwerte mindestens vier aufeinanderfolgender Probenahmen zusammengefasst (warme und kalte Periode des Jahres, Gesamtjahresperformance).

Wie erwartet wurden Indikatoren von hoher Bioabbaubarkeit (unter aeroben Bedingungen) effektiver entfernt als solche von mäßiger bzw. geringer Abbaubarkeit: Das unter allen Redoxbedingungen gut eliminierbare CAF wurde in allen Systemen am besten eliminiert (Jahresmedian $\geq 93\%$). IBU und NPX (19 – 99%), BTZ (19 - 87%) und DCL (17 – 78%), welche eher unter aeroben Bedingungen, aber oft nur partiell abbaubar sind, wurden zu geringeren Anteilen, und das im Aeroben persistente CBZ gar nicht (-8 – 2%) entfernt (Tab. 3). Vergleichbare Effektivitätsabstufungen wurden auch in anderen Pflanzenkläranlagen (*mesocosm-scale* oder *full-scale*) beobachtet (Chen *et al.* 2016, Hijosa-Valsero *et al.* 2016, Li *et al.* 2014, Vymazal *et al.* 2017). Überraschend war die Entfernung von ACE in VGp + VSp, R,

VAp und HAp (49 – 78%), denn zum Zeitpunkt der Beprobung galt ACE in allen Redoxmilieus als persistent.

Generell waren die Pflanzenkläranlagen intensivierter Bauart (R, VAp, HAp) effektiver in der Entfernung der Indikatoren als die einstufigen Anlagen klassischer Bauweise (H50p, VGp). Besonders deutlich wurde dies bei Indikatoren für mäßige (aerobe) Bioabbaubarkeit. So entfernte z. B. das klassische System H50p BTZ im Jahresmedian zu 19%, das intensivierte, aktiv belüftete System HAp zu 87% (Tab. 3). Der nachgeschaltete Sandfilter des Systems VGp + VSp erhöhte die Reinigungsleistung deutlich, sodass sie mit der der aktiv belüfteten Systeme HAp und VAp vergleichbar ist. In VGp wurde bspw. BTZ zu 63%, in VGp + VSp sowie HAp zu 87% eliminiert. Auf Basis der Entfernung der Indikatoren und Nährstoffe (Tab. 3 und 4) ergaben sich drei Gruppen von Pflanzenkläranlagen mit untereinander ähnlicher Gesamtjahresperformance: Das klassische System H50p zeigte eine geringe Reinigungsleistung, VGp und R eine mäßige bis hohe Reinigungsperformance und die höchsten Eliminationen wurden in den aktiv belüfteten Systemen HAp und VAp sowie im zweistufigen System VGp + VSp beobachtet.

Über den Jahresverlauf traten bei jedem System große Schwankungen in der Ablaufqualität auf (illustriert durch Interquartilsabstände in Tab. 3 und 4). Diese ließen sich auf saisonale Unterschiede in der Effektivität der Elimination zurückführen: Die höchste Reinigungsleistung wurde generell während Juni und Juli 2014 („warme Saison“), die geringste während Februar und März 2015 („kalte Saison“) beobachtet. Maßgeblicher Einflussfaktor schien hierbei die (Wasser-) Temperatur zu sein: Alle Systeme zeigten die höchsten Ablauftemperaturen im Juli 2014 (Monatsmedian 19 – 22 °C) und die geringsten im Februar 2015 (Monatsmedian 6 °C).

Die Eliminationsleistung von H50p zeigte deutliche saisonale Variabilität. Das System erwies sich am wenigsten robust gegenüber den (klimatischen) Bedingungen der kalten Saison: Bereits die Entfernung des in allen Redoxmilieus leicht abbaubaren CAF sank von 99% in der warmen auf nur noch 63% in der kalten Saison. Die Elimination von IBU fiel sogar von 62% auf 9% (Fig. 1 und 3). In VAp, HAp sowie VGp + VSp blieb der Entfernungsgrad von IBU unverändert ($\geq 97\%$). Deutlich geringere Entfernungen während der kalten Saison wurden in diesen Systemen jedoch bei BTZ, DCL und ACE beobachtet, wobei die Saisonalität der ACE-Elimination am stärksten ausgeprägt war: Nahezu vollständige Elimination in der warmen Saison (Fig. 1), keine Entfernung in der kalten Saison (Fig. 3). Als genereller Trend war festzustellen, dass die Elimination in der kalten Saison umso höher und die saisonalen Unterschiede dadurch umso weniger ausgeprägt waren, je leichter bioabbaubar der Indikator (im Aeroben) und je komplexer das Design des Pflanzenkläranlagen war.

Während der warmen Periode wurde mäßige Elimination von CBZ (46%) ausschließlich in H50p registriert. Dies ließ vermuten, dass im Gesamtsystem H50p Sauerstoffmangel vorherrscht (Fig. 1), da CBZ nur über reduktive Wege biologisch abgebaut werden kann (Hai *et al.* 2011, Jekel *et al.* 2015, König *et al.* 2016). Bestätigt wurden die Sauerstoffmangelbedingungen durch stets negatives Redoxpotential (Jahresmedian -228 mV) und geringe Gehalte an gelöstem Sauerstoff (DO, *engl. dissolved oxygen*) im Ablauf von H50p sowie eine vollständige Denitrifikation (Jahresmedian $c_{\text{NO}_x\text{-N}} < 0,04$ mg/L) (Tab. 4). Dass jedoch auch das nur oxidativ gut biologisch abbaubare IBU in der warmen Periode zu 62% entfernt wurde (Fig. 1), deutet auf das Vorhandensein aerober (Mikro-) Zonen hin.

In VGp und R dominierten aerobe Bedingungen, angezeigt durch effektive Entfernung von CAF, IBU und NPX (Jahresmedian $\geq 84\%$), mäßige Entfernung von BTZ und DCL (Jahresmedian 34 - 63%) sowie durchgängige Persistenz von CBZ. Positive Redoxpotentiale, höherer DO als in H50p sowie ineffektive Denitrifikation (Jahresmedian $c_{\text{NO}_x\text{-N}} 20 - 32$ mg/L) bestätigten dies (Tab. 4). Die Performance von VGp und R war bis auf wenige Unterschiede vergleichbar. So zeigte R von allen Systemen die höchste Entfernung von Gesamtstickstoff (TN, *engl. total nitrogen*; Jahresmedian 57%), bedingt durch effektivere Denitrifikation. Zudem wurde ACE in R während der warmen Saison in R besser entfernt als in VGp (Mediane: 95% vs. 70%), obwohl vergleichbare Betriebsparameter, z. B. T, DO, E_H , gemessen wurden.

HAp, VAp, und VGp + VSp wiesen die effektivsten Indikatorentfernungen auf, was eine hohe Sauerstoffverfügbarkeit anzeigte und bestätigt wurde durch die höchsten gemessenen DO-Werte (Jahresmedian 8 – 10 mg/L) sowie $\text{NO}_x\text{-N}$ -Gehalte im Ablauf (Jahresmedian 40 – 51 mg/L) und entsprechend ineffektive Denitrifikation.

Diskussion

In der vorliegenden Publikation wurde die Entfernung von Prozessindikatoren aus kommunalem Abwasser durch Pflanzenkläranlagen verschiedener Bauart untersucht. Diese Indikatoren repräsentieren (anthropogene Spuren-) Stoffe gleichen Verhaltens (Jekel *et al.* 2015). Das Monitoring erfolgte über einen kompletten Jahresverlauf, um saisonale Schwankungen in Reinigungsleistung und Betriebsbedingungen abzubilden. Zusätzlich wurde nach Einflussfaktoren gesucht, die für die Entfernung dieser Substanzen vorteilhaft sind und auf welche die Performanceunterschiede zurückgeführt werden können.

Die Untersuchung des Verhaltens ausgewählter Indikatorsubstanzen in den verschiedenen Pflanzenkläranlagen sollte Rückschlüsse auf die Effektivität der Eliminierung anderer (repräsentierter) anthropogener Spurenstoffe verschiedener Bioabbaubarkeit erlauben.

Adsorptionsprozesse, welche in Pflanzenkläranlagen zur Elimination von anthropogenen Spurenstoffen beitragen können (Li *et al.* 2014), wurden explizit nicht berücksichtigt, da vorrangig die Entfernung mobiler (polarer) Substanzen untersucht werden sollte. Aufgrund ihrer weit verbreiteten Verwendung und somit Präsenz in kommunalem Abwasser wurden viele der als Indikatoren verwendeten Verbindungen bereits in früheren Studien zur Einschätzung der Reinigungsleistung von Pflanzenkläranlagen analysiert. DCL, IBU, NPX und CAF gehören bspw. zu den am häufigsten analysierten Pharmaka (Li *et al.* 2014). Auch die CBZ-Entfernung von Pflanzenkläranlagen wurde in zahlreichen Studien untersucht (Auvinen *et al.* 2017, Ávila *et al.* 2017, Chen *et al.* 2016, Hijosa-Valsero *et al.* 2016). Diese Substanzen fanden allerdings nicht als Vertreter für Gruppen von Substanzen (Indikatoren) Verwendung.

In jeder der sechs untersuchten Pflanzenkläranlagen wurde ganzjährig wenigstens CAF zu mehr als 50% (Monatsmedian) entfernt (Tab. 3). In jedem System und zu jeder Jahreszeit fand also eine Reduzierung der Fracht anthropogener Spurenstoffe, welche unter allen Redoxbedingungen leicht bioabbaubar sind, statt. Die Elimination weniger leicht bioabbaubarer Substanzen war je nach Systemtyp unterschiedlich effektiv: Die Anzahl eliminiertes Indikatoren und damit oxidativ entfernbare anthropogener Spurenstoffe sowie der Grad der Entfernung stiegen mit zunehmender Intensivierung der Systeme. Ziel der Intensivierung von Pflanzenkläranlagen ist die Erhöhung der Sauerstoffverfügbarkeit im System zur Verbesserung der Nährstoffentfernung (NH₄-N, TOC) (Kadlec & Wallace 2009, Nivala *et al.* 2013b). Diese erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit erwies sich folgerichtig auch als vorteilhaft für die Elimination von oxidativ abbaubaren anthropogenen Spurenstoffen (Indikatoren) und wurde bereits in einer früheren Kurzzeitstudie auf der Pilotanlage, in welcher verschiedene Systeme mit vertikalem Fluss verglichen wurden, beobachtet (Ávila *et al.* 2014). Allerdings verhinderte die erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit die Elimination reduktiv entfernbare Komponenten, wie bspw. CBZ oder Nitrat. Trotz der zum Teil gravierenden Unterschiede in der Reinigungsleistung kann keines der untersuchten Systeme allgemeingültig als das beste zur Elimination anthropogener Spurenstoffe angesehen werden; die Eignung hängt stark von Einsatzort und -zweck sowie den Voraussetzungen und Zielvorgaben ab. Beispielsweise wurde der gesteigerte Sauerstoffeintrag und die resultierende verbesserte Reinigungsleistung für aerob eliminierbare Verbindungen auf Kosten erhöhten Flächenbedarfs (VGp + VSp) oder höherer Betriebskosten und größeren Wartungsaufwands (R, VAp, HAp) erzielt. Andererseits werden aufgrund der erhöhten Sauerstoffverfügbarkeit Stoffe, die über reduktive Abbauege eliminiert werden (z. B. NO₃⁻, CBZ), nur unzureichend bis gar nicht entfernt. Auch erzielte das klassische Design VGp zwar eine ähnliche Ablaufqualität wie das intensivierte System R, letzteres erfuhr jedoch eine deutlich höhere flächenbezogene Beladungsrate (160 L/m²d) als VGp (95 L/m²d) (Nivala *et al.* 2013a),

sodass es im gleichen Zeitintervall höhere Mengen an Abwasserinhaltsstoffen entfernte als VGp. Zugleich zeigte R von allen Systemen die geringsten Ablaufgehalte von Nitrat, was auf effektivere Denitrifikation schließen lässt. Während der Standzeiten des Abwassers in der ersten der beiden Kammern von R (Vgl. Abbildung A-4) können anoxische Zonen durch Oxidation von kohlenstoffhaltigen Verbindungen und Ammonium entstehen. Gleichzeitig sind offenbar durch die Anteile frischen, kohlenstoffreichen Zulaufs in dieser ersten Kammer noch ausreichend Kohlenstoffquellen für die Denitrifikation des nitrathaltigen, aus der zweiten Kammer rezirkulierten Abwassers vorhanden.

In gemäßigten Klimazonen sind saisonale Unterschiede in den Betriebsbedingungen, z. B. der Wassertemperatur, sowie der Reinigungsleistung von Pflanzenkläranlagen weithin bekannt (Kadlec & Reddy 2001, Kadlec & Wallace 2009). Die Reinigungsleistung ist in der Regel in den Sommermonaten besser als in Wintermonaten, was auf erhöhte biologische Aktivität vor allem durch höhere Wassertemperaturen zurückgeführt wird (Hijosa-Valsero *et al.* 2010b, Kadlec & Reddy 2001, Zhang *et al.* 2017b). Auch in der vorliegenden Arbeit verhielt sich die Reinigungsleistung aller Pflanzenkläranlagen proportional zur Wassertemperatur. Maximale Werte wurden im Juni und Juli 2014 beobachtet und die Periode mit niedrigsten Wassertemperaturen stimmte mit der Periode der niedrigsten Reinigungsleistung (Februar, März 2015) überein. Dass die Periode niedrigster Temperatur und Effizienz am Ende oder komplett außerhalb des meteorologischen Winters (Dezember – Februar) lag, deutet darauf hin, dass durch exemplarische Beprobung in meteorologischen Sommer- und Wintermonaten die eigentlichen Extremwerte der Performance (Maximum, Minimum) nicht erfasst worden wären. Hierfür sowie zur Erfassung der Robustheit (saisonbedingte Schwankungen) der Entfernungsprozesse war die regelmäßige Beprobung über das gesamte Jahr besser geeignet.

Der positive Einfluss von aeroben Redoxbedingungen sowie erhöhter Temperatur auf die Entfernung von anthropogenen Spurenstoffen wurde bereits in systematischen Laboruntersuchungen (Burke *et al.* 2014, Burke *et al.* 2017) sowie Studien an Pflanzenkläranlagen (Li *et al.* 2014, Verlicchi & Zambello 2014) beobachtet. In der vorliegenden Arbeit zeigten interne Beprobungen von HAp, dass auch der Hintergrundgehalt an Kohlenstoff relevant sein kann. Zum Beispiel setzte die Elimination von DCL und ACE erst in Zonen ein, in denen der leicht abbaubare Kohlenstoff, repräsentiert durch CBOD₅, nahezu vollständig entfernt war (Fig. 4). Dies indiziert einen metabolischen und spricht gegen einen kometabolischen Abbauweg dieser Substanzen: Unter kohlenstoffarmen Bedingungen müssen von der mikrobiellen Gemeinschaft zum Erhalt der Vitalfunktionen Substrate verwendet werden, die nicht leicht abbaubar und/oder gering konzentriert sind. Eine verbesserte Elimination von

anthropogenen Spurenstoffen unter aeroben, oligotrophen Bedingungen, wurde auch in Studien zur Entfernung während der Infiltration (Säulenversuche) berichtet (Hoppe-Jones *et al.* 2012, Rauch-Williams *et al.* 2010). Voraussetzung hierbei war das Vorhandensein einer bereits adaptierten mikrobiellen Gemeinschaft. Durch die lange Laufzeit der untersuchten Systeme sollten sich in jeder Anlage bzw. jeder Zone der Anlage an die jeweiligen Bedingungen angepasste mikrobielle Gemeinschaften etabliert haben. Dass in R trotz vergleichbarem Redoxstatus (des Ablaufs) und fast identischer CBOD₅- sowie TOC-Entfernung wie in VGp DCL und ACE wesentlich effektiver entfernt wurden, überraschte zunächst. Denkbar wäre, dass in VGp eine Zone aerober, oligotropher Bedingungen am Ende der Fließstrecke nicht ausgeprägt genug war und zur effektiven Entfernung eine größere Reaktorlänge erforderlich gewesen wäre. In R könnten sich hingegen ausreichend große oligotrophe Zonen, speziell in der zweiten Kammer des Systems, ausgebildet haben: Die erste Kammer wird mit frischem Zulauf und rezirkuliertem Ablauf der zweiten Kammer komplett befüllt. Nach einer gewissen Standzeit wird etwa die Hälfte dieses (teil-) behandelten Abwassers in die zweite Kammer gepumpt, welche zuvor zur Hälfte ungesättigt war. Das der zweiten Kammer zufließende Wasser ist somit nährstoffärmer als das Abwasser in der ersten Kammer und durch den Pumpvorgang erneut mit Sauerstoff angereichert. Nach der Standzeit wird etwa die Hälfte des nun weiter gereinigten Abwassers in die erste Kammer rezirkuliert. Im in der zweiten Kammer verbleibenden Wasser werden gleichzeitig weiter Nährstoffe inkl. Kohlenstoff aufgebraucht, sodass dort oligotrophe, aerobe Bedingungen vorherrschen könnten und die verbesserte Elimination von DCL und ACE erklären würden.

Zusammengefasst waren die Indikator-Daten eine gute Ergänzung zu konventionellen Abwasserparametern, z. B. um Prozesse sowie Bedingungen innerhalb der Systeme besser anzuzeigen, auch wenn nur der Ablauf beprobt wird. Bspw. ließen die hohe Entfernung von Kohlenstoff (TOC, CBOD₅) sowie mäßige Elimination von Ammonium in H50p während der warmen Saison bereits vermuten, dass aerobe (Mikro-) Zonen vorhanden sein müssten, obwohl Messwerte von Redoxpotential und DO im Ablauf sehr gering waren. Durch die beobachtete, mäßige Entfernung von IBU ließ sich der Verdacht auf aerobe (Mikro-) Zonen schließlich erhärten. Höchstwahrscheinlich bildeten sich diese Zonen um die Wurzeln, da diese zu einem gewissen Maß Sauerstoff freisetzen können (Kadlec & Wallace 2009). Außerdem könnte der Grad der Entfernung von ACE bzw. DCL anzeigen, ob in einem System ausreichend breite Zonen aerober, oligotropher Bedingungen vorliegen. Wie am Beispiel von R und VGp oben diskutiert, zeigen klassische Abwasserparameter (DO, E_H, CBOD₅, TOC) dies in Ablaufproben nur bedingt an.

3.2.2. Untersuchungen zur Anlaufphase modifizierter belüfteter Anlagen

Die aktiv belüftete Pflanzenkläranlage HAp erwies sich in Teilstudie 1 (Publikation 1, s. Kapitel 3.2.1 und 6.1) als eines der Systeme mit der höchsten Reinigungsleistung für klassische Abwasserinhaltsstoffe, ebenfalls beobachtet von Nivala *et al.* (2013b), als auch anthropogene Spurenstoffe. Durch die hohe Sauerstoffverfügbarkeit war jedoch keine effektive Denitrifikation und somit TN-Entfernung möglich. Daher wurden von Ingenieuren des Departments Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ) zwei baugleiche Systeme mit horizontalem Fluss und mehreren einzeln zu- oder abschaltbaren Belüftungsleitungen konstruiert. Dadurch sollten Zonen aerober, anoxischer oder anaerober Bedingungen einstellbar sein. Diese Systeme wurden auf der Pilotanlage Langenreichenbach installiert und im September 2014 in Betrieb genommen (Tabelle 3-1, Kapitel 3.1.1). Ein System wurde vollständig belüftet und diente als Referenz (HM_c). Das andere wurde zwischen 40% und 70% der Länge nicht belüftet (HM). Hierdurch sollte eine Zone mit Sauerstoffmangel, aber noch vorhandenem abbaubarem Kohlenstoff etabliert werden, sodass die Denitrifikation ermöglicht wird.

Vergleich der Reinigungsleistung von HM, HM_c, HAp im Jahresmittel

Beim Vergleich der Ablaufqualität des bereits etablierten HAp und der neu in Betrieb genommenen Systeme HM und HM_c ist zu beachten, dass die drei Systeme zwar die gleichen Abmessungen hatten, HAp jedoch eine höhere Beladung mit Abwasser (770 L/d) erhielt als HM und HM_c (je 576 L/d). Im stabilen Zustand könnten HM_c und HM aufgrund der daraus resultierenden höheren HRT theoretisch etwas bessere Reinigungsleistungen zeigen als HAp.

Hinsichtlich der klassischen Abwasserparameter waren sich die Abläufe der neuen Systeme HM sowie HM_c und des etablierten Systems HAp im Jahresmittel sehr ähnlich (September 2014 bis August 2015, Tabelle 3-7). Die zumindest nahe des Ablaufs vorherrschenden oxidativen Bedingungen (10 mg/L DO, $E_H > 170$ mV) ermöglichten die effektive Entfernung von > 90% Ammonium und organischen Kohlenstoffverbindungen (TOC, CBOD₅). Die Entfernung von TN war in HM und HM_c vergleichbar (56 – 59%) und etwas höher als HAp (43%). Dies und die geringeren Gehalte von Nitrat im Ablauf von HM und HM_c (35 – 38 mg/L vs. 51 mg/L) könnten durch intensiveres Wachstum der noch jungen mikrobiellen Gemeinschaften sowie Pflanzen und entsprechend erhöhte Assimilation von Ammonium bzw. Nitrat im Vergleich zum etablierten HAp bedingt sein. Dass HM und HM_c jedoch eine ähnliche mittlere TN-Entfernung und Nitratkonzentration im Ablauf aufwiesen, deutete an, dass die zonierte Belüftung in HM keine Vorteile hinsichtlich der Denitrifikation im Vergleich zur kompletten Belüftung in HM_c erbrachte.

Tabelle 3-7. Jahresmedian (September 2014 – August 2015) konventioneller Wasserqualitätsparameter und Indikatorkonzentrationen im gemeinsamen Zulauf und dem Ablauf von HM, HMc und HAp. Daneben sind Interquartilsabstände in Klammern und für die Anlagen auch Entfernungen kursiv dargestellt.

	Zulauf ^a		HM ^b			HMc ^c			HAp ^d		
Zufluss (L/d)	-		578	(1)		578	(1)		770	(1)	
Abfluss (L/d)	-		561	(15)		559	(33)		742	(52)	
T (°C)	13,5	(7,8)	11,7	(9,4)		11,9	(9,4)		12,6	(8,8)	
pH	7,1	(0,2)	7,8	(0,4)		7,8	(0,5)		7,1	(1,2)	
EC (µS/cm)	1828	(241)	1349	(130)		1369	(124)		1365	(161)	
DO (mg/L)	0,8	(0,4)	10	(3)		10	(3)		10	(2)	
E _H (mV)	-267	(38)	171	(34)		184	(67)		205	(73)	
CBOD ₅ (mg/L)	299	(45)	0,2	(0,7)	100%	0,2	(0,5)	100%	0,6	(1,0)	100%
TOC (mg/L)	140	(32)	10	(2)	93%	10	(2)	93%	15	(4)	90%
TN (mg/L)	90	(10)	38	(9)	59%	41	(12)	56%	53	(13)	43%
NH ₄ -N (mg/L)	77	(11)	0,03	(0,06)	100%	0,02	(0,03)	100%	0,03	(0,07)	100%
NO _x -N (mg/L)	0,04	(0)	35	(9)		38	(11)		51	(13)	
CAF (µg/L)	68	(67)	0,3	(0,2)	100%	0,2	(0,1)	100%	0,2	(0,1)	100%
IBU (µg/L)	24	(6)	0,4	(0,0)	98%	0,4	(0,0)	98%	0,3	(0,3)	99%
NPX (µg/L)	3	(2)	0,09	(0,12)	98%	0,06	(0,10)	98%	0,05	(0,05)	99%
BTZ (µg/L)	14	(5)	7	(2)	53%	7	(2)	51%	2,1	(1,8)	86%
DCL (µg/L)	6	(1)	4	(2)	32%	4	(2)	32%	1,6	(1,6)	73%
ACE (µg/L)	19	(6)	17	(5)	11%	17	(5)	11%	5	(14)	74%
CBZ (µg/L)	2,8	(1,1)	2,8	(1,2)	2%	2,7	(1,2)	7%	3,1	(1,4)	-7%

^a n = 43 (T), 44 (pH, EC, DO, E_H, CBOD₅, TOC, TN, NH₄-N, NO_x-N), 45 (Indikatoren)

^b n = 43 (TN), 44 (T, pH, EC, DO, E_H, CBOD₅, TOC, NH₄-N, NO_x-N, CAF), 45 (IBU, NPX, BTZ, DCL, ACE, CBZ), 294 (Zu- und Abfluss)

^c n = 43 (TN), 44 (T, pH, EC, DO, E_H, CBOD₅, TOC, NH₄-N, NO_x-N, CAF), 45 (IBU, NPX, BTZ, DCL, ACE, CBZ), 292 (Zu- und Abfluss)

^d n = 40 (Indikatoren), 43 (pH, TN), 44 (T, EC, DO, E_H, CBOD₅, TOC, NH₄-N, NO_x-N), 281 (Zu- und Abfluss)

CBZ wurde in keinem der belüfteten Systeme entfernt, was aufgrund der nur mäßigen Bioabbaubarkeit einzig unter anaeroben Bedingungen (Jekel *et al.* 2015, König *et al.* 2016) zu erwarten war. Dieses Ergebnis deutet im Fall von HM an, dass keine (ausreichend breite) Zone anaerober Bedingungen vorhanden war. Dies ist als positiv zu verzeichnen, da in HM nur aerobe und anoxische Bedingungen koexistieren sollten.

Die unter aeroben Bedingungen leicht bioabbaubaren Indikatoren CAF, IBU und NPX wurden in allen drei Anlagen zu mehr als 98% eliminiert. Im Gegensatz dazu wurden die Indikatoren mit mäßiger (aerober) Bioabbaubarkeit im etablierten HAp effektiver entfernt als in den frisch in Betrieb genommenen Systemen HM und HMc: BTZ und DCL sowie ACE wurden in HAp im Jahresmittel zu 73 – 86%, in HM und HMc nur zu 11 – 51% eliminiert. Die Ablaufwerte aller drei Systeme legten nahe, dass die in Publikation 1 identifizierten Bedingungen zur effektiven

Entfernung der oxidativ abbaubaren Indikatoren (aerobes Milieu, mäßige Wassertemperaturen und z. T. limitierte Kohlenstoff-Verfügbarkeit; s. Kapitel 3.2.1 und 6.1) erfüllt waren. Der Unterschied in der Reinigungsleistung von HAp, HM und HMc lag daher wahrscheinlich in abweichender Zusammensetzung bzw. Effektivität der mikrobiellen Gemeinschaften begründet. Würde sich in zukünftigen Studien die Reinigungsleistung von HM oder HMc hinsichtlich der mäßig abbaubaren Indikatoren verbessern, wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass die erforderliche mikrobielle Gemeinschaft nach dem ersten Jahr Laufzeit tatsächlich noch nicht (ausreichend) etabliert war

Verlauf und Entwicklung der Reinigungsleistungen

Mithilfe der monatlichen Wasserqualitätsdaten (Tabelle A-3) kann abgeschätzt werden, wie sich die Reinigungsleistung der Anlagen entwickelt und die mikrobiellen Gemeinschaften etabliert haben, die in HAp für gute Eliminationen sorgten. Die Entfernung klassischer Abwasserinhaltsstoffe wie NH_4^+ und organischer Kohlenstoffverbindungen (TOC, CBOD_5) war in HM und HMc sehr ähnlich und sofort nach Betriebsaufnahme effektiv (Monatsmedian > 91%, Abbildung 3-4). Außerdem war sie mit der Entfernung im etablierten System HAp (> 87%) vergleichbar und genügte den Anforderungen an behandeltes Abwasser nach Anhang 1 der Abwasserverordnung (AbwV 1997). Die Elimination leicht bioabbaubarer Spurenstoffe (CAF, IBU, NPX) war ebenfalls direkt nach Inbetriebnahme von HM und HMc effektiv (>93%) und mit HAp vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurden BTZ, DCL und ACE in HM und HMc zu Beginn der Studie schlechter eliminiert als in HAp (Abbildung 3-5): Zwischen September und Dezember 2014 entfernten HM und HMc 51 – 67% BTZ, 24 – 37% DCL und < 10% ACE, während in HAp im gleichen Zeitraum > 85% BTZ, > 76% DCL und > 78% ACE eliminiert wurden. Erst während der letzten zwei Monate der Studie (Juli, August 2015) glichen sich die Reinigungsleistungen von HM und HMc bzgl. der mäßig bioabbaubaren Indikatoren der Performance von HAp an.

Dass die Elimination von Indikatoren geringerer Bioabbaubarkeit in HM und HMc anfangs geringer war als in HAp, obwohl im Ablauf aller drei Systeme die kritischen Parameter Kohlenstoff- und Sauerstoffgehalt sowie Temperatur vergleichbar waren (Tabelle A-3), könnte auf (das Zusammenspiel von) mehrere Ursachen zurückzuführen sein: Einen Mangel geeigneter mikrobieller Gemeinschaften zum Abbau sowie ausreichend breiter Zonen geeigneter Bedingungen für diese Gemeinschaften. Direkt nach Inbetriebnahme von HM und HMc dürfte nur eine vergleichsweise geringe Anzahl Mikroorganismen, eingetragen durch das zufließende Abwasser, angesiedelt gewesen sein. Höchstwahrscheinlich war zunächst auch im gesamten System eine einheitlich mikrobielle Gemeinschaft vorhanden. Mit fortschreitender Laufzeit der Anlagen nimmt die Biomasse zu, wodurch sich die Umsatzraten für kohlenstoffhaltige

Verbindungen erhöhen. Durch diesen steigenden Umsatz kann innerhalb des Systems immer näher in Richtung des Zulaufs Kohlenstoffmangel auftreten, sodass mehr bzw. früher organische Spurenstoffe als Substrate für die Mikroorganismen dienen können. Die Zone aerober, oligotropher Bedingungen, in denen Spurenstoffe wie DCL oder ACE als Kohlenstoffquelle verwendet werden müssen, würde sich verbreitern. Entsprechend wird der Anteil von Mikroorganismen, welche diese Bedingungen tolerieren und die Umsatzraten für Substanzen mäßiger aerober Bioabbaubarkeit erhöht. Die mikrobielle Gemeinschaft differenziert sich für jede Zone unterschiedlicher Bedingungen im System verschieden aus.

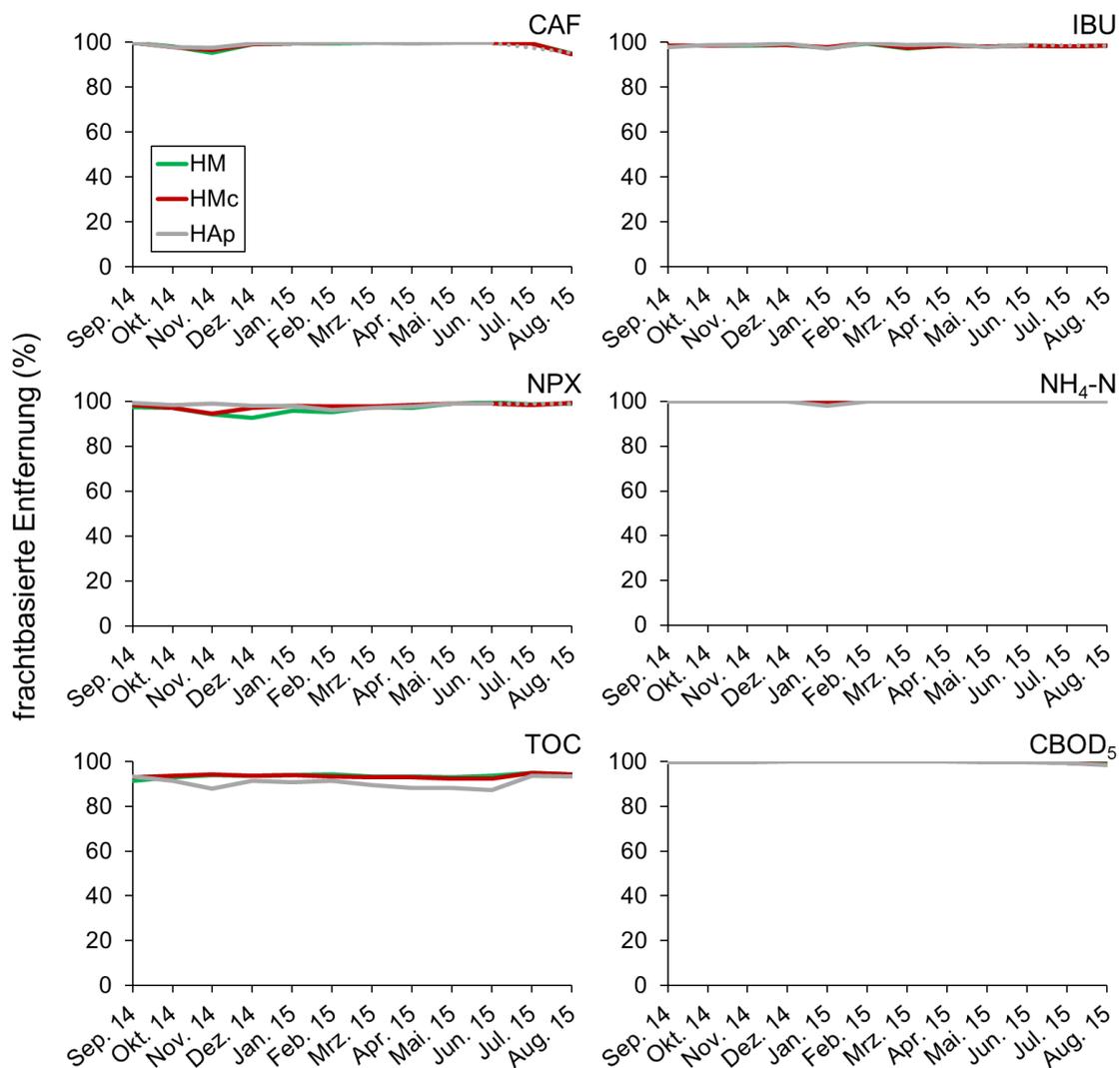


Abbildung 3-4. Monatliche frachtbasierte Entfernung (% , Median) der leicht bioabbaubaren Spurenstoffe Coffein (CAF), Ibuprofen (IBU) und Naproxen (NPX) sowie von Ammoniumstickstoff (NH₄-N) , Gesamtkohlenstoffgehalt (TOC) und des biochemischen Sauerstoffbedarfs (CBOD₅) in den neu in Betrieb genommenen Systemen HM und HMc sowie im etablierten System HAp zwischen September 2014 und August 2015. Für HAp liegen im Juli 2015 keine Indikatorndaten vor.

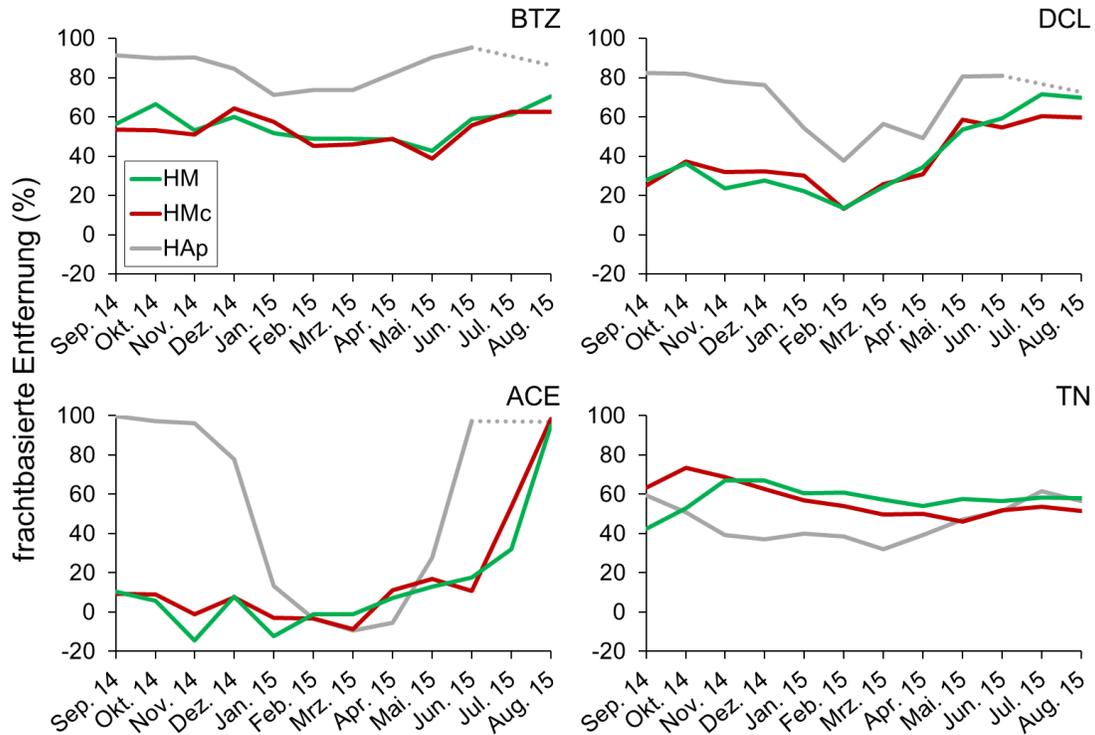


Abbildung 3-5. Monatliche frachtbasierte Entfernung (% Median) der moderat bioabbaubaren Spurenstoffe Benzotriazol (BTZ), Diclofenac (DCL) und Acesulfam (ACE) sowie des Gesamtstickstoffgehalts (TN) in den neu in Betrieb genommenen Systemen HM und HMc sowie im etablierten System HAp zwischen September 2014 und August 2015. Für HAp liegen im Juli 2015 keine Indikatordaten vor.

Weitere mögliche Gründe für die anfänglich schlechtere Performance von HM und HMc bzgl. der Indikatoren mäßiger Bioabbaubarkeit könnten sein

- eine langsame Etablierung der zum Abbau befähigten mikrobiellen Gemeinschaft durch eine geringe initiale Zelldichte im System und im zufließenden Abwasser sowie
- die Inbetriebnahme von HM und HMc im Herbst, wodurch die zum Bioabbau der Substanzen vorteilhafteren Umgebungsbedingungen bereits nach 2 – 3 Monaten von für das mikrobielle Wachstum und die Aktivität eher suboptimalen Bedingungen der Winterperiode abgelöst wurden.

Die Untersuchung, ob oder welche dieser möglichen Ursachen zuträfen, wurden nicht durchgeführt. Zur Aufklärung der Ursache für die Verzögerung der Anlaufphase wäre ein hoher experimenteller Aufwand nötig gewesen. Diese Aufklärung lag nicht im Fokus der Studie, sodass dieser Aufwand nicht gerechtfertigt war.

Die Reinigungsleistung der neu in Betrieb genommenen Systeme HM und HMc für die aerob leicht bioabbaubaren Abwasserinhaltsstoffe, repräsentiert durch bspw. TOC, Ammonium, CAF und IBU, war bereits nach 1 – 2 Monaten mit der Performance des etablierten Systems HAp

vergleichbar. Für diese Substanzen scheinen in der Literatur verwendete Einlaufzeiten zur Akklimatisierung neuer Systeme (Pilot-Maßstab) von ein bis zwei, teils bis zu sechs Monaten (A *et al.* 2013, Auvinen *et al.* 2017, Lv *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2017b) zum Erreichen der maximalen Performance demnach ausreichend. Genaue Daten zur Entwicklung der Entfernung anthropogener Spurenstoffe während dieser Anlaufzeiten liegen jedoch keine Daten vor, ein direkter Vergleich ist daher nicht möglich. Die Entfernung von Substanzen, für deren Bioabbau spezielle Mikroorganismen und/oder Bedingungen benötigt werden, wie z. B. DCL und ACE, wäre nach dieser Zeit jedoch wahrscheinlich noch nicht optimal. In HM und HMc waren zum Angleichen der Reinigungsleistung für diese Substanzen an die Performance von HAp 11 – 12 Monate nötig. Es ist denkbar, dass sich diese Einlaufzeit hätte verkürzen lassen, indem HM und HMc zu Beginn der warmen Jahreszeit in Betrieb genommen worden wären. Auf diese Weise hätten von Beginn an und für eine längere Zeit die in dieser Saison vorherrschenden, vorteilhafteren Bedingungen vorgeherrscht und das mikrobielle Wachstum wäre vermutlich angeregt worden. Die vergleichbare Reinigungsleistung von HM, HMc und HAp bzgl. der Indikatoren am Ende der Studie deutet an, dass die geringere Beladung von HM und HMc sowie die nur zonierte Belüftung von HM keine Vorteile für die Elimination anthropogener Spurenstoffe bringt. Allerdings hätte HM den Vorteil geringerer Energiekosten gegenüber HMc und HAp, da es nur zum Teil belüftet wird.

Stickstoffelimination in HM

In der TN-Elimination wurden mehrere Unterschiede zwischen HM und HMc sowie HAp beobachtet (Abbildung 3-5, Tabelle A-3). Am auffälligsten war, dass zu Beginn der Untersuchungen die TN-Entfernung im komplett belüfteten HMc effizienter war als im zoniert belüfteten HM (64% vs. 43% Entfernung, Monatsmedian September 2014). Bis Dezember 2014 stieg die TN-Entfernung in beiden Anlagen auf 63 – 67% und ab Dezember 2014 wies das zoniert belüftete HM immer leicht höhere TN-Eliminationseffizienz auf als HMc. Es wurden nur geringfügige Änderungen der Eliminationseffizienz nach Dezember 2014 festgestellt. Im Gegensatz dazu wies HAp merkliche Saisonalität in der TN-Entfernung auf: Zwischen November 2014 und April 2015 wurden 32 – 51% TN eliminiert, im September 2014 sowie Juli und August 2015 hingegen 56 – 62%.

Weniger effiziente Denitrifikation in Pflanzenkläranlagen während der kalten Saison ist bekannt (Kadlec & Wallace 2009) und wird auf geringere mikrobiologische Aktivität (Assimilation, Denitrifikation) zurückgeführt. Außerdem kann die Assimilation von Nitrat durch Pflanzen (Kadlec & Wallace 2009) nur während der Wachstumsphase zur Reduzierung der Nitratfracht beitragen. Entsprechend war es überraschend, dass TN in HM und HMc während der gesamten

Studie mit nahezu gleichbleibender Effektivität entfernt wurde. Saisonalität wurde nicht beobachtet.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass in HM und HMc während der ersten Monate des Betriebs vergleichsweise hohes Wachstum der Mikroorganismen auftrat (Neubesiedlung) und dadurch viel Nitrat aufgenommen wurde. Die Assimilation von Nitrat, klassischerweise autotrophen Bakterien zugeordnet, wurde in den letzten Jahren zunehmend auch bei heterotrophen Arten nachgewiesen (Moir 2011). Wäre erhöhte Nitratassimilation die Ursache für das Ausbleiben eines saisonalen Trends in der TN-Entfernung von HM und HMc, sollte dies in nachfolgenden Jahren jedoch nicht mehr auftreten. Nach einem Jahr Betrieb wurden in HM und HMc vergleichbare Reinigungsleistungen wie im etablierten System HAp beobachtet; dies lässt vermuten, dass die mikrobielle Gemeinschaft nach dieser Zeit etabliert war und eine stabile Biomasse vorlag.

Wie oben erwähnt, wurde während des beobachteten Zeitraumes die TN-Entfernung (Denitrifikation) in einer belüfteten Pflanzenkläranlage durch Zwischenschalten einer Zone ohne Belüftung (HM) nicht erhöht. Möglicherweise war in der unbelüfteten Zone von HM immer noch etwas Restsauerstoff vorhanden bzw. der Sauerstoffmangel-Bereich war zu klein. Es wäre auch denkbar, dass in der ersten belüfteten Zone bereits so viel TOC entfernt wurde, dass die Denitrifikation aufgrund mangelnder Kohlenstoffquellen nicht stattfinden konnte. Um effektivere Denitrifikation zu erzielen, könnte die unbelüftete Zone (40 – 70% der Systemlänge) weiter nach vorn gelegt und/oder verbreitert werden. Vor der gewünschten anoxischen Zone würde so (absolut) weniger Sauerstoff eingeführt und wäre räumlich gesehen eher aufgebraucht. Alternativ könnte die Beladung von HM erhöht werden. Dies würde die Menge zu oxidierender Substanzen und damit die Sauerstoffzehrung in der ersten aeroben Zone erhöhen. In der unbelüfteten Zone könnten so eher anoxische Bedingungen erreicht werden und es stünde noch ausreichend TOC zur Denitrifikation zur Verfügung. Der Einfluss dieser Änderungen auf DO und Redoxpotential sowie die Elimination klassischer Abwasserinhaltsstoffe und Spurenstoffe könnte in zukünftigen Untersuchungen zunächst über Beprobungen des Ablaufs erfolgen und, sollte eine Verbesserung der TN-Entfernung eintreten, um interne Probenahmen ergänzt werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Anlaufphase der neuen Anlagen bzgl. der Elimination der Indikatoren im Fokus stand, wurden mögliche Ursachen für das Ausbleiben verbesserter TN-Elimination und entsprechende Gegenmaßnahmen nicht weiter verfolgt

3.2.3. Resilienz von etablierten belüfteten Anlagen

Die belüfteten Systeme HAp und VAp zeigten in Teilstudie 1 eine hohe, gegenüber saisonal veränderlichen Umweltbedingungen robuste Entfernungsleistung für (aerob bioabbaubare) Abwasserinhaltsstoffe. Inwieweit Systeme dieses Typs kurzfristige Änderungen der Bedingungen, speziell den Ausfall der Belüftung, abfedern können und wie schnell der Normalbetrieb bzgl. der Elimination klassischer Verunreinigungen wiederhergestellt wird (Resilienz), wurde von Boog *et al.* (2018) in den unbepflanzten Anlagen HA und VA untersucht. Die Teilstudie von Sommer 2015 wurde dabei durch Analysen der Indikatorsubstanzen begleitet. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

Vergleich der Performance von bepflanzten und unbepflanzten Anlagen

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass im Jahresdurchschnitt bepflanzte (HAP, VAp) und unbepflanzte (HA, VA) Anlagen bzgl. der Entfernung von Kohlenstoff und Stickstoff vergleichbare Leistungen erbrachten (Boog *et al.* 2014, Nivala *et al.* 2013b).

In Ablaufproben von HA und HAp (23. und 30.6.2015) wurden außerdem übereinstimmende Konzentrationen der (aerob) leicht bioabbaubaren Spurenstoffe (CAF, IBU, NPX) sowie des persistenten CBZ festgestellt (Tabelle A-4). Für BTZ, DCL und ACE traten deutliche Unterschiede auf: Die Konzentration von BTZ war im Ablauf von HA mehr als zehnmal höher als im Ablauf von HAp (8,5 – 14 µg/L vs. 0,56 – 0,92 µg/L), die Konzentration von DCL unterschied sich um einen Faktor von 3 – 4 (3,7 – 4,5 µg/L vs. 1,0 – 1,4 µg/L). ACE wurde in HA erst ab dem 21.7.2015 entfernt (Tabelle A-4), während bei HAp nahezu quantitative Eliminierung bereits am 9.6.2015 auftrat.

Die auf der Pilotanlage routinemäßig durchgeführten Analysen von Zu- und Ablauf jedes Systems zeigten, dass die für die Spurenstoffentfernung wichtigen Parameter Temperatur, Redoxmilieu und Hintergrundkohlenstoffgehalt (CBOD₅) im Ablauf von HA und HAp sehr ähnlich waren. Aufgrund der bei identischen Abmessungen geringeren Beladung von HA (576 L/d) im Vergleich zu HAp (770 L/d) und der resultierenden größeren hydraulischen Verweilzeit (HRT) wurde außerdem eine effektivere Entfernung der Indikatoren in HA erwartet. Dass die mäßig aerob bioabbaubaren Indikatoren stattdessen in HAp effektiver entfernt wurden, könnte mit dem Vorhandensein von Pflanzen auf HAp zusammenhängen. Bereits frühere Studien berichten eine bessere Entfernung von anthropogenen Spurenstoffen in Pflanzenkläranlagen verglichen mit unbepflanzten Äquivalenten (Hijosa-Valsero *et al.* 2010b, Zhang *et al.* 2012a). Zurückgeführt wird dies auf unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften. Zhang *et al.* (2010) zeigten bspw., dass die mikrobielle Gemeinschaft bei Anwesenheit von Pflanzen im System diverser und die

Zellzahl der Mikroorganismen größer ist als in unbepflanzten Systemen. Die Anwesenheit von mehr und gegebenenfalls auch aktiveren Spurenstoff-abbauenden Mikroorganismen im Wurzelbereich ist daher eine mögliche Ursache für die bessere Performance von HAp im Vergleich zu HA.

VA und VAp erfuhren die gleiche Beladung (576 L/d), wurden in der vorliegenden Arbeit aber nicht parallel auf Indikatorentfernung untersucht. Allerdings sind ähnliche Unterschiede wie zwischen HA und HAp zu erwarten: Die mikrobielle Gemeinschaft dürfte sich aufgrund der An- bzw. Abwesenheit von Bepflanzung unterscheiden haben. Außerdem wurden in der Routineanalytik stets etwas geringere DO-Gehalte im Ablauf von VA als im Ablauf von VAp festgestellt. Beides kann eine geringere Indikatorentfernung im unbepflanzten VA zur Folge haben. Vorhandene Daten unterschiedlicher Zeiträume scheinen dies zu bestätigen: Im Juni 2015 wurde ACE in VA nicht entfernt (Tabelle A-4), VAp zeigte im Juni 2014 bereits > 80% Entfernung. Die Ablauftemperaturen waren 2014 und 2015 sehr ähnlich (Routinedaten) und wie oben beschrieben wiesen VA und VAp in der Regel eine ähnliche Reinigungsleistung bzgl. Kohlenstoff und Stickstoff auf.

Reinigungsleistung im störungsfreien Betrieb

Für fünf bzw. sechs Wochen vor dem eigentlichen Test der Resilienz (Simulation Ausfall der Pumpen für Belüftung) wurden Zu- und Ablauf von VA bzw. HA untersucht, um die Basisperformance der Systeme zu beurteilen. Der Zustand vor der Havariesimulation war folgender: Die Entfernung von gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC, *engl. dissolved organic carbon*) sowie Ammonium betrug in beiden Systemen effektiv mehr als 89%. Die Elimination von gelösten stickstoffhaltigen Verbindungen (DN, *engl. dissolved nitrogen*) war in VA etwas besser (52%) als in HA (42%) (Boog *et al.* 2018). Letzteres wurde auch bei VAp und HAp beobachtet (Publikation 1, s. Kapitel 3.2.1 und 6.1). Dieser Unterschied zwischen Anlagen mit vertikalem und horizontalem Fluss liegt wahrscheinlich in einer besseren Denitrifikation aufgrund intensiverer Durchmischung von (teil-) behandeltem und frischem Abwasser in vertikal durchströmten, aktiv belüfteten Systemen begründet.

Die mittleren detektierten Konzentrationen der Indikatoren in HA und VA vor dem simulierten Belüftungsausfall sind in Tabelle 3-8 dargestellt (Einzelwerte: Tabelle A-4). Abgesehen von CAF sind die Zulaufkonzentrationen der Indikatoren während der verschiedenen Beobachtungszeiträume von HA und VA vergleichbar. Die mittlere Zulaufkonzentration von CAF war im Zeitraum der Beprobung von VA (9.6. – 14.7.2015) höher und weniger variabel ($85 \pm 16 \mu\text{g/L}$) als im Beobachtungszeitraum von HA (23.6. – 28.7.2015; $64 \pm 33 \mu\text{g/L}$). Im Ablauf von

HA und VA waren die mittleren Indikatorgehalte ebenfalls vergleichbar. Da HA und VA die gleiche Beladung erfuhren, zeigt dies eine vergleichbare Eliminationseffizienz bzgl. der Indikatoren an. Eine ähnliche Performance aktiv belüfteter Systeme mit vertikalem bzw. horizontalem Fluss wurde ebenfalls bei VAp und HAp beobachtet (Publikation 1, s. Kapitel 3.2.1 und 6.1).

Tabelle 3-8. Mittelwert und Standardabweichung der Indikatorkonzentrationen ($\mu\text{g/L}$) in Zulauf (zu) und Ablauf (ab) der Anlagen VA und HA im störungsfreien Betrieb, Beobachtungszeitraum 09.06. – 14.07.2015 (VA) bzw. 23.06. – 28.07.2015 (HA). Einzelwerte siehe Tabelle A-4.

	CAF	IBU	NPX	BTZ	DCL	ACE	CBZ
VA _{zu}	85 ± 16	25 ± 5	3,5 ± 1,0	14 ± 3	5,7 ± 0,4	21 ± 2	2,2 ± 0,4
VA _{ab}	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0,35 ± 0,12	4,4 ± 0,6	3,0 ± 0,4	10 ± 8	2,5 ± 0,5
HA _{zu}	64 ± 33	23 ± 5	3,5 ± 1,1	13 ± 3	5,2 ± 0,8	19 ± 3	2,1 ± 0,3
HA _{ab}	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,9 ± 2,2	3,9 ± 0,9	10 ± 9	2,0 ± 0,4

n = 4 (VA_{ab}), 5 (VA_{zu}), 6 (HA_{ab}, HA_{zu})

LOQ für CAF: 0,49 $\mu\text{g/L}$; LOQ für IBU: 1,28 $\mu\text{g/L}$; LOQ für NPX: 0,09 $\mu\text{g/L}$

Überraschenderweise wurden etwas höhere BTZ-Gehalte im Ablauf von HA (7,9 $\mu\text{g/L}$) als im Ablauf von VA (4,4 $\mu\text{g/L}$) beobachtet. Beide Systeme wiesen während der verschiedenen Beobachtungszeiträume etwa ähnliche BTZ-Zulaufkonzentrationen sowie Wassertemperatur, DO und E_H im Ablauf auf. Dies legt nahe, dass in HA und VA eigentlich ähnliche, dem Abbau von BTZ zuträgliche, Bedingungen vorlagen. Bei Betrachtung der Einzelwerte (Vgl. Abbildung 3-6) fiel auf, dass die BTZ-Konzentration im Ablauf von VA über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant war, während sie im Ablauf von HA von 14 $\mu\text{g/L}$ nach Beginn der Untersuchung (23.06.2015) auf 4,3 $\mu\text{g/L}$ (28.07.2015) sank. Dies könnte dadurch verursacht worden sein, dass sich die Abbaufähigkeit der mikrobiellen Gemeinschaft für BTZ in HA im Juni und Juli 2015 noch nicht ausreichend von den Bedingungen der kalten Saison erholt hatte, sondern in der Re-Etablierungsphase war. Für die Hypothese, dass die mikrobielle(n) Gemeinschaft(en) sich in HA etwas langsamer erholten spricht auch, dass in HA erst ab Mitte Juli ACE-Abbau beobachtet wurde, in VA jedoch bereits ab Ende Juni. Um dies abschließend beurteilen zu können, müssten komplette Jahrgänge aufgenommen werden, was jedoch den Fokus dieser Teilstudie überstieg.

Reaktion auf simulierte Havarie - Belüftungsausfall

Die Verläufe der Indikatorkonzentrationen nach Abschaltung der Belüftung waren im Ablauf von HA und VA vergleichbar: Nach einem Tag ohne aktive Belüftung begannen die Ablaufkonzentrationen der Indikatoren, außer CBZ, merklich anzusteigen und erreichten nach etwa drei bis vier Tagen ohne externe Sauerstoffzufuhr ihren Maximalwert (Abbildung 3-6). Das

in allen Redoxmilieus leicht abbaubare CAF war dabei der einzige Indikator, bei dem dieser Maximalwert merklich unter der Zulaufkonzentration lag. Etwa drei bis vier Tage nach Wiedereinschalten der Belüftung war die ursprüngliche Ablaufqualität von HA und VA bzgl. der Indikatoren wiederhergestellt. Bei CBZ waren über den gesamten Zeitraum keine deutlichen Änderungen in der Ablaufkonzentration zu beobachten. Dies war zu erwarten, da diese Substanz nur unter anaeroben Bedingungen (mäßig) abbaubar ist (Jekel *et al.* 2015, König *et al.* 2016), aber normalerweise aeroben Bedingungen vorherrschen, sodass wahrscheinlich keine zum Abbau befähigte mikrobielle Gemeinschaft vorhanden war.

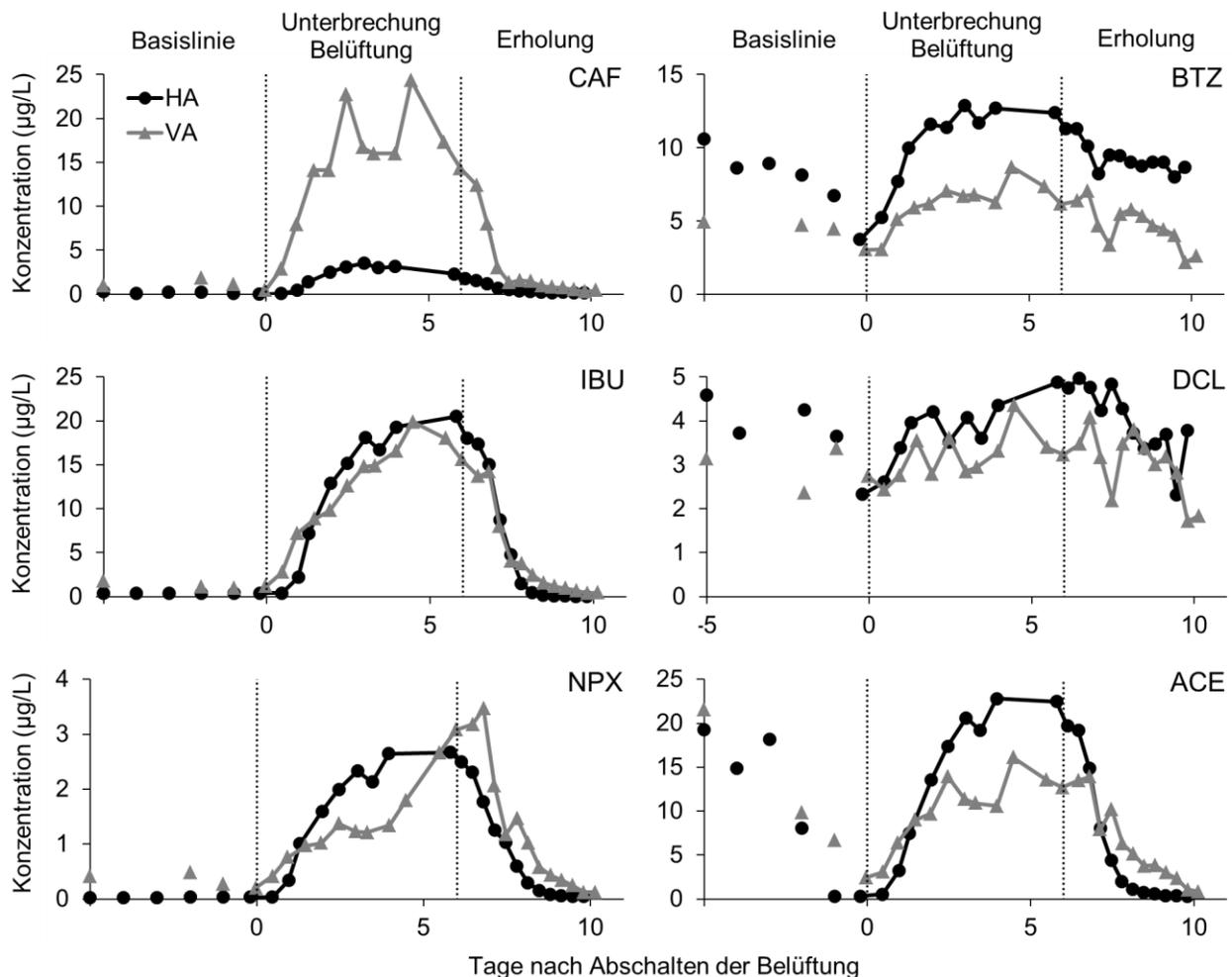


Abbildung 3-6. Konzentrationen der leicht bioabbaubaren Indikatoren Coffein (CAF), Ibuprofen (IBU), Naproxen (NPX) und der mäßig bioabbaubaren Indikatoren Benzotriazol (BTZ), Diclofenac (DCL) und Acesulfam (ACE) im Ablauf der Systeme HA und VA vor (Basislinie, bis Tag 0) und nach Abschalten der Belüftung (Tag 0 bis 6) sowie nach Wiedereinschalten der Belüftung (Erholung, ab Tag 6). Datenpunkte im Intervall „Basislinie“ wurden jeweils 35 Tage vor Abschalten der Belüftung bis zum Abschalten wöchentlich ermittelt; sie entsprechen damit nicht der Skalierung der Punkte ab dem Abschalten der Belüftung (Tag 0).

Die Ablaufkonzentrationen von DCL variierten während der Phase ohne Luftzufuhr stark, im Mittel ist jedoch nur ein leichter Anstieg der Konzentration von DCL im Ablauf von HA und VA zu erkennen (Abbildung 3-6). Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass die Elimination nahezu stabil geblieben ist: Die Entfernungsleistung von HA und VA für DCL (Tabelle 3-8) sowie die DCL-Zulaufkonzentrationen ($< 6,5 \mu\text{g/L}$, Tabelle A-4) waren bereits in der Periode vor der Simulation des Belüftungsausfalls niedrig, sodass eine weitere Verschlechterung der Eliminationsleistung kaum sichtbare Veränderungen der Ablaufkonzentrationen verursacht hätte. Besser geeignet als die Ablaufkonzentration wäre in diesem Fall die Entfernungsleistung (in %) gewesen, um Änderungen in der Performance zu verfolgen. Hierzu notwendige, der Verweilzeit entsprechende Zulaufproben standen nicht zur Verfügung. Für die vorliegende Teilstudie war der zu dieser Beprobung nötige technische Aufwand nicht gerechtfertigt.

Obwohl die generellen Verläufe der Indikatorkonzentrationen im Ablauf bei HA und VA vergleichbar waren, traten zum Teil Unterschiede in den genauen Zahlenwerten auf. Bspw. waren die Ablaufkonzentrationen von CAF in VA deutlich höher als in HA und im Ablauf von HA wurde mehr BTZ detektiert als im Ablauf von VA (Abbildung 3-6). Dies ist gut nachvollziehbar, da HA bereits vor Abschaltung der Belüftung weniger effektiv in der BTZ-Entfernung war als VA und höhere BTZ-Gehalte im Ablauf aufwies. Die höheren Ablaufkonzentrationen von CAF während des Beobachtungszeitraums von VA lassen sich durch höhere Zulaufkonzentrationen in dieser Zeit erklären (Abbildung A-10).

Die Trends der Indikatorkonzentrationen im Ablauf deuten an, dass das Abschalten der Belüftung schnell zur Limitierung oxidativer Entfernungsprozesse führte, was durch einen Mangel an verfügbarem Sauerstoff im System verursacht sein könnte. Dies bestätigen die von Boog *et al.* (2018) veröffentlichten Ergebnisse: Redoxpotential und Sauerstoffgehalt im Ablauf der Systeme sanken innerhalb des ersten Tages nach Belüftungsstopp, sodass sich in HA und VA anoxische und mit fortschreitendem Ausbleiben der Belüftung anaerobe Zonen ausbildeten. Gleichzeitig trat eine Erhöhung der Konzentration von DOC, DN und $\text{NH}_4\text{-N}$ auf. Durch Wiederanstellen der Belüftung stellte sich innerhalb von drei bis vier Tagen für alle untersuchten Parameter der ursprüngliche Zustand wieder her. Die üblichen Reinigungsleistungen der Systeme wurden wieder erreicht.

Die Resilienz von Anlagen zur Abwasserbehandlung wurde bisher nur in geringem Umfang untersucht (Juan-García *et al.* 2017). Untersuchungen zur Resilienz belüfteter Pflanzenkläranlagen bzw. Bodenfilter wurden äußerst selten und dann auch nur bzgl. klassischer Abwasserinhaltsstoffe durchgeführt (Boog *et al.* 2018, Murphy *et al.* 2016). Ergebnisse bzgl. der Resilienz der Entfernung anthropogener Spurenstoffe fehlten bisher. Für

die Indikatoren konnten, im Gegensatz zu den Wasserqualitätsparametern (Boog *et al.* 2018), keine klaren Unterschiede in der Reaktion von HA und VA auf Ab- und Anstellen der Belüftung festgestellt werden. Allerdings wurden weniger Proben auf die Indikatoren als auf die anderen Parameter analysiert, sodass ein solcher Unterschied nicht auszuschließen ist und aufgrund der schnellen Veränderungen der Redoxbedingungen sogar zu erwarten wäre. Insgesamt zeigte die Resilienzstudie, dass bei aktiv belüfteten Pflanzenkläranlagen ein Ausfall der Luftzufuhr (im Sommer) für wenige Stunden keinen merklichen Einfluss auf die Ablaufqualität hätte. Allerdings verringert sich die Reinigungsleistung nach einem Tag merklich und die Ablaufqualität nimmt ab. Mit jedem weiteren Tag ohne externe Luftzufuhr wird dieser Effekt zunehmend verstärkt. Andererseits stellt sich innerhalb weniger Tage nach Wiederherstellung der Belüftung die ursprüngliche Leistung der Systeme ein, selbst nach fast einer Woche ohne Luftzufuhr. Dies gilt sowohl für die üblichen Abwasserparameter (Boog *et al.* 2018) als auch die untersuchten anthropogenen Spurenstoffe (Indikatoren).

Die etablierte mikrobielle Gemeinschaft scheint kurzfristige Schwankungen der Umgebungsbedingungen zu tolerieren. Dies lässt vermuten, dass sich die Zusammensetzung sowie die (theoretische) Funktionalität während weniger Tage ohne externe Sauerstoffzufuhr nicht stark verändern. Bei längerem Betrieb ohne Belüftung wäre denkbar, dass sich die mikrobielle Gemeinschaft an die neuen Bedingungen anpasst und dadurch die Zusammensetzung verändert. Nach Wiederanstellen der Belüftung wäre dann eine längere Zeit bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen Gemeinschaft und deren Funktionalität (Reinigungsleistung) nötig. Belüftete Pflanzenkläranlagen und Bodenfilter erfordern entsprechend einen höheren Aufwand, bspw. engmaschigere Überprüfung des korrekten Betriebs, als unbelüftete Systeme wie H50p oder VGp. Dafür weisen sie aber auch eine deutlich bessere Reinigungsleistung auf.

3.3. Fazit

Mit Ausnahme des klassisch designten, horizontal durchströmten und bepflanzten Bodenfilters H50p hielten alle untersuchten Kleinkläranlagen die nach AbwV (1997) Anhang 1 für Anlagen der Größenklasse 1 definierte, maximale Ablaufkonzentration von 40 mg/L CBOD₅ (BSB₅) ein. In Systemen mit erhöhter Sauerstoffverfügbarkeit (Intensivierung) konnte eine verbesserte und über den Jahresverlauf stabilere Elimination von aerob bioabbaubaren Substanzen beobachtet werden. Dies betraf klassische Abwasserinhaltsstoffe wie Ammonium oder abbaubare Kohlenstoffverbindungen (repräsentiert durch CBOD₅), aber auch oxidativ entfernbare anthropogene Spurenstoffe, wie IBU, NPX, BTZ, DCL und, überraschenderweise, auch ACE. Aufgrund ähnlicher Reinigungsleistung wurden drei Gruppen von Systemen definiert: Das

System passiven Designs, H50p, wies die niedrigste Entfernungsleistung auf. Das ungesättigte System VGp sowie R, als System mit alternierender Beschickung zweier Kammern, zeigten eine deutlich bessere Reinigungsleistung als H50p. Die belüfteten Anlagen HAp und VAp sowie das zweistufige System VGp + VSp wiesen die besten Reinigungsleistungen auf. Diese Gruppierung trat auch bei statistischer Auswertung der Daten mittels Hauptkomponentenanalyse auf (Nivala *et al.* 2018a). Welches System das geeignetste darstellt, bestimmen jedoch die Voraussetzungen und Zielvorgaben der jeweiligen Fragestellung, wie z. B. der verfügbare Platz, die Art und Zusammensetzung des zu behandelnden Abwassers, die (Mindest-) Anforderungen an die Qualität des Ablaufs oder die akzeptable Kostenspanne für Bau, Betrieb und Wartung.

Belüftete Systeme boten eine effektive, selbst in gemäßigttem Klima über das Jahr robuste, Reinigungsleistung bei geringer Grundfläche (HAp, VAp). Die bessere Performance dieser komplexen Systeme im Vergleich zu klassischen (passiven) Systemen wurde auch von anderen Autoren für herkömmliche Abwasserinhaltsstoffe (Kadlec & Wallace 2009, Liu *et al.* 2016) berichtet. Zhang *et al.* (2017a) beobachteten ebenfalls bessere IBU-Entfernung in belüfteten Anlagen. Jedoch sind diese guten Reinigungsleistungen mit höheren Bau- und Betriebskosten verbunden und erfordern aufwendigere Wartung als klassische Anlagen wie H50p.

Störungen des Anlagenbetriebs durch einen (simulierten) Ausfall der Belüftung wirkten sich bereits nach einem Tag negativ auf die Reinigungsleistung belüfteter Bodenfilter (HA, VA) aus. Nach mehreren Tagen ohne Belüftung war die Ablaufqualität vergleichbar mit der von klassischen, passiven Systemen. Dies verdeutlicht erneut die Vorteile aerober Bedingungen für den effektiven Abbau vieler Abwasserinhaltsstoffe.

Die Versuche zum simulierten Ausfall der Belüftung zeigten, dass auch nach mehrtägigem Defekt der Belüftung die ursprüngliche Aktivität der Mikroorganismen innerhalb weniger Tage wiederhergestellt wurde. Außerdem konnte die Eliminationseffizienz der belüfteten Systeme für einige Stunden ohne aktive Belüftung aufrechterhalten werden. Innerhalb der Systeme lag offenbar ein Sauerstoffüberschuss vor, sodass die oxidativen Prozesse auch nach Abschalten der Luftzufuhr einige Zeit stattfinden konnten. Dies deutet an, dass eine intermittierende anstelle einer ständigen Belüftung zum Erreichen der hohen Reinigungsleistung der Systeme ausreichen könnte. Intermittierende Belüftung wurde bspw. von Liu *et al.* (2016) zur Verringerung der Betriebskosten sowie gegebenenfalls Verbesserung der TN-Elimination vorgeschlagen. Trotzdem sollten Defekte an belüfteten Systemen zeitnah behoben werden, um die etablierten mikrobiellen Gemeinschaften weniger Stress auszusetzen und eine gleichbleibend hohe Performance zu gewährleisten.

Mittels neu in Betrieb genommener belüfteter Systeme (HM, HMc) wurde untersucht, wie schnell sich in belüfteten Anlagen eine mikrobielle Gemeinschaft etabliert, welche hohe Reinigungsleistungen erzielt. Eine Einlaufphase von nur ein bis zwei Monaten war erforderlich, bis die Ablaufqualität mit der eines etablierten Systems (HAp) vergleichbar war. Für nur mäßig bioabbaubare Substanzen war eine deutlich längere Einlaufzeit erforderlich. Bspw. waren für DCL und ACE 11 – 12 Monate nötig. Diese lange Anlaufphase deutet darauf hin, dass sich für den Abbau einiger Substanzen zunächst spezielle Mikroorganismen und Bedingungen (in einer ausreichend breiten Zone des Systems) etablieren müssen. Kürzere Anlaufzeiten könnten möglicherweise erreicht werden, wenn neue belüftete Systeme zu Beginn warmer Jahreszeiten in Betrieb genommen würden.

Generell scheinen belüftete Systeme robust, resilient und effizient in der Schmutz- sowie Spurenstoffelimination. Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse von Systemen im Pilotmaßstab auf Anlagen im Originalmaßstab (nach Li *et al.* (2014): Grundfläche über 100 m²) muss noch geprüft werden. Ebenso sollte eine Einschätzung der Elimination von Substanzgruppen, die nicht durch die gewählten Indikatoren vertreten werden sowie der prioritären Substanzen erfolgen. Zukünftige Studien könnten zum Beispiel auch Indikatoren für sorptive Prozesse oder Aufnahme durch Pflanzen inkludieren, um die Bedeutung und den Beitrag dieser Entfernungsprozesse zu beurteilen.

Da ACE sich als unter bestimmten Bedingungen bioabbaubar erwies, sollte das Indikatorset für (aeroben) Bioabbau außerdem um einen unter allen Redoxbedingungen persistenten anthropogenen Spurenstoff ergänzt werden. Ein möglicher Kandidat wäre Oxypurinol, der aktive Hauptmetabolit des Urikostatikums Allopurinol (Castronovo *et al.* 2017, Funke *et al.* 2015). Diese polare Substanz wurde im µg/L-Bereich in kommunalem Abwasser detektiert und erwies sich als persistent in Kläranlagen (Funke *et al.* 2015). Eine dezidierte Untersuchung der Bioabbaubarkeit im aeroben, anoxischen und anaeroben Milieu steht allerdings aus. ACE könnte im Indikatorset verbleiben, um, bei Abbau, auf das Vorhandensein aerober, oligotropher Zonen hinzuweisen. Hierzu müssten die genannten Bedingungen allerdings die einzigen bzw. vorteilhaftesten Bedingungen für den Bioabbau sein, was in zukünftigen Untersuchungen zu prüfen ist.

4. Bioabbau von Acesulfam

Wie bereits erwähnt, galt der Süßstoff Acesulfam-K (ACE) seit dem erstmaligen Nachweis in der aquatischen Umwelt (2009) aufgrund seiner hohen Mobilität und Persistenz sowie des hohen Konsums als idealer Marker für den Eintrag behandelten und unbehandelten Abwassers in die aquatische Umwelt (Buerge *et al.* 2009, Engelhardt *et al.* 2013, Jekel & Dott 2013, Scheurer *et al.* 2011). Vereinzelt gab es allerdings Hinweise auf ACE-Elimination in Kläranlagen (Buerge *et al.* 2009, Buerge *et al.* 2011, Scheurer *et al.* 2009, Scheurer *et al.* 2011) und seit 2014 stellen immer mehr Ergebnisse aus Labor- und Feldstudien die Persistenz von ACE infrage (Burke *et al.* 2014, Falås *et al.* 2016, LUBW 2014, Tran *et al.* 2014). 2017 wurde die Bioabbaubarkeit von ACE schließlich eindeutig nachgewiesen (Castronovo *et al.* 2017). Da auch im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (2014 – 2015) in einigen Pflanzenkläranlagen zumindest zeitweise ACE-Entfernung beobachtet wurde, sollte geklärt werden, wie verbreitet der Bioabbau von ACE ist, ob diese Bioabbaubarkeit auf einer neu entwickelten Fähigkeit mikrobieller Gemeinschaften beruht und welche Bedingungen dazu förderlich sind. Hierzu wurden Ergebnisse aus Feld- und Laborstudien herangezogen (Publikation 2, s. Kapitel 4.2.1 und 6.2). Ergänzend wurden Versuche durchgeführt, um ACE-abbauende Mikroorganismen zu identifizieren.

4.1. Methoden

4.1.1. Nachweis des Bioabbaus

Eine ausführliche Beschreibung der (Analyse-) Methoden dieses Kapitels (Nachweis und Aufklärung der Verbreitung des Bioabbaus von ACE) kann in Publikation 2 nachgelesen werden (s. Kapitel 6.2). Im Folgenden wird nur eine kurze Übersicht gegeben. Als Dotierungssubstanz wurde Acesulfam-K verwendet. Zur Unterscheidung von der zuvor angegebenen Konzentration der freien Säure (ACE) wird daher an den entsprechenden Stellen die Abkürzung ACE-K verwendet.

Die ACE-Entfernungsleistung wurde in der kommunalen Kläranlage Langenreichenbach sowie in einer der Pflanzenkläranlagen mit höchster Reinigungsleistung (HAP; aktiv belüftet) über einen Jahresverlauf verfolgt (Juli 2014 bis Juni 2015). Hierzu wurden Daten aus Studie 1 zu den Pflanzenkläranlagen verwendet (Juli 2014 – Mai 2015) und die Beprobung der beiden Anlagen um einen Monat erweitert. Die Wiederherstellung der ACE-Abbaufähigkeit nach der inaktiven Phase (Winter/Frühjahr) zu Beginn 2015 wurde anhand relativer ACE-Konzentrationen innerhalb des Systems HAP verfolgt. Die Bestimmung klassischer Abwasserparameter (CBOD₅, NH₄-N, NO₃-N, T, E_H, DO) sollte bei der Identifizierung relevanter Einflussfaktoren auf die Effektivität der ACE-Entfernung helfen.

Die Verbreitung der Fähigkeit zum Abbau von ACE und deren Saisonalität in der Abwasserreinigung wurde durch Auswerten bereitgestellter ACE-Konzentrationsdaten (Zulauf und Ablauf) acht anderer deutscher Kläranlagen (A – H, 18.000 – 550.000 Einwohnerwerte) beurteilt. Zusätzlich wurde überprüft, ob die saisonalen Unterschiede in der ACE-Entfernung mit Unterschieden in den Wassertemperaturen innerhalb der Anlagen in Verbindung stehen.

Während der Periode nicht beobachtbarer ACE-Eliminierung in der Pflanzenkläranlage HAp (21. April 2015; Wassertemperatur am Ablauf: 11 °C) wurde Biomasse aus dem System entnommen und in einem Säulenexperiment mit Originalmatrix im Labor inkubiert (ca. 20 °C). Originalmatrix bezeichnet dabei den Überstand nach dem Absetzen der entnommenen Biomasse. So sollte überprüft werden, ob die für den ACE-Abbau relevanten Mikroorganismen auch in der kalten Periode des Jahres präsent sind, ob und wie schnell sich deren Aktivität durch Anheben der Wassertemperatur wiederherstellen lässt.

Biomasse wurde der Pflanzenkläranlage außerdem während einer Phase effektiver ACE-Entfernung (Juli 2015) zur Anreicherung der relevanten Spezies entnommen. Diese Anreicherung erfolgte über zahlreiche Überimpfungsschritte (Flüssigkulturen oder Agar-Medien) mit der Gabe von ACE-K als einziger Kohlenstoffquelle (mit Ausnahme des Zwischenschrittes auf NB-Agar, s. Abbildung 4-1). Die Veränderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde mittels molekularbiologischer Methoden (DNA-Extraktion, PCR, 16S rRNA Amplikon-Sequenzierung) untersucht. Auf Basis dieser Daten sollten für den ACE-Abbau (wahrscheinlich) relevante Organismen identifiziert werden. Eine der angereicherten Kulturen wurde außerdem mit 5 g/L ACE-K versetzt und der Konzentrationsverlauf von ACE, TOC und dem von Castronovo *et al.* (2017) identifizierten Abbauprodukt Amidosulfonsäure (SA, *engl. sulfamic acid*) im Zentrifugationsüberstand verfolgt, um die Vollständigkeit des ACE-Abbaus (Mineralisation oder Bildung von Transformationsprodukten) zu prüfen.

Durch das Sächsische Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG) bereitgestellte ACE-Konzentrationsdaten von deutschen Flüssen (Mulde, Elbe) und mehreren Jahren sollten einschätzen helfen, ob die ACE-Abbaufähigkeit in Kläranlagen bereits so weit verbreitet ist, dass Auswirkungen auf ACE-Konzentrationen in Oberflächenwasser sichtbar sind.

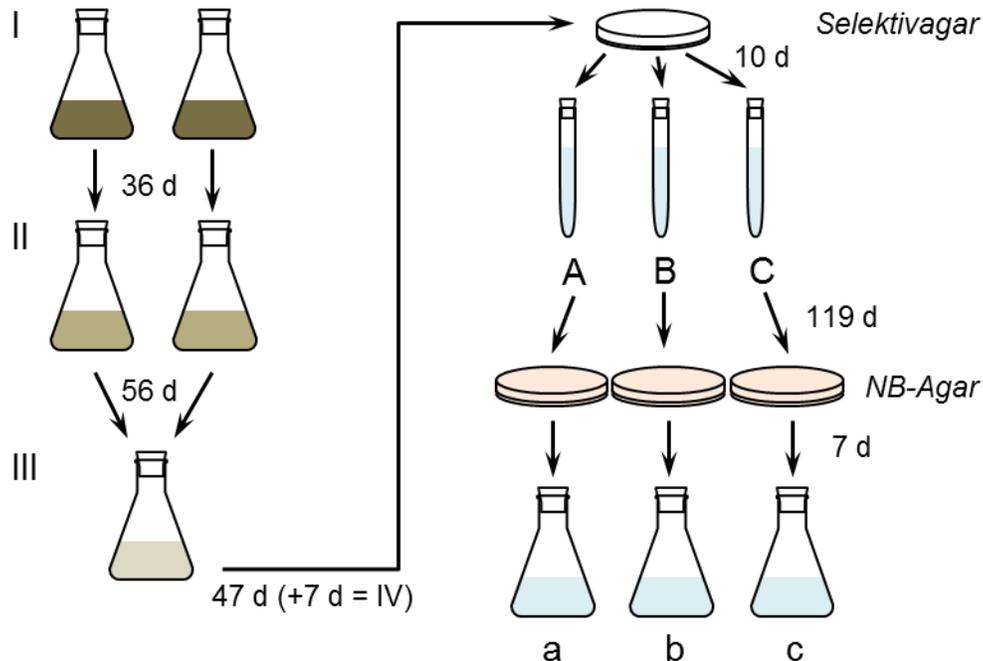


Abbildung 4-1. Schema der Anreicherung Acesulfam-abbauender Mikroorganismen, ausgehend von frischer Biomasse der Pflanzenkläranlage HAp (Juli 2015) durch mehrfaches Überimpfen in bzw. auf frisches Medium (14 °C). Als flüssiges Medium wurde DSMZ-Medium 462 mit sukzessiv steigendem Acesulfamgehalt verwendet. Ausstriche erfolgten auf Agar-Medium basierend auf DSMZ-Medium 462 (Selektiv-Agar) bzw. *nutrient broth* (NB-Agar; Komplexmedium). Biomasse zur DNA-Extraktion und Sequenzierung wurde direkt nach dem Ansetzen der Kulturen I, II und III sowie nach 54 d Inkubation von Kultur III (= Probe IV) entnommen. Die Flüssigkulturen A-C sowie a-c wurden nach längerer Laufzeit (> 250 d) mit Glycerol versetzt, bei -155 °C gelagert und nach zwei Monaten wieder in DSMZ-Medium 462 mit Acesulfam inkubiert (Raumtemperatur). DNA zur Sequenzierung der 16S rRNA-Gene zur Identifikation der Mikroorganismen wurde aus diesen reaktivierten Kulturen extrahiert.

4.1.2. Erste Versuche zur Anreicherung ACE-abbauender Mikroorganismen

Vor dem Ansetzen der beschriebenen Flüssigkulturen wurde das oben erwähnte Säulen-Experiment für einige weitere Monate fortgesetzt. Ziel war es zu überprüfen, ob eine Anreicherung der (potentiell) relevanten mikrobiellen Spezies unter Laborbedingungen möglich ist und so gegebenenfalls ein erstes System zu etablieren, welches unter solch kontrollierbaren Bedingungen zum ACE-Abbau befähigt ist. Der Säulenaufbau wurde gewählt, um den Aufbau der Pflanzenkläranlage zu imitieren. Zur Konditionierung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde schrittweise die Konzentration von ACE erhöht und die Komplexität der Matrix durch Erhöhung des Anteil eines Mineralmediums nach OECD-Richtlinie 301A (OECD 1992) verringert. Es wurde immer ein Teil Originalmatrix, also Überstand aus der Gewinnung der Biomasse (partiell

behandeltes Abwasser, aus HAp bei 50% Länge, April 2015), beigemischt, um sicherzustellen, dass gegebenenfalls notwendige Kofaktoren und Nährstoffe vorhanden sind.

Das Festbett der Säule (Kies und Biomasse) wurde nie ausgetauscht. Bei Erhöhung der Konzentration von ACE und/oder einem Wechsel der Matrix wurde das System mit ca. 100 mL der frisch präparierten Lösung gespült und dann die Schlauchverbindungen zur Zirkulation der verbleibenden Lösung geschlossen. Schlauchverbindungen wurden gelegentlich erneuert. Die Lösung im offenen Vorratsgefäß wurde mehrmals täglich manuell gerührt, um den Sauerstoffeintrag zu verbessern. Beprobt wurde stets aus diesem Gefäß und mittels HPLC-MS/MS die verbleibende Konzentration von ACE bestimmt. ACE-Abbauraten wurden berechnet nach Formel 4-1, mit der verbleibenden Konzentration von ACE zum Zeitpunkt t (c_t), der Startkonzentration von ACE (c_0) und der Laufzeit t .

$$\text{Umsatzrate} = \frac{c_0 - c_t}{t} \quad \text{Formel 4-1}$$

4.1.3. Gewinnung definierter Mischkulturen

Verdünnte Aliquote der angereicherten und nach Reaktivierung aus den Glycerol-Konserven neunmal umgesetzten Kulturen B und b (s. Abbildung 4-1) wurden auf Agar-Platten aus R2A-Medium mit 7 g/L ACE ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Nach vier Tagen wurden mehrere Kolonien verschiedener Morphologie auf frische Agar-Platten (aus R2A-Medium, 7 g/L ACE) überimpft und vereinzelt. Die DNA dieser Reinkulturen wurde mit dem NucleoSpin Tissue Kit (Machery-Nagel) isoliert. Die 16S rRNA-Gene wurden anschließend mittels PCR amplifiziert und sequenziert (bakterienspezifische Primer 27F, 519R). Die Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte wurde an einem Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer durchgeführt und die Ergebnisse mittels BLASTN (*Nucleotide-Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gegen die 16-S rRNA-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) bzw. mittels RDP Classifier gegen die RDP-Datenbank Release 11 (*Ribosomal Database Project*, <http://rdp.cme.msu.edu/>) verglichen. Die taxonomische Zuordnung erfolgte anhand des RDP Classifier mit 80% *confidence threshold*. Isolate, die Mischsequenzen aufwiesen, wurden nochmals vereinzelt und der beschriebenen Prozedur zur Identifizierung unterzogen. Die Ergebnisse der Sequenzierung von letztlich 21 Isolaten sind in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

Durch Überimpfen ausgewählter Isolate in 10 mL Flüssigmedium (DSM 462, 1 g/L ACE) wurden Mischkulturen zusammengestellt (Tabelle 4-1): Es wurde jeweils ein Vertreter jeder Gattung, ursprünglich aus Kultur B bzw. b stammend, zusammen gegeben (Mix B, Mix b). Zusätzlich

wurde jeweils ein Vertreter der Gattungen, die gleichzeitig in B und in b vorkamen (*Bosea*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae*) mit *Phyllobacteriaceae* zusammengegeben (Mix Min); *Phyllobacteriaceae* sind in Publikation 2 als wahrscheinlich für den ACE-Abbau entscheidend eingestuft worden (s. Kapitel 4.2.1 und 6.2). Daher wurden auch binäre Mischkulturen aus *Phyllobacteriaceae* und *Bosea* (P-Bo), *Phyllobacteriaceae* und *Microbacterium* (P-M) bzw. *Phyllobacteriaceae* und *Bradyrhizobiaceae* (P-Br) sowie eine Reinkultur von *Phyllobacteriaceae* (P) hergestellt. Als abiotische Kontrollen dienten jeweils 10 mL DSM 462 mit 1 g/L ACE.

Tabelle 4-1. Ergebnisse der Identifizierung der auf Agar-Medium (R2A, 7g/L ACE) vereinzelter Kolonien sowie in definierten Mischkulturen verwendete Isolate.

Ursprungskultur	Isolat	Ergebnis Identifizierung	Isolat verwendet in (Misch-) Kultur
B	B-1	<i>Sphingopyxis</i> sp.	Mix B
	B-2	<i>Microbacterium</i> sp.	Mix B
	B-3	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	Mix B
	B-4	<i>Enhydrobacter</i> sp.	Mix B
	B-5	<i>Bosea</i> sp.	-
	B-6	<i>Sphingopyxis</i> sp.	-
	B-7	<i>Microbacterium</i> sp.	-
	B-8	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	-
	B-9	<i>Bosea</i> sp.	Mix B
	B-10	<i>Bosea</i> sp.	-
b	b-1	<i>Bosea</i> sp.	Mix b, Mix Min, P-Bo
	b-2	<i>Rhodanobacter</i> sp.	Mix b
	b-3	<i>Bosea</i> sp.	-
	b-4	<i>Phyllobacteriaceae</i>	Mix b, Mix Min, P, P-Bo, P-M, P-Br
	b-5	<i>Rhodococcus</i> sp.	Mix b
	b-6	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mix b
	b-7	<i>Rhodococcus</i> sp.	-
	b-8	<i>Microbacterium</i> sp.	Mix b, Mix Min, P-M
	b-9	<i>Microbacterium</i> sp.	-
	b-10	<i>Bosea</i> sp.	-
	b-11	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	Mix b, Mix Min, P-Br

Die beschriebenen Kulturen („Originalkulturen“) hatten eine vergleichsweise hohe initiale Zelldichte. Um Wachstum und ACE-Abbau auch in Kulturen mit geringer initialer Zelldichte zu verfolgen, wurden 100 µL jeder Mischkultur nach drei (Mix B, Mix b, Mix Min) oder vier Tagen (P, P-M, P-Bo, P-Br) in jeweils 10 mL frisches Medium (DSM 462, 1 g/L ACE) umgesetzt („verdünnte Kulturen“). Alle Kulturen wurden bei 30 °C und 125 rpm inkubiert und auf den Abbau von ACE (HPLC-MS/MS) sowie die Bildung von SA (Ionenchromatografie) analysiert.

Zur Analyse von ACE wurden die Proben 1:100 000 (Originalkulturen) bzw. 1:40 000 (verdünnte Kulturen) mit Reinstwasser verdünnt. Bei sehr geringen ACE-Gehalten wurden die Lösungen unverdünnt analysiert. Proben, die vollständigen ACE-Umsatz zeigten, wurden für die Analyse von SA 1:5 mit Reinstwasser verdünnt. Aufgrund von Verdunstung während der Inkubation

wurden die Analysenwerte in Proben nach Inkubation mit dem Anreicherungsfaktor der jeweiligen Probenreihe korrigiert. Dieser Anreicherungsfaktor wurde aus dem Verhältnis des Gehalts von ACE in den abiotischen Kontrollen nach Inkubation für den Zeitraum t zum Gehalt bei Beginn der Inkubation (c_t/c_0) berechnet. Die Entfernung von ACE wurde ermittelt nach Formel 4-2 und die Ausbeute an SA berechnet nach Formel 4-3. Dabei entsprechend A_0 und c_0 der Peakfläche von ACE und der Konzentration von SA zum Startzeitpunkt, A_t und c_t der Peakfläche von ACE und der Konzentration von SA zum Zeitpunkt t , a dem Anreicherungsfaktor (A_t/A_0 von ACE in der abiotischen Kontrolle) zum Zeitpunkt t und c_{max} , der bei quantitativen Umsatz von 1 g/L ACE (4,97 mmol/L) gebildeten SA-Konzentration (482,47 mg/L freie Säure).

$$\text{Entfernung ACE (\%)} = \frac{A_0 - A_t/a}{A_0} \times 100 \quad \text{Formel 4-2}$$

$$\text{Ausbeute SA (\%)} = \frac{c_t/a - c_0}{c_{max}} \times 100 \quad \text{Formel 4-3}$$

Die Bestimmungsgrenze der HPLC-MS/MS-Methode für ACE lag bei 0,003 µg/L, die der IC-Methode für SA bei 0,02 mg/L.

4.2. Ergebnisse und Diskussion

4.2.1. Untersuchungen zur Verbreitung des Acesulfam-Bioabbaus (Zusammenfassung Publikation 2)

Die folgend dargestellten Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift Environmental Science & Technology unter dem Titel "Emerging biodegradation of the previously persistent artificial sweetener acesulfame" publiziert. Im Folgenden angegebene Abbildungen (Fig.) und Tabellen (Tab.) beziehen sich auf Darstellungen im Artikel.

Zwischen Februar 2014 und Mai 2017 erhobene Daten zum ACE-Gehalt in Zu- und Ablauf von zehn biologischen Abwasserbehandlungssystemen (Deutschland, neun kommunale Kläranlagen, eine aktiv belüftete Pflanzenkläranlage) zeigten, dass alle Anlagen ACE entfernen konnten (Fig. 1, 2). Allerdings wurden in einigen Anlagen ausgeprägte saisonale Unterschiede in der ACE-Elimination, mit geringer Effektivität (0 – 60%) zwischen Januar und April und effektiver Entfernung ($\geq 80\%$) zwischen Juni und November, beobachtet. Diese Performanceunterschiede (Saisonalität) traten in solchen Anlagen auf, in denen die Wassertemperatur über mehrere Wochen 10 °C unterschritt und waren umso ausgeprägter, je weiter die Wassertemperatur unterhalb dieses Grenzwertes lag (Fig. 1, 2). Interessanterweise war eine Verzögerung von mehreren Wochen zwischen Unter- bzw. Überschreiten dieser kritischen Temperatur und der

entsprechenden Anpassung der Entfernungsleistung zu beobachten. In der Pflanzenkläranlage war z. B. das volle Potential der ACE-Entfernungsleistung erst im Juni wiederhergestellt, obwohl die Wassertemperatur bereits im April 10 °C überstieg (Fig. 1).

Ob und gegebenenfalls wie schnell die Fähigkeit zum ACE-Abbau durch Temperaturerhöhung verbessert werden kann, wurde in einem Säulenversuch bei Raumtemperatur überprüft: Mit Schlamm aus der Pflanzenkläranlage, entnommen während der Phase ineffektiver ACE-Entfernung (21. April 2015), wurde ACE innerhalb von 47 d zu 66% entfernt (Fig. S2). Trotz dieser sehr geringen Umsatzgeschwindigkeit bewies das Experiment, dass die zum Abbau von ACE erforderlichen Mikroorganismen ganzjährig in der Pflanzenkläranlage präsent waren und nur zeitweise keine messbare Aktivität in Form von Konzentrationsminderung im Ablauf aufwiesen.

Mittels interner Beprobungen der Pflanzenkläranlage sollte untersucht werden, welche weiteren Randbedingungen für effizienten ACE-Abbau von Vorteil sind. Während der Übergangsphase zu effektiver ACE-Entfernung im Mai/Juni 2015 sowie in Vorversuchen im September 2014 zeigte sich, dass selbst bei adäquaten Temperaturen ACE nie in den ersten 25% des Systems entfernt wird (Fig. 3a). In diesem Bereich wurden stets sehr hohe Gehalte von CBOD₅ sowie sehr niedrige Redoxpotentiale und DO-Konzentrationen festgestellt (Fig. 3b). Für einen effektiven Bioabbau von ACE scheinen folglich, neben mesophilen Temperaturbereichen, die Verfügbarkeit von Sauerstoff und ein Mangel an biologisch abbaubarem Kohlenstoff vorteilhaft. Entsprechend wurde in der Übergangsphase (Wiederherstellung der Abbaufähigkeit) im Mai/Juni 2015 ACE auch wieder zuerst am Ende des Systems entfernt, wo diese Bedingungen am stärksten ausgeprägt waren (Fig. 3).

Zur Identifizierung der Mikroorganismen, die für den ACE-Abbau essentiell sind, wurden ausgehend von Schlamm, der der Pflanzenkläranlage an der Stelle mit der effektivsten ACE-Entfernung (50% Länge) entnommen wurde, Anreicherungskulturen hergestellt. Gemäß den Befunden zu vorteilhaften Betriebsbedingungen wurden diese Kulturen unter aeroben Bedingungen, bei ≥ 14 °C, in Mineralmedium und mit ACE als einziger (zugesetzter) Kohlenstoffquelle inkubiert. Nach jedem Transferschritt (Umsetzen in frisches Flüssigmedium oder Ausstreichen auf Agar) wurde ACE von den Mischkulturen erneut entfernt. Eine der letzten Anreicherungskulturen entfernte bspw. innerhalb von 28 d 99% des zugesetzten ACE-K (5 g/L) sowie des TOC (Fig. S3). Der wiederholte und quantitative Umsatz zeigt eine katabole Transformation von ACE an, wobei Amidosulfonsäure (SA, *engl. sulfamic acid*) das finale Transformationsprodukt war und in stöchiometrischen Anteilen gebildet wurde. Da keine Reinkultur gewonnen werden konnte, die ACE abbaut, wurden mittels der Sequenzierung von

16S rRNA-Genen (Gene der ribosomalen Ribonukleinsäure) der Anreicherungskulturen (beginnend mit frischen Schlamm) Mikroorganismen ermittelt, die wahrscheinlich am ACE-Abbau beteiligt sind. Spezifisch angereichert wurden über alle Anreicherungsschritte Organismen der Familie *Phyllobacteriaceae* (Fig. 4). In den Flüssigkulturen erhöhte sich vor der ersten Agar-Passage der Anteil von Organismen der Familie *Methylophilaceae*, nach Agar-Passage(n) die Anteile von Organismen der Familie *Bradyrhizobiaceae* und der Gattung *Pseudomonas*. Das Anreicherungsmuster von *Phyllobacteriaceae* deutet an, dass diese Organismen eine Schlüsselrolle beim ACE-Abbau spielen.

Im letzten Teil der Studie wurde geprüft, ob die Fähigkeit zur ACE-Elimination unter biologischen Abwasserbehandlungsanlagen bereits so verbreitet ist, dass Auswirkungen auf die ACE-Fracht in Oberflächenwässern sichtbar werden. Als Basis dienten ACE-Konzentration und Durchflussmenge von Elbe und Mulde an zwei bzw. einer Gewässergütemessstation zwischen 2013 und 2016 (bereitgestellt durch das LfULG). Während dieser Zeit sank der Jahresmedian der ACE-Fracht in der Elbe (Stationen Schmilka und Domnitzsch) um etwa 80% und in der Mulde (Station Bad Dübener) um rund 70% (Fig. 5, Fig. S4). 2016 waren neben dem allgemein rückläufigen Trend der ACE-Frachten auch saisonale Unterschiede in den ACE-Frachten zu erkennen: Zwischen Februar und April war die ACE-Fracht in beiden Flüssen etwa doppelt so hoch wie zwischen Juli und September. Diese Zeiträume stimmen gut mit den in einigen Kläranlagen beobachteten Intervallen ineffektiver bzw. hoher ACE-Entfernung überein.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass ACE bioabbaubar ist. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass dieser Bioabbau katabolisch stattfindet und die mikrobielle Gemeinschaft ACE als Kohlenstoffquelle nutzt. Ebenfalls zum ersten Mal wurde gezeigt, dass die Entfernung von ACE in der biologischen Abwasserbehandlung ausgeprägte saisonale Schwankungen aufweisen kann. Dies deutete sich in einer Kläranlage, die Castronovo *et al.* (2017) über zwei Jahre hinsichtlich ACE-Entfernung untersuchten zwar bereits an, war jedoch nicht so deutlich zu erkennen: ACE wurde im Mai 2013 zu 30%, von Oktober bis Dezember 2013 zu 90%, im März 2014 zu 10% und im Juni 2014 wieder zu 80% eliminiert. Im vorhergehenden Zeitraum der Beprobung (Mai 2012 bis März 2013) war die Entfernungsleistung schlecht und betrug selbst im August 2012 nur 40%. Höchstwahrscheinlich entwickelte sich die ACE-Abbaufähigkeit in dieser Anlage gerade und war erst ab Ende 2013 vollständig etabliert. Zudem wurden keine kontinuierlichen Daten zur ACE-Entfernung gezeigt. Der Zusammenhang zwischen der Entfernungsleistung und der Temperatur (Jahreszeit) war daher wahrscheinlich nicht zu erkennen. Entsprechend war bisher die kritische Temperatur, unterhalb derer ACE-

Abbau nicht mehr stattfindet, unbekannt. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit auf Basis der ACE-Entfernung in mehreren kommunalen Kläranlagen auf 10 °C abgeschätzt. Die Richtigkeit dieses Wertes könnte durch Auswertung von Datensätzen weiterer Kläranlagen sowie dezidierten Laborstudien mit inkubierter Biomasse verschiedener Herkunft überprüft werden. Sollten stets die gleichen mikrobiellen Spezies für den ACE-Abbau verantwortlich sein, müsste dieser Wert immer der Grenztemperatur entsprechen und könnte als allgemeingültiger Richtwert definiert werden.

Angesichts der seit 2014 vermehrt auftretenden Befunde bzgl. der biologischen Entfernbareit von ACE in Labor- und Feldstudien (Burke *et al.* 2014, Burke *et al.* 2017, Cardenas *et al.* 2016, Castronovo *et al.* 2017, LUBW 2014, Regnery *et al.* 2015, Storck *et al.* 2016, Tran *et al.* 2015, Yang *et al.* 2017) war eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit, weshalb ACE ursprünglich als persistent eingestuft wurde. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ACE schon immer mikrobiell abbaubar war, die Versuchs- oder Betriebsbedingungen in früheren Studien jedoch ungünstig waren und daher kein Abbau beobachtet wurde. In den eigenen Experimenten erwiesen sich ein aerobes Redoxmilieu, mäßige Temperaturen (> 10°C) sowie ein geringer Hintergrund an organischem Kohlenstoff als förderlich für den ACE-Bioabbau. Bis auf eine Ausnahme (Castronovo *et al.* (2017): ACE-Abbau auch im strikt Anoxischen) wurde ACE in Laborstudien ebenfalls nur effektiv entfernt, wenn die zuvor genannten Voraussetzungen erfüllt waren; dies gilt auch bei Berücksichtigung von in Publikation 2 (noch) nicht verwendeter Literatur zum ACE-Abbau in Labor- und Feldversuchen. Eine Gesamtübersicht der betreffenden Studien ist in Tabelle A-5 bis A-7 zusammengefasst. Da sich die Technologie der konventionellen Abwasserbehandlung während der letzten Jahre nicht grundlegend geändert hat, müssten in Kläranlagen schon länger für den ACE-Abbau vorteilhafte Bedingungen auftreten und einige der Kläranlagen, in denen Persistenz von ACE beobachtet wurde, wurden während warmer und somit eigentlich günstiger Perioden beprobt (Buerge *et al.* 2009, Scheurer *et al.* 2011). Das Fehlen geeigneter Randbedingungen als Ursache für die früher berichtete Persistenz von ACE ist daher unwahrscheinlich.

Die in der eigenen Publikation gezeigten experimentellen Daten sowie die einschlägige Literatur lassen vermuten, dass sich erst kürzlich mikrobielle Abbauege für ACE entwickelt bzw. verbreitet haben und daher vermehrt Elimination beobachtet wird. ACE ist ein klassischer anthropogener organischer Spurenstoff, der in kommunalem Abwasser oft vergleichsweise hohe Konzentrationen aufweist (10¹ µg/L; Vgl. z. B. Tabelle A-7, A-8), was die Entwicklung eines katabolen Abbauewegs gefördert haben könnte. Die Entwicklung mikrobieller Abbauege für Xenobiotika wurde bereits häufiger beobachtet (Janssen *et al.* 2005), z. B. für das Herbizid

Atrazin (Devers *et al.* 2008, Shapir *et al.* 2007). ACE scheint jedoch die erste Substanz zu sein, bei der die Entwicklung eines katabolen Abbauweges in Kläranlagen beobachtet wurde.

Der genaue Zeitpunkt der Etablierung eines funktionierenden ACE-Abbauweges ist nicht bekannt, da keine Langzeitmonitoringdaten zum ACE-Gehalt in Zu- und Abläufen von Kläranlagen vorliegen. Die Literatur zur ACE-Entfernung in der Abwasserbehandlung erlaubt jedoch eine Eingrenzung des Zeitraumes. ACE erwies sich 2008, in der allerersten Studie hierzu, in neun schweizerischen Kläranlagen als persistent (Buerge *et al.* 2009). Das gleiche galt 2010 für vier deutsche Anlagen (Scheurer *et al.* 2011). In beiden Studien zeigte jedoch jeweils eine Anlage mäßige ACE-Elimination (60% bzw. 25%). Im Februar und März 2009 wurden Entfernungen von 27% und 41% in zwei deutschen Kläranlagen beobachtet (Scheurer *et al.* 2009). Sechs Baden-Württembergische Anlagen eliminierten 2012/2013 im Jahresmittel 15 – 57% ACE (LUBW 2014). Castronovo *et al.* (2017) berichteten 59 – 97% Entfernung (Median) in 13 deutschen und schweizerischen Anlagen, wobei die Proben vermutlich aus den Jahren 2012 bis 2014 stammen. Diese und in Publikation 2 noch nicht aufgenommene Literaturdaten (Bourgin *et al.* 2018, Funke *et al.* 2015, Nödler *et al.* 2013, Völker *et al.* 2017) lassen vermuten, das sich das ACE-Abbaupotential deutscher und schweizerischer Kläranlagen zwischen 2008 und 2012/13 zu entwickeln begann und dadurch nach 2012 vermehrt auftrat (Vgl. Tabelle A-7).

Die 2016 ermittelten ACE-Konzentrationen im µg/L-Bereich in Mulde und Elbe sowie zwischen 2013 und 2016 stetig abnehmende ACE-Frachten in beiden Flüssen deuten an, dass diese Entwicklung allerdings noch nicht abgeschlossen ist. Es ist zwar möglich, dass der Rückgang der ACE-Frachten durch verminderten ACE-Konsum bedingt war; genaue Verbrauchszahlen waren zur Absicherung nicht zugänglich. Literaturdaten weisen jedoch darauf hin, dass sich der ACE-Konsum zwischen 2013 und 2016 nicht wesentlich verändert hat: Der Pro-Kopf-Verbrauch alkoholfreier *light*-Getränke, unter Europäischen Erwachsenen die Hauptquelle von ACE (Huvaere *et al.* 2012, Le Donne *et al.* 2017, Vin *et al.* 2013), war in Deutschland in den Jahren 2010 und 2016 vergleichbar (Daten der „Wirtschaftsvereinigung Alkoholfreie Getränke e.V.“, Stand Februar 2017) und die in der vorliegenden Studie ermittelten ACE-Gehalte im Zulauf kommunaler Kläranlagen (Deutschland; 10 – 70 µg/L, 2014 – 2017) stimmen zudem gut mit früheren Studien (Deutschland, Schweiz; 8 – 80 µg/L, 2008 – 2014) überein (Buerge *et al.* 2009, Castronovo *et al.* 2017, Scheurer *et al.* 2011). Der Rückgang der ACE-Fracht um 70 – 80% in Elbe und Mulde zwischen 2013 und 2016 sollte folglich eher steigende ACE-Abbaufähigkeit einleitender Kläranlagen als verminderten Konsum widerspiegeln. Absichern ließe sich dies letztlich nur durch Verbrauchszahlen bspw. von Getränke- und Lebensmittelherstellern (aller anliegenden Staaten), wobei bereits grobe Abschätzungen hilfreich sein könnten.

In Deutschland und der Schweiz wurde zuletzt in der biologischen Abwasserbehandlung mindestens während warmer Perioden eine effektive ACE-Entfernung beobachtet (Castronovo *et al.* 2017, Falås *et al.* 2016, LUBW 2014). Es liegen aber auch Befunde aus China (Yang *et al.* 2017) oder Australien (Cardenas *et al.* 2016) vor. Die Proben wurden 2015 bzw. 2012 genommen. Eine in Publikation 2 noch nicht erwähnte Studie berichtet effektive ACE-Entfernung in zwei Kläranlagen in den USA im Jahr 2014 (Jones *et al.* 2017). Ob das nahezu gleichzeitige Auftreten der Fähigkeit zum ACE-Abbau in verschiedenen Regionen der Welt (Vgl. Tabelle A-7) durch eine unabhängige Evolution effektiver Abbauwege oder durch globale Verteilung der Stämme oder Gene erfolgte, müssen zukünftige Studien zeigen.

Die Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzierung aufeinanderfolgender Anreicherungskulturen wiesen darauf hin, dass Organismen der Familie *Phyllobacteriaceae* wahrscheinlich eine Schlüsselrolle im Abbau von ACE zukommt sowie Organismen der Familien *Methylophilaceae* und *Bradyrhizobiaceae* und der Gattung *Pseudomonas* beteiligt sein könnten. Während der Anreicherung dieser Spezies könnten durchaus andere Spezies, die eigentlich auch am ACE-Abbau beteiligt sind, verloren gegangen sein. Allerdings fand in den finalen angereicherten Mischkulturen vollständiger ACE-Umsatz zu SA statt (Fig. S3), sodass zumindest keine Schlüsselenzyme gefehlt zu haben scheinen. Dass keine ACE-abbauenden Reinkulturen gewonnen werden konnten, könnte bedeuten, dass ACE nur durch Zusammenwirken mehrerer Spezies komplett abgebaut werden kann. Verschiedene Spezies könnten entweder verschiedene Abbauschritte durchführen und/oder einige Spezies könnten andere mit notwendigen Kofaktoren versorgen und müssen nicht direkt am Abbau beteiligt sein. Ausgehend von der chemischen Struktur von ACE, scheint der kritische Schritt im Abbau von ACE, wie bereits von Castronovo *et al.* (2017) postuliert, die Öffnung des Ringsystems zu sein. Das resultierende Spaltprodukt mit vier linear angeordneten Kohlenstoffatomen könnte durch existierende Enzymsysteme leicht zugänglich sein und von mehreren Spezies als Kohlenstoffquelle verwendet werden. Denkbar ist, dass es für den kritischen Abbauschritt einer spezialisierten, höchstwahrscheinlich oligotrophen Spezies bedarf. Dies würde erklären, weshalb ACE nur unter kohlenstoffarmen Bedingungen abgebaut wurde und weshalb die Wiederherstellung des ACE-Abbaupotentials in den Feldversuchen mehrere Wochen dauerte.

Folgestudien sollten auf die Aufklärung des Abbauwegs und die Identifizierung involvierter (Schlüssel-) Enzyme abzielen. Zudem sollte untersucht werden, ob es regionale Unterschiede in der Effektivität des Abbaus und dem genauen Abbauweg sowie den beteiligten Spezies und Enzymen gibt. Auf diese Weise könnte nachvollzogen werden, ob sich die Fähigkeit zum ACE-Abbau in verschiedenen Regionen unabhängig voneinander entwickelt hat oder sich womöglich

ausgehend von einem oder wenigen Standorten verbreitet. Hilfreich könnte hierfür auch regelmäßiges Monitoring (ACE, mikrobielle/enzymatische Zusammensetzung) in Anlagen sein, die trotz geeigneter Randbedingungen (noch) keine ACE-Eliminierung aufweisen.

4.2.2. Anreicherung Acesulfam-abbauender Mikroorganismen im Säulenexperiment

Nach erfolgreicher Wiederherstellung messbarer ACE-Abbaufähigkeit der zunächst bzgl. des ACE-Abbaus inaktiven Biomasse aus der Pflanzenkläranlage HAp (s. Publikation 2 in Kapitel 6.2), sollte diese in Folgeversuchen im Säulenexperiment weiter konditioniert und so relevante Mikroorganismen angereichert werden. In der Publikation wurde nur erwähnt, dass in diesen Folgeversuchen die Umsatzgeschwindigkeit von ACE anstieg, die Daten allerdings nicht gezeigt oder explizit diskutiert. Dies soll im Folgenden geschehen.

In jedem der nacheinander durchgeführten Telexperimente wurde ACE-Abbau im Säulenversuch beobachtet. Wie bereits in Publikation 2 (Kapitel 4.2.1) dargestellt, war die ACE-Entfernung zu Beginn vergleichsweise langsam: Im ersten Versuch wurden innerhalb von 47 Tagen weniger als 70% von ca. 150 µg/L ACE-K eliminiert, was einer Eliminationsrate von 2 µg/L-d entspricht (Tabelle 4-2). In den folgenden Experimenten wurde zunächst ein leichter, in den letzten Ansätzen ein sehr starker Anstieg der Umsatzrate beobachtet. Besonders bemerkenswert ist der starke Anstieg der Umsatzrate von 11 µg/L-d in Telexperiment 4 mit 1,26 mg/L ACE-K zu 118 µg/L-d in Telexperiment 5 mit 6,26 mg/L ACE-K. Im letzten Telexperiment wurden schließlich 5 mg/L ACE-K innerhalb von 55 Tagen vollständig entfernt, was einer über 450-mal höheren Umsatzrate (909 µg/L-d) als zu Beginn des Experimentes entspricht.

Durch die regelmäßige Beprobung zur Kontrolle der ACE-Entfernung wurde immer etwas ACE-K aus dem System entfernt. Das Beprobungsvolumen (1 – 5 mL) war im Vergleich zum Volumen der Vorratslösung (300 – 480 mL) gering, durch die lange Laufzeit einiger Experimente war der Volumenverlust durch regelmäßige Beprobungen allerdings merklich. Die Umsatzraten wurden daher nicht als entfernte absolute Menge ACE-K pro Zeiteinheit, sondern Konzentration pro Zeiteinheit berechnet, um alle Experimente untereinander vergleichen zu können. Verluste durch Verdunstung über das offene Vorratsgefäß wurden nicht ausgeglichen, sodass mit der Zeit innerhalb eines jeden Telexperiments eine gewisse Aufkonzentrierung der Vorratslösung eintrat. Bei Experimenten mit langer Laufzeit könnten die berechneten Umsatzraten (Tabelle 4-2) daher die tatsächliche Umsatzgeschwindigkeit etwas unterschätzen. Außerdem wurden die Umsatzraten unter Berücksichtigung der gesamten Laufzeit und aller dabei auftretenden Phasen bakteriellen Wachstums berechnet. Hierzu zählen die Anlaufphase (*engl. lag phase*) mit geringer

Aktivität, die exponentielle Phase mit steigender Aktivität, die stationäre Phase mit größter Aktivität und gegebenenfalls, nach Aufbrauchen des Substrates, die Absterbephase. Die Umsatzrate ist daher als Mittelwert der Geschwindigkeit aller während des Beobachtungszeitraumes auftretenden Phasen des mikrobiellen Wachstums zu verstehen.

Tabelle 4-2. Konfiguration des Säulenversuches mit dem jeweils zum Zeitpunkt t verbleibenden Anteil der initialen Konzentration (c_t/c_0) von Acesulfam-K (ACE-K) und der ermittelten Umsatzrate (nach Formel 4-1, Kapitel 4.1.2).

Matrix (Volumenanteile)	ACE-K ^a ($\mu\text{g/L}$)	t (d)	c_t/c_0 (%)	Umsatzrate ($\mu\text{g/L} \cdot \text{d}$)
Überstand Biomasse-Gewinnung ^b (ÜS)	149	47	37	2,01
2/3 ÜS, 1/3 OECD 301 A Medium ^c (OA)	141	31	50	2,28
1/3 ÜS, 2/3 OA	258	19	63	4,96
1/3 ÜS, 2/3 OA	1258	62	45	11,1
1/3 ÜS, 2/3 OA	6258	53	0,02	118
1/3 ÜS, 2/3 OA	25008	34	0	736
1/3 ÜS, 2/3 OA	50008	55	0	909

^a Summe in Originalmatrix enthaltener (ca. 24 $\mu\text{g/L}$) und zugesetzter Menge ACE-K

^b Originalmatrix

^c Modifizierung: 4,5 g/L statt 22,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Die Säulen-Experimente zeigten, dass die ACE-abbauenden Mikroorganismen in allen Teilversuchen aktiv und die gewählten Versuchsbedingungen für den mikrobiellen Abbau von ACE geeignet waren. Mit Kenntnis der später ermittelten vorteilhaften Bedingungen erscheint dies logisch: Die kritische Temperatur von 10 °C wurde deutlich überschritten, in den ersten Sektionen der Säule und im Vorratsgefäß war gelöster Sauerstoff vorhanden und durch Verwendung von (verdünnter) Originalmatrix (partiell behandeltes Abwasser) waren kaum andere Kohlenstoffquellen als ACE vorhanden. Die mit jedem Teilversuch steigenden Umsatzraten deuten an, dass die mikrobielle Gemeinschaft auf den ACE-Abbau konditioniert wurde, sich mit der Zeit die Anzahl und der Anteil ACE-abbauender Mikroorganismen erhöhte.

Zunächst könnte die Verschiebung der Temperatur in einen geeigneten Bereich maßgeblich für diese Entwicklung gewesen sein: Die Biomasse wurde aus der Pflanzenkläranlage entnommen, als diese keinerlei Abbau-Aktivität zeigte und die Wassertemperatur gerade erst die kritischen 10 °C überschritten hatte. Das Säulenexperiment wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, was das Wachstum und somit die Aktivität der relevanten Mikroorganismen angeregt haben sollte. In späteren Teilversuchen könnte eine zunehmende Selektion der Mikroorganismen durch steigenden Mangel von Kohlenstoffquellen außer ACE sowie eine steigende Zellzahl der ACE-abbauenden Mikroorganismen die größte Rolle bei der Erhöhung der Umsatzraten gespielt haben: Die Originalmatrix (HAp, 50% Länge; Vgl. Fig. 3a in Publikation 2 in Kapitel 6.2) enthielt bereits wenig abbaubaren Kohlenstoff und in den späteren Teilversuchen stand der Biomasse

durch Verdünnung mit Mineralmedium noch weniger zur Verfügung. Nach der langen Betriebszeit wurden wahrscheinlich auch nahezu alle möglicherweise noch im Schlamm des Festbetts (initiale Biomasse aus der Pflanzenkläranlage) vorhandenen verwertbaren Kohlenstoffquellen aufgebraucht, sodass nur ACE (und gegebenenfalls dessen Zwischenprodukte) zur Verfügung stand(en). Entsprechend hätten bevorzugt oder ausschließlich am ACE-Abbau (direkt oder indirekt) beteiligte Mikroorganismen wachsen können und deren relativer Anteil an der mikrobiellen Gemeinschaft hätte sich erhöht. Die stete Fütterung mit ACE sollte zudem dafür gesorgt haben, dass diese Organismen fortwährend wachsen, eine höhere absolute Zellzahl erreichen und dadurch der ACE-Umsatz steigt.

Insgesamt zeigte das Säulenexperiment, dass die Anreicherung der ACE-abbauenden Mikroorganismen unter Laborbedingungen möglich ist. Für weitergehende Untersuchungen, vor allem zur Identifikation relevanter mikrobieller Spezies und ursprünglich auch zur Identifikation von Transformationsprodukten, wies der Säulenversuch einige Schwächen auf: Zum einen war nicht sicher, ob mit dem gewählten Säulenaufbau homogene Bedingungen im gesamten System gewährleistet werden können. Obwohl die verwendete Säule nur kleine Ausmaße besaß (300 mL-Tropftrichter), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine Zonierung hinsichtlich der Redoxbedingungen durch schnellen Sauerstoffverbrauch in den ersten Zonen auftreten würde, wie es bspw. Burke *et al.* (2014) (ca. 6 L-Säule) beobachteten. Vorkommen und Wachstum der relevanten Organismen könnten in diesem Fall auf einen kleinen Bereich der Säule beschränkt sein, während in anderen Bereichen Gemeinschaften anderer Zusammensetzung dominieren. Die Identifizierung der ACE-abbauenden Organismen würde so erschwert. In Flüssigkulturen können hingegen homogene Bedingungen etabliert werden. Zum anderen sind Flüssigkulturen leichter zu handhaben als der Säulen-Versuch und durch die standardmäßig durchgeführten Überimpfungsschritte werden sowohl Matrixbestandteile als auch irrelevante Mikroorganismen (schneller) ausverdünnt. Im Säulenversuch würde zwar regelmäßig die Vorratslösung erneuert und alle enthaltenen Organismen und Verbindungen entfernt. Im Festbett zurückgehaltene, z. B. anhaftende, Mikroorganismen würden jedoch nicht entfernt, da das Festbett nie erneuert würde. Durch das Fehlen sichtbaren Schlammes und der enthaltenen Verbindungen ist die Matrix in Flüssigkulturen zudem weniger komplex, was die Detektion und Identifizierung von Transformationsprodukten im Kulturüberstand vereinfachen sollte. Die Säulenexperimente wurden demzufolge zugunsten der klassischen mikrobiologischen Methoden eingestellt.

4.2.3. Abbau in definierten Mischkulturen

In den Publikation 2 zugrunde liegenden Experimenten konnten keine ACE-abbauenden Reinkulturen gewonnen werden, weshalb vermutet wurde, dass mehrere Spezies am Abbau beteiligt sind und sich gegenseitig beeinflussen (Kapitel 4.2.1 und 6.2). Um Untersuchungen zu auftretenden (intra- oder extrazellulären) Zwischenprodukten sowie relevanten Enzyme beim ACE-Abbau oder zur Identifizierung und physiologischen Charakterisierung beteiligter Spezies durchführen zu können, war die mikrobielle Gemeinschaft jedoch selbst in den letzten Anreicherungskulturen noch zu divers und undefiniert bzgl. aller vorhandener Spezies (A – C, a – c; s. Fig. 4 aus Publikation 2 in Kapitel 6.2). Zur Verringerung dieser Diversität und Erleichterung möglicher im Anschluss an die vorliegende Arbeit stattfindende Studien wurden Mischkulturen definierter Zusammensetzung hergestellt (4.1.3).

Nach den ersten Schritten hierzu, der Vereinzelung auf Agar-Platten und der Gen-Sequenzierung der 10 bzw. 11 erhaltenen Isolate aus Kultur B und b (Tabelle 4-1), ließ sich überraschenderweise kein Isolat der Familie *Pseudomonadaceae* zuordnen. Der prozentuale Anteil dieser Familie an den Sequenzen der Flüssigkulturen B und b war ursprünglich sehr hoch (27% und 62%; s. Tab. S8 in SI von Publikation 2 in Kapitel 6.2). Ebenso wurde aus Kultur B kein Isolat der Familie *Phyllobacteriaceae* gewonnen, trotz des ursprünglichen relativen Anteils von 50% an allen Sequenzen (Tab. S8 in SI von Publikation). Mögliche Ursachen könnten geringes Wachstum der beiden Familien auf R2A-Agar oder das Übersehen entsprechender Kolonien bei der Vereinzelung aufgrund ähnlichen Phänotyps wie andere Spezies sein. Die Kulturen B und b wurden außerdem nach den Experimenten zur Identifizierung in Publikation 2 mehrfach überimpft, sodass sich *Pseudomonadaceae* inzwischen abgereichert haben könnten. Gen-Sequenzierungen derjenigen Flüssigkulturen B und b, welche zur Vereinzelung der Klone (Tabelle 4-1, Kapitel 4.1.3) verwendet wurden oder derjenigen nach weiteren Passagen könnten klären helfen, ob *Pseudomonadaceae* tatsächlich in geringeren relativen Anteilen auftraten. Sollte dies nicht zutreffen, könnte das Ausstreichen von Kultur B und b sowie das Vereinzeln der Kolonien auf anderen Festmedien, die das Wachstum von *Pseudomonadaceae* begünstigen, versucht werden.

In den aus vereinzelt Klonen hergestellten Mischkulturen definierter Zusammensetzung (Tabelle 4-1, Kapitel 4.1.3) unterschied sich die Effektivität des ACE-Abbaus und der Bildung von SA zum Teil deutlich (Tabelle 4-3). Die initialen Mischkulturen (Originalkulturen) zeigten sichtbares Wachstum (Trübung) sowie vollständigen Umsatz von ACE. Ausnahme waren dabei der Mix *Phyllobacteriaceae* mit *Bradyrhizobiaceae* (P-Br) und die Reinkultur *Phyllobacteriaceae* (P). In diesen Kulturen war kein Wachstum zu beobachten und die ACE-Entfernung war

unerheblich (< 30%), was durch die Abwesenheit von SA bestätigt wurde (< 1% Ausbeute). Von den Originalkulturen zeigte rein rechnerisch nur Mix Min (*Bosea*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*) quantitativen Umsatz von ACE zu SA. Nicht-quantitative Ausbeuten von SA (69 – 82%) in Mix B (*Sphingopyxis*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae*, *Enhydrobacter*, *Bosea*), Mix b (*Bosea*, *Rhodanobacter*, *Phyllobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae*), P-Bo (*Phyllobacteriaceae*, *Bosea*) und P-M (*Phyllobacteriaceae*, *Microbacterium*) trotz kompletter ACE-Entfernung sind vermutlich der Verwendung einheitlicher Faktoren zur Beschreibung der Aufkonzentrierung (via Verdunstung) geschuldet. Dass ACE zwar vollständig aufgenommen wurde, geringe Anteile aber noch nicht mineralisiert wurden und SA noch nicht vollständig ausgeschleust wurde, wäre ebenfalls denkbar. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, hätten Verdunstungsverluste der Kulturen ausgeglichen werden müssen (Addition Reinstwasser), damit Konzentrationen von ACE und SA ohne Einbeziehung eines nicht zwingend allgemeingültigen Korrekturfaktors verglichen werden können. Die durchgeführten Versuche sollten jedoch nur anzeigen, ob bestimmte Kombinationen ACE-Abbauaktivität zeigen und prinzipiell auch SA bilden.

Tabelle 4-3. Aufbereitete Analysenergebnisse bzgl. Acesulfam-K (ACE-K) und Amidosulfonsäure (SA) in definierten Mischkulturen (1 g/L ACE-K) inkl. der Inkubationszeit t , dem ermittelten Aufkonzentrierungsfaktor α , dem nach der Inkubationszeit entfernten Anteil von ACE, der gebildeten Menge SA sowie der Ausbeute von SA nach der Inkubation, bezogen auf die bei vollständigem Umsatz von ACE maximal mögliche Konzentration von SA (Formel 4-3, Kapitel 4.1.3).

Probe	Laufzeit t (d)	α	Entfernung ACE-K (%)	SA, gebildet (mg/L)	Ausbeute SA (%)
Originalkulturen					
Mix B	14	2,19	100	329	68
Mix b	14	2,19	100	333	69
Mix Min	14	2,19	100	460	95
P	10	1,83	29	-	-
P-Bo	10	1,83	100	397	82
P-M	10	1,83	100	372	77
P-Br	10	1,83	22	-	-
verdünnte Kulturen					
Mix B	10	1,52	19	-	-
Mix b	10	1,52	100	389	81
Mix Min	10	1,52	100	519	108
P	7	1,34	10	0,02	0
P-Bo	7	1,34	36	209	43
P-M	7	1,34	13	117	24
P-Br	7	1,34	12	-	-

In den verdünnten Mischkulturen ließen sich deutliche Abstufungen in der ACE-Entfernungsleistung erkennen (Tabelle 4-3): In Mix b und Mix Min wurde ACE offenbar vollständig abgebaut und zu SA umgesetzt. Geringer (10% – 40%), aber anhand der berechneten Werte scheinbar stöchiometrischer Umsatz von ACE zu SA wurde in den Kulturen P-Bo und P-M beobachtet. Ebenso wie in den Originalkulturen fand in den verdünnten Kulturen von P und P-Br nur vernachlässigbarer ACE-Abbau statt und es wurde keine SA gebildet. Mix B zeigte ebenfalls geringe ACE-Abbauaktivität (< 20%), was angesichts des kompletten Abbaus in der Originalkultur überraschte. Außerdem konnte in dieser Kultur keine SA detektiert werden. Bis auf diese Ausnahme passen die Ergebnisse der verdünnten Kulturen gut mit denen der Originalkultur zusammen: Mischkulturen, die sich im ersten Ansatz (Originalkulturen) als aktiv erwiesen, zeigten auch in verdünnter Variante Abbau. Dass die Effizienz in letzteren teilweise niedriger ausfiel, war angesichts der geringeren initialen Zelldichte und kürzeren Inkubationszeit nicht überraschend. Anhand der verdünnten Kulturen wurde ersichtlich, dass einige Kombinationen der verwendeten Isolate eine höhere Umsatzrate (Aktivität) aufweisen als andere. Besonders effektiv war die Kombination von Isolaten der Gattungen bzw. Familien *Bosea*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae* und *Phyllobacteriaceae* (Mix Min). Die Kombination dieser Isolate mit solchen der Gattungen *Rhodanobacter*, *Rhodococcus* und *Staphylococcus* (Mix b) erwies sich ebenfalls als sehr effektiv im ACE-Abbau.

Anhand der Ergebnisse (Anreicherungsmuster) in Publikation 2 (s. Kapitel 4.2.1 und 6.2) wurde vermutet, dass *Phyllobacteriaceae* eine Schlüsselrolle in der Transformation von ACE zukommt. Die inkludierten Spezies dieser Familie scheinen für den ACE-Abbau allerdings nicht obligatorisch und zu diesem nicht allein befähigt: Die untersuchte Reinkultur (P) zeigte keinerlei Abbau-Aktivität und in Mix B wurde (bei hoher Zelldichte) Abbau beobachtet, obwohl diese Kultur keine *Phyllobacteriaceae*-Spezies enthielt. Kulturen, die Spezies der Familie *Bradyrhizobiaceae* enthielten, waren in der ACE-Entfernung am effektivsten, was in den verdünnten Kulturen am besten ersichtlich ist: Mix b und Mix Min enthielten jeweils zwei Spezies der Familie *Bradyrhizobiaceae* (eine Spezies der Gattung *Bosea* und eine nicht eindeutig zugeordnete, mit *Rhodopseudomonas* verwandte Spezies) und entfernten ACE quantitativ. Die nächst effektivere Kultur (36% ACE-Entfernung, 43% SA-Ausbeute) war P-Bo, welche eine Spezies der Gattung *Bosea* enthielt. *Bradyrhizobiaceae* wurden auch in Publikation 2 als höchstwahrscheinlich in den ACE-Abbau involvierte Gruppe vermutet, da sie sich ebenso wie *Phyllobacteriaceae* anreicherten (s. Kapitel 4.2.1 und 6.2). Die Ergebnisse aus den Versuchen mit definierten Mischkulturen deuten an, dass deren Bedeutung größer sein könnte, als zunächst (in Publikation 2) vermutet.

Die Ergebnisse der Mischkultur-Versuche scheinen zu bestätigen, dass der effektive ACE-Abbau die Anwesenheit von mindestens zwei Spezies erfordert. Es wäre in der Folge allerdings zu prüfen, ob Reinkulturen der anderen vereinzelt Spezies, vor allem von *Bosea*, *Rhodopseudomonas* und *Microbacterium* zum alleinigen ACE-Abbau befähigt sind; alle Mischkulturen, in denen mindestens ein Vertreter präsent war, zeigten ACE-Elimination und Umsatz zu SA. Sollten eine oder mehrere Reinkulturen den ACE-Gehalt verringern, müsste durch Analysen von TOC oder DOC sowie SA noch abgesichert werden, ob die betreffende(n) Spezies ACE komplett mineralisieren. In den gezeigten Ergebnissen scheint sich anzudeuten, dass der Abbau in einer diverseren Kultur effektiver ist als in einer binären Mischung.

Würde in Reinkulturen der isolierten Klone keine Verringerung des ACE-Gehalts beobachtet, könnte dies bedeuten, dass sie nicht am ACE-Abbau bzw. dessen frühen Stadien beteiligt sind oder dass sie ACE bzw. dessen erste Transformationsprodukte nicht als Kohlenstoffquelle nutzen (können). In beiden Fällen träte kein Wachstum und in Letzterem, wenn überhaupt, nur Umsatz sehr geringer Mengen ACE auf. Nicht abbauenden Reinkulturen könnten daher neben ACE eine für die jeweilige Spezies geeignete Kohlenstoffquelle, z. B. ein einfaches Stoffwechselzwischenprodukt wie Succinat oder Pyruvat, als Wachstumssubstrat zur Verfügung gestellt und dann erneut auf ACE-Abbauaktivität geprüft werden. Sollten diese Reinkulturen den ACE-Gehalt verringern, wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass die jeweiligen Spezies den oder die ersten kritischen Schritte im ACE-Abbau vollziehen. Im Überstand könnten dann vermutlich auch die entsprechenden (ersten) Transformationsprodukte identifiziert werden, was einen wichtigen Schritt in der Aufklärung des Abbauweges darstellen würde.

Generell ist bei den durchgeführten Versuchen zu beachten, dass nicht alle am ACE-Abbau beteiligten Spezies gefunden worden sein müssen. Während der gesamten Anreicherung sowie auch beim Vereinzeln von Kolonien aus den Kulturen B und b können eigentlich relevante Spezies diskriminiert worden sein. Um einen (ersten) Abbauweg für ACE inkl. der Zwischenprodukte und beteiligten Enzyme aufklären zu können, ist dies zunächst auch nicht zwingend notwendig. Um später gegebenenfalls diskriminierte Spezies zu identifizieren, könnten erneut Anreicherungen aus Biomasse der Pflanzenkläranlage erfolgen, wobei andere Bedingungen, z. B. hinsichtlich des Redoxmilieus oder Kulturmediums, gewählt werden könnten.

Vor allem aufgrund der Möglichkeit horizontalen Gentransfers müssen die in der vorliegenden Arbeit über mehrere Jahre angereicherten, letztlich identifizierten bzw. daneben vorhandenen Organismen nicht zwangsläufig dieselben sein, welche ursprünglich in der Pflanzenkläranlage für den ACE-Abbau verantwortlich waren. Die Identifikation sowie physiologische Beschreibung der angereicherten, für den ACE-Abbau essentiellen Mikroorganismen stellen daher nur erste

Arbeiten auf dem Weg zur Aufklärung des Metabolismus dar. Im nächsten Schritt sollte der Weg des mikrobiellen Abbaus von ACE geklärt werden. Bekannt ist, dass SA einziges stabiles, in quantitativen Mengen gebildetes (End-) Produkt ist und die organische Fraktion von ACE mineralisiert bzw. aufgenommen wird (Castronovo *et al.* 2017). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, der konkrete Abbauweg ist jedoch noch immer unbekannt. Als wahrscheinlichsten Abbauweg postulierten Castronovo *et al.* (2017) die Ringöffnung (Hydrolyse) von ACE an der Amidfunktion (Abbildung 4-2).

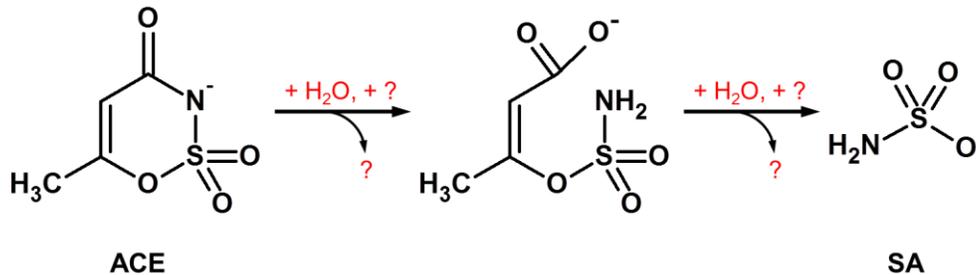


Abbildung 4-2. Postulierter, schematischer Abbauweg von Acesulfam (ACE), modifiziert nach Castronovo *et al.* (2017). Bedingungen, Anzahl und Art der Transformationschritte vor Ringöffnung von ACE bzw. Bildung des stabilen Endproduktes Amidosulfonsäure (SA) sind bisher nicht bekannt und sind durch ein Fragezeichen symbolisiert.

Welche Transformationsreaktionen gegebenenfalls zuvor oder danach bis zur Stufe des finalen Produktes SA erfolgen, könnte durch Identifikation von Transformationsprodukten aus Zellkulturen erfolgen: Sollten mehrere Spezies am Abbau von ACE beteiligt sein, müsste mindestens ein Transformationsprodukt zwischen den Spezies ausgetauscht werden. Dieses könnte sich im Überstand einer definierten Mischkultur der beteiligten Spezies oder einer Reinkultur der freisetzenen Spezies (wie oben besprochen, gegebenenfalls mit hoher Zelldichte) finden lassen. Zur Identifikation der Zwischenprodukte wäre der Einsatz hochauflösender MS zweckdienlich. Sie erlaubt die Ermittlung exakter Massen der (Fragmente der) Transformationsprodukte sowie Berechnung von Summenformeln und gegebenenfalls auch Rückschlüsse auf die Molekülstruktur durch typische Molekülfragmente, die während der Ionisation abgespalten werden. In intrazellulärer Matrix (der beteiligten Organismen) nach ACE-Transformationsprodukten zu suchen, könnte zur vollständigen Aufklärung des ACE-Metabolismus notwendig werden, besonders für den Fall dass Einzelspezies ACE komplett und eigenständig abbauen.

Im nächsten Schritt sollten die am ACE-Abbau beteiligten Enzyme sowie die kodierenden Gene identifiziert werden. Dies könnte Hinweise darauf liefern, aus welchen Enzymen sich die neuen Schlüsselenzyme entwickelt haben und gegebenenfalls auch, was die ursprünglichen Substrate

sind. Die Analyse von charakteristischen Marker-Genen für den ACE-Abbau könnte außerdem dabei helfen, die Verbreitung der ACE-Abbaufähigkeit in anderen Anlagen und in der Umwelt zu verfolgen. Denkbar wäre auch zu untersuchen, ob verschiedene ACE-abbauende mikrobielle Gemeinschaften über dieselbe genetische Ausstattung, zugänglich ebenfalls über Marker-Gene, zum Abbau verfügen oder sich verschiedene Strategien und somit Enzyme (Gene) parallel entwickelt haben.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die dezentrale Behandlung in Kleinkläranlagen, bspw. häufig in Pflanzenkläranlagen, ist in manchen Regionen die einzige wirtschaftliche Option zur Abwasseraufbereitung. Im Vergleich zu großen, zentralen Kläranlagen werden nur geringe Volumina behandelten Abwassers in die Umwelt eingeleitet und entsprechend in der aquatischen Umwelt stärker verdünnt. Kleinkläranlagen dürfen lt. Abwasserverordnung daher einen geringeren Reinigungsgrad bzgl. konventioneller Schad- und Schmutzstoffe sowie der sauerstoffzehrenden Eigenschaften des Abwassers aufweisen. Anthropogene Spurenstoffe, welche in geringen Konzentrationen auftreten und gegebenenfalls trotzdem bereits negative Effekte hervorrufen können, werden nicht berücksichtigt. Nur für einige, besonders besorgniserregende, Vertreter (prioritäre Stoffe) sind in (Anhang X) der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie Umweltqualitätsnormen festgelegt. Um der Akkumulation und dem Erreichen wirksamer Konzentrationen, gegebenenfalls durch Mischungseffekte, vorzubeugen, sollten Abwasserbehandlungsverfahren jedoch eine Vielzahl anthropogener Spurenstoffe möglichst effektiv entfernen.

Um dies einschätzen zu können, muss zunächst aus der Fülle möglicher im Abwasser auftretender Spurenstoffe eine sinnvolle Auswahl getroffen werden. Als repräsentative Vertretersubstanzen für kommunales Abwasser wurden in der vorliegenden Arbeit sieben Substanzen ausgewählt. Aufgrund deren bekannten Bioabbauverhaltens unter verschiedenen Redoxbedingungen dienten diese als Prozessindikatoren für biologischen Abbau. Zur Quantifizierung in Zulauf- und Ablaufproben wurde eine HPLC-MS/MS-Methode entwickelt und etabliert. Diese erlaubte, bei den üblichen Zulaufgehalten der Indikatoren theoretisch konzentrationsbasierte Eliminationen von mindestens 90% sicher zu erfassen.

Mittels dieser Methode wurde die Entfernung anthropogener Spurenstoffe erstmals engmaschig über ein komplettes Jahr, in parallel betriebenen Pflanzenkläranlagen bzw. Bodenfiltern (Pilot-Maßstab) verschiedenen Intensivierungsgrades, beschickt mit realem Abwasser, verfolgt. Die Untersuchungen wurden von Analysen konventioneller Abwasserparameter begleitet. Neben der Einschätzung der generellen Reinigungsleistung konnten dadurch auch für den Abbau der

ausgewählten Substanzen förderliche (Betriebs-) Bedingungen aufgeklärt werden. Es bestätigte sich, dass sich ein hoher Intensivierungsgrad positiv auf die Elimination (aerob abbaubarer) Spurenstoffe auswirkt. Die untersuchten Anlagen höchster Intensivierung, die aktiv belüfteten Systeme, erwiesen sich über den Jahresverlauf als robust in der Performance, als resilient gegenüber einer simulierten Havarie und in der Entfernung aerob bioabbaubarer Spurenstoffe als konventionellen Kläranlagen ebenbürtig. Zur Entfernung aller potentiell schädlichen Substanzen bedarf es allerdings spezieller Techniken, wie sie bspw. aktuell im Rahmen der „vierten Reinigungsstufe“ erforscht werden.

Die Datenlage bzgl. der Verringerung der (Öko-) Toxizität des Abwassers in Kleinkläranlagen oder (potentieller) Risiken des Ablauf für Mensch und Umwelt ist bisher unzureichend. Erste Ergebnisse der erforderlichen, aufwendigen Untersuchungen deuten jedoch an, dass biologische Effekte, z. B. östrogene Aktivität, durch Pflanzenkläranlagen deutlich verringert werden können (Nivala *et al.* 2018b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie publizierter Übersichtsarbeiten zeigen, dass Pflanzenkläranlagen die Fracht vieler in kommunalem Abwasser enthaltenen Stoffe inkl. anthropogener Spurenstoffe merklich reduzieren können. Sie leisten einen Beitrag zur Verringerung der Freisetzung potentieller Schadstoffe in die Umwelt und senken somit das Risiko negativer Effekte auf Mensch und Umwelt ausgehend von Abwasser.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bioabbaubarkeit von Acesulfam näher untersucht. Seit der erstmaligen Detektion in der Umwelt wurde dieser Süßstoff wiederholt als persistent charakterisiert. Seit 2014 wurde in Labor- sowie Feldstudien jedoch vermehrt von partieller oder vollständiger biologischer Abbaubarkeit berichtet. Deutlich verminderte Ablaufkonzentrationen von Acesulfam in nahezu allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenkläranlagen, Bodenfiltern und konventionellen Kläranlagen ließen vermuten, dass die Entfernung von Acesulfam in der Abwasserbehandlung inzwischen verbreitet ist. Stetig abnehmende Acesulfam-Frachten (2013 – 2016) in zwei deutschen Flüssen mit relevantem Eintrag behandelten kommunalen Abwassers waren ein weiterer Hinweis hierauf.

In Laborversuchen konnte letztlich nachgewiesen werden, dass Acesulfam tatsächlich biologisch abgebaut wird, wie kurz zuvor auch von Castronovo *et al.* (2017) berichtet. Aus den Feldstudien ließen sich hierfür vorteilhafte Bedingungen ableiten. Diese herrschten oft auch in Studien vor, welche Persistenz beobachteten. Die mikrobiellen Gemeinschaft(en) scheint diese (Abbau-) Fähigkeit demnach erst in jüngster Zeit entwickelt zu haben. Durch Laborstudien wurde die Mineralisation von Acesulfam bestätigt. Es konnte zudem erstmalig gezeigt werden, dass Acesulfam dabei katabolisch abgebaut wird, also als alleinige Kohlenstoffquelle dienen kann.

Erstmals konnten auch Mikroorganismen isoliert und identifiziert werden, welche in den Abbau von Acesulfam involviert sind.

Auf welchem Weg Acesulfam transformiert wird und welche genetische Ausstattung für den Abbau erforderlich ist, wurde bisher nicht aufgeklärt. Es ist jedoch denkbar, dass bereits durch Veränderung eines Genes und des kodierten Enzyms ein kritischer Schritt im Abbau ermöglicht wurde, dessen bisheriges Fehlen zur Persistenz von Acesulfam führte. Bei diesem kritischen Schritt könnte es sich um die Öffnung des Heterozyklus handeln. Rein aus der Struktur von Acesulfam scheint das Produkt dieser Ringöffnung dann leicht abbaubar, da es Ähnlichkeiten zu üblichen Substraten aufweist. Die Adaptation mikrobieller Gemeinschaften an Xenobiotika wurde bereits mehrfach beobachtet, jedoch scheint Acesulfam das erste Beispiel für eine solche Entwicklung in Kläranlagen zu sein.

Das Verhalten von ACE in der Umwelt sollte in Zukunft weiter beobachtet werden, um einen Einblick in die Verbreitung neu entwickelter Abbaufähigkeiten unter Mikroorganismen zu gewinnen. Zum ACE-Abbau befähigte Mikroorganismen könnten sich auch in anderen Umweltkompartimenten, welche steten ACE-Eintrag und geeignete Randbedingungen aufweisen, etablieren. Diese Entwicklung könnte durch im Vergleich zu Rohabwasser geringere Konzentrationen zwar verzögert werden, würde jedoch das Wissen über die Ausbreitung neuer katabolischer Abbauege in der Umwelt weiter vertiefen. Bspw. ist denkbar, dass ACE-abbauende Mikroorganismen aus Kläranlagen in Fließ- sowie Stillgewässer eingetragen werden und sich dort etablieren könnten. Sollten in Stillgewässern wie großen Seen oder Binnenmeeren in den nächsten Jahren sinkende ACE-Konzentration festgestellt werden, könnte im Anschluss die Anwesenheit bereits bekannter ACE-Abbauender Spezies (oder Enzyme) geprüft werden, um zu klären, ob dies allein auf sinkende Einträge oder (auch) auf das Vorkommen und die Aktivität ACE-abbauender Mikroorganismen zurückzuführen ist.

Generell zeigte sich, dass mittels biologischer Abwasserreinigung, auch in Kleinkläranlagen wie Bodenfiltern und Pflanzenkläranlagen, viele anthropogene Spurenstoffe effektiv entfernt werden können. Die Befunde zu Acesulfam deuten zudem an, dass die biologische Abwasserreinigung im Laufe der Zeit durch Adaptationsprozesse der mikrobiellen Gemeinschaft effektiver werden kann. Eine restlose Entfernung aller potentiellen Schadstoffe ist indes mit rein biologischen Methoden nicht möglich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dennoch, dass durch den Einsatz der (meisten) untersuchten Pflanzenkläranlagen- bzw. Bodenfiltertypen als dezentrale Abwasserreinigung ein bedeutender Beitrag zum Schutz der Wasserressourcen vor dem Eintrag von (potentiellen) Schadstoffen geleistet werden kann.

6. Originalarbeiten

6.1. Publikation 1

Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators

Stefanie Kahl, Jaime Nivala, Manfred van Afferden, Roland A. Müller, Thorsten Reemtsma

Water Research, **2017**, 125, 490-500

Der Artikel ist abrufbar unter:

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.004>

Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Idee zur Durchführung der Monitoring-Studie, die erforderliche System- und Analytauswahl erfolgte in Zusammenarbeit mit allen Autoren. Die Proben der Kleinkläranlagen bzw. der konventionellen kommunalen Kläranlage sowie die konventionellen Abwasserparameter wurden durch das Team des Umwelt- und Biotechnologischen Zentrums (UBZ) bzw. des Abwasserzweckverbandes Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die in der Publikation beschriebene Analysenmethode wurde von mir entwickelt und validiert. Die Analyse der Proben wurde von mir, mit Unterstützung durch Gabriele Strenge, durchgeführt. Die Auswertung und Interpretation aller Parameter erfolgte durch mich. Die Idee zum Manuskript entstand in Kooperation aller Autoren. Als Erstautorin habe ich das Manuskript erstellt. Prof. Dr. Thorsten Reemtsma und Dr. Jaime Nivala waren an der Diskussion der Ergebnisse, der Strukturierung und der Formulierung beteiligt.



Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators



Stefanie Kahl^a, Jaime Nivala^b, Manfred van Afferden^b, Roland A. Müller^b, Thorsten Reemtsma^{a,*}

^a Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

^b Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Centre for Environmental Biotechnology (UBZ), Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 June 2017
Received in revised form
28 August 2017
Accepted 1 September 2017
Available online 5 September 2017

Keywords:

Constructed wetland
Domestic wastewater
Intensification
Micropollutants
Reciprocating wetland
Seasonality

ABSTRACT

Six pilot-scale subsurface flow treatment wetlands loaded with primary treated municipal wastewater were monitored over one year for classical wastewater parameters and a set of emerging organic compounds (EOCs) serving as process indicators for biodegradation: caffeine, ibuprofen, naproxen, benzotriazole, diclofenac, acesulfame, and carbamazepine. The wetland technologies investigated included conventional horizontal flow, unsaturated vertical flow (single and two-stage), horizontal flow with aeration, vertical flow with aeration, and reciprocating. Treatment efficiency for classical wastewater parameters and EOCs generally increased with increasing design complexity and dissolved oxygen concentrations. The two aerated wetlands and the two-stage vertical flow system showed the highest EOC removal, and the best performance in warm season and most robust performance in the cold season. These three systems performed better than the adjacent conventional WWTP with respect to EOC removal. Acesulfame was observed to be removed (>90%) by intensified wetland systems and with use of a tertiary treatment sand filter during the warm season. Elevated temperature and high oxygen content (aerobic conditions) proved beneficial for EOC removal. For EOCs of moderate to low biodegradability, the co-occurrence of aerobic conditions and low content of readily available carbon appears essential for efficient removal. Such conditions occurred in the aerated systems and with use of a tertiary treatment sand filter.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Treatment wetlands are suitable wastewater treatment systems for regions of low population density, where centralized sewer networks and conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not economical. Treatment wetlands utilize complex natural processes, including biodegradation, sorption, filtration, sedimentation, and plant uptake for the removal of wastewater constituents. They can offer robust, cost-effective treatment, and typically require less operation and maintenance effort than other decentralized wastewater treatment technologies (Kadlec and Wallace, 2009; Vymazal, 2011). Moreover, treatment wetlands can be constructed using local materials. Treatment wetland designs range

from conventional horizontal flow (HF) and vertical flow (VF) systems, which can be designed to operate without external energy inputs, to intensified systems, such as aerated, reciprocating, or hybrid systems (Vymazal, 2007; Kadlec and Wallace, 2009). Treatment wetlands are capable of efficiently removing conventional pollutants and meeting secondary treatment standards for municipal wastewater treatment (Kadlec and Wallace, 2009).

In the last decade, removal of Emerging Organic Contaminants (EOCs) has gained attention in the field of wastewater treatment. These anthropogenic compounds include pharmaceuticals, personal care products, pesticides, industrial chemicals, and their respective transformation products. EOCs are present in many compartments of the aquatic environment (Reemtsma et al., 2006; Luo et al., 2014). Although they normally occur only in trace concentrations (ng/L to µg/L range), there is concern about the possible adverse effects of continuous release of EOCs into the environment. This is especially true for polar compounds, as they are highly

* Corresponding author.

E-mail address: thorsten.reemtsma@ufz.de (T. Reemtsma).

mobile in the aquatic environment and are not removed via sorption processes. In order to reduce the impact of the discharge on the surrounding environment wastewater treatment technologies should be able to remove EOCs in addition to conventional wastewater pollutants (Schwarzenbach et al., 2006).

EOC removal in treatment wetlands is influenced by wetland design, influent composition, and climate (Li et al., 2014; Verlicchi and Zambello, 2014). Environmental conditions (e.g. air temperature, precipitation) affect operational conditions such as water temperature, plant growth, or oxygen solubility and accordingly redox potential (Kadlec and Wallace, 2009). The impact of season on treatment wetland performance has been investigated in several studies in temperate European climates, normally via sampling for a limited time in summer and winter seasons (Hijosa-Valsero et al., 2010; Matamoros and Salvadó, 2012; Rühlmann et al., 2015). In order to better evaluate treatment performance and system robustness, it is essential to gather year-round data.

Studies on EOC removal in treatment wetlands mostly investigate pharmaceutical removal (Li et al., 2014; Verlicchi and Zambello, 2014). However, year-round monitoring requires extensive, frequent sampling, which is labor intensive and costly. The use of so-called “indicator compounds” (Jekel et al., 2015) is a reasonable approach to reduce the monitoring effort. These indicators can be used as proxies for other chemicals of comparable behavior, e.g. in terms of biodegradability and sorption tendency. A careful selection of indicator compounds therefore allows analyzing a limited set of EOCs, but generating information valid for a much larger number of EOCs, and obtaining a thorough evaluation of the system performance throughout the year.

The objective of the present study was to assess the removal of conventional pollutants and EOCs in six subsurface flow treatment wetland systems of different designs over the course of an entire year via weekly sampling and use of carefully selected indicator compounds. The pilot-scale systems were loaded with primary treated real municipal wastewater. Classical wastewater parameters and a set of seven indicator EOCs were monitored. The following questions were to be answered:

- How does treatment wetland design affect the extent of EOC removal?
- How does EOC treatment performance vary between warm and cold seasons?
- Can EOC removal be correlated with operational conditions?

2. Materials and methods

2.1. Site description

The Langenreichenbach Ecotechnology Research Facility is located northeast of Leipzig, Germany in the village of Langenreichenbach (51.5°N, 12.9°E). It shares the raw wastewater with the adjacent municipal WWTP (population equivalent 16,000 PE). Municipal wastewater is collected from the surrounding communities by a mostly separated sewer system. The conventional, municipal WWTP next to the research facility involves anaerobic and aerobic activated sludge treatment, including biological and chemical phosphorous precipitation. Median inflow rate was 1163 m³/d (n = 51).

The research facility contains conventional and intensified pilot-scale subsurface flow treatment wetlands (Nivala et al., 2013a). A septic tank provides primary treatment of raw wastewater with a hydraulic residence time (HRT) of two days. Inflow to the septic tank was constant throughout the study. The septic tank effluent served as the influent to all treatment wetlands with constant daily

flow.

Monitoring was conducted on three conventional (including a tertiary sand filter) and three intensified treatment wetlands (Table 1). The pilot systems included a horizontal flow (HF) design of 50 cm depth (H50p) and an unsaturated treatment wetland system with vertical flow (VGp). The study also investigated one two-stage wetland system, which consisted of VGp followed by an unsaturated sand filter (VGp + VSp). Intensified designs included a horizontal flow wetland with active aeration (HAp), a vertical flow wetland with active aeration (VAp), and a two-cell reciprocating system (R). All systems except the reciprocating system were planted with *Phragmites australis*. The treatment wetlands were commissioned in 2010 and had been in steady-state operation for 5 years at the time this study began. For a comprehensive description of the research facility and each treatment wetland design, the reader is referred to Nivala et al. (2013a). Temperature and rainfall data was collected by an automated onsite weather station and are summarized in Table S1.

2.2. Experimental methods

2.2.1. Chemicals and standards

Ultrapure water was obtained from a Merck MilliQ Integral 5 system (Merck, Darmstadt, Germany). Methanol and acetic acid of ULC/MS grade were sourced from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Caffeine (CAF), carbamazepine (CBZ), 1H-benzotriazole (BTZ), acesulfame (ACE) potassium salt, and diclofenac (DCL) sodium salt were sourced from Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany), naproxen (NPX) and ibuprofen (IBU) from MP Bio-medicals LLC (Eschwege, Germany).

The internal, deuterated standards (BTZ-d₄, CAF-d₉, DCL-d₄, NPX-d₃) were sourced from EQ Laboratories (Augsburg, Germany), CBZ-d₁₀ and IBU-d₃ from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany), ACE-d₄ potassium from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada).

2.2.2. EOC selection

EOC removal performance was assessed via meaningful representatives of compounds of comparable behavior during treatment, so called process indicators (Jekel et al., 2015). For EOCs, biodegradation is known to be an important removal process in treatment wetlands (Li et al., 2014). For use in biological treatment monitoring, EOCs can be grouped into categories according to their degree of biodegradability (Jekel et al., 2015): high, medium, and low. Note that “(bio-) degradability” in this study considers both mineralization and transformation reactions. Examples of readily biodegradable compounds are acetaminophen (paracetamol), salicylic acid, chloramphenicol, estradiol, cyclamate, and the nicotine metabolite cotinine (Onesios et al., 2009; Margot et al., 2013; Luo et al., 2014; Tran et al., 2015). Common EOCs exhibiting moderate elimination in biological treatment are atenolol, ketoprofen, morphine, sulfamethoxazole, gemfibrozil, and bezafibrate (Margot et al., 2013; Luo et al., 2014). Fluconazole, oxazepam, atrazine, diuron, carbendazim, and sucralose are prominent examples for compounds showing low removal and recalcitrant behavior, respectively (Margot et al., 2013; Jekel et al., 2015; Tran et al., 2015; Falås et al., 2016).

The present study focused on polar EOCs due to their resulting high mobility in the water cycle. Adsorption processes, which can contribute to pollutant removal in treatment wetlands (Li et al., 2014), were not considered in indicator selection.

According to the selection criteria for process indicators suggested by Jekel et al. (2015), indicators should be omnipresent in wastewater. In the present study, indicator compounds ought to cover the whole range of biodegradability under aerobic

Table 1

Design, operational details, and abbreviations of the six treatment wetlands in the study. Schematics of and more details on the treatment wetlands are available in Nivala et al. (2013a).

System abbreviation ^a	System type ^b	Effective depth ^c (cm)	Saturation status	Main media	Surface area (m ²)
Conventional Designs					
H50p	HF	50	Saturated	8–16 mm gravel	5.6
VGp ^d	VF	85	Bottom 30 cm saturated	4–8 mm gravel	6.2
VGp + VSp ^e	VF	85	Bottom 30 cm saturated (VGp) Unsaturated (VSp)	4–8 mm gravel 1–3 mm sand	6.2 × 2
Intensified Design					
R	Reciprocating	95	Alternating	8–16 mm gravel	13.2
VAP	VF + Aeration	85	Saturated	8–16 mm gravel	6.2
HAP	HF + Aeration	100	Saturated	8–16 mm gravel	5.6

^a Systems planted with *Phragmites australis* are denoted with "p" in the system abbreviation.

^b HF: horizontal flow; VF: vertical flow.

^c Effective depth refers to the depth of the media involved in treatment.

^d VGp: First stage of the two-stage wetland system.

^e VSp: Sand filter, second stage of the two-stage wetland system.

conditions. The final analyte set therefore contained common pharmaceuticals (ibuprofen, naproxen, diclofenac, carbamazepine), an artificial sweetener (acesulfame), a corrosion inhibitor (benzotriazole), and a stimulant (caffeine) (Table 2). CAF and IBU represent readily biodegradable compounds, NPX, BTZ, and ACE moderately biodegradable compounds, and CBZ persistent EOCs. It has to be noted that at the time the present study began ACE was commonly reported persistent (Jekel et al., 2015) and was included in the indicator set as highly polar, recalcitrant compound under all redox conditions. However, biodegradability of ACE under oxic conditions was demonstrated recently, although efficiency was highly variable (Burke et al., 2017; Castronovo et al., 2017). Accordingly, ACE is considered an EOC of moderate biodegradability in the following.

2.2.3. Sample collection and water quality analysis

Grab samples of the effluent of the septic tank (influent of the treatment wetlands) and of the effluents of the six treatment wetlands (including a tertiary sand filter) were collected weekly for one full year from June 2014 to May 2015 (n = 42). Monitoring during August 2014 was cancelled due to construction work at the research facility. For VGp and VGp + VSp only one sample was collected in February 2015, due to a pump failure (n = 40). The sample collection procedure is described in detail elsewhere (Nivala et al., 2013a). During May and June 2015, additional internal grab samples from HAP were collected according to the procedure published by (Nivala et al., 2013a). These samples were taken at 12.5%, 25%, 50%, 75% fractional length and 50% fractional depth of the bed.

Water for the determination of conventional water quality parameters were collected in 500-mL clear glass bottles. Water for EOC analyses was collected in 100-mL or 50-mL amber glass bottles. Sample bottles were placed in a cooler with ice packs for transport to the laboratory. Sample preparation and analysis was conducted within 24 h.

In addition to the treatment wetlands, the conventional WWTP was briefly monitored for EOC removal. Influent samples were taken after mechanical treatment of the raw incoming wastewater; effluent samples were taken after final clarification. Two consecutive 24-h-composites of WWTP influent and effluent were collected in August, October, and December 2014, January, March, and May 2015 (n = 12). Carbonaceous biochemical oxygen demand (CBOD₅), ammonium and nitrate nitrogen were routinely determined every week in 24h-composites at the WWTP (n = 51). CBOD₅ was measured with an OxiTop device (WTW, Weilheim, Germany). Ammonium and nitrate nitrogen were determined using cell tests (Hach-Lange, GmbH, Düsseldorf, Germany).

Water temperature and pH were measured with a SenTix 41 sensor (WTW, Weilheim, Germany), dissolved Oxygen (DO) and electrical conductivity (EC) with a ConOx sensor (WTW, Weilheim, Germany), and redox potential (E_H) with a SenTix ORP sensor (WTW, Weilheim, Germany). The DO and E_H sensors were part of a Multi 350i instrument (WTW, Weilheim, Germany). CBOD₅ was measured according to DIN 38409 with an OxiTop device (WTW, Weilheim, Germany), Total Organic Carbon (TOC) according to DIN EN 1484 with a TOC-VCSN device (Shimadzu, Duisburg, Germany), and Total Nitrogen (TN) according to DIN EN 12260 using a corresponding TNM-1 module. TOC and TN were analyzed in the supernatant of samples that had been allowed to settle for 30 min. Ammonium, nitrate, and nitrite nitrogen were measured according to DIN ISO 15923 using a Gallery Plus photometric analyzer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). Total Suspended Solids (TSS) was determined according to DIN EN 872.

Prior to EOC analysis, samples were brought to room temperature: Treatment wetland and WWTP influent samples were diluted 1:2 and effluent samples of H50p were diluted 1:1 with ultrapure water. Isotope-labelled internal standards, dissolved in methanol, were added to each sample (final concentrations of the internal standards: 40 ng/mL for IBU-d₃, 17.5 ng/mL for ACE-d₄ in free-acid form, 7.5 ng/mL for BTZ-d₄, CAF-d₉, and NPX-d₃, 5 ng/mL for CBZ-d₁₀ and DCL-d₄). The spiked samples were filtered using 0.45 μm regenerated cellulose (RC) membrane syringe filters. From June 2014 to November 2014 Whatman[®] GD/X filters, 13 mm (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), from December 2014 to May 2015 Micropur RC filters, 15 mm (Altmann Analytik, Munich, Germany) were used.

Indicator EOCs were determined by HPLC-MS/MS using an Agilent 1260 Infinity series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTRAP[®] 5500 mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) and controlled by Analyst[®] 1.6.2 software. Chromatographic separation was performed on an Ascentis[®] Express C18 column (50 × 3 mm, 2.7 μm) (Supelco/Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) following a Security Guard C18 guard column (4 × 2 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The column temperature was set to 35 °C. 10 μL of each sample were injected into the HPLC-MS/MS-system with 0.1% (v/v) acetic acid in ultrapure water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B) as mobile phases. The flow rate was set to 300 μL/min with the following gradient: 0 min 90% A, 0.5 min 90% A, 3 min 15% A, 8 min 15% A, 8.1 min 90% A, 12.5 min 90% A. Electrospray-ionization (ESI) was conducted in polarity switching mode. Source temperature was 500 °C. IonSpray Voltage was set to 5 kV in positive and –4.5 kV in negative ionization mode. For each compound two

Table 2
Chemical structure, use, and reported biodegradability of selected indicator EOCs. Indicator EOCs are sorted by decreasing biodegradability under aerobic conditions.

Compound	Chemical Structure	Application ^a	Biodegradability
Caffeine (CAF)		Stimulant	High (aerobic) ^c Medium to high (anaerobic) ^{c,d}
Ibuprofen (IBU)		NSAID	High (aerobic) ^{e,f,g,h} Low(anoxic, anaerobic) ^{d, h}
Naproxen (NPX)		NSAID	Medium to high (aerobic) ^{e,f,g,i} Medium to high (anaerobic, anoxic) ^{d,i}
Benzotriazole (BTZ)		Corrosion inhibitor, antifreeze agent	Low to medium (aerobic) ^{j,k,l} Low (anaerobic) ^{j,k,l}
Diclofenac (DCL)		NSAID	Low to high (aerobic) ^{e,f,g,h,i,k,m} Low (anoxic, anaerobic) ^{d,f,h,j,k}
Acesulfame (ACE)		Artificial sweetener	Low ^b (aerobic, anoxic, anaerobic) ^m
Carbamazepine (CBZ)		Anticonvulsant	Low (aerobic) ^{f,g,k,l} low to medium (anoxic, anaerobic) ^{d,f,k,l,m,n}

^a NSAID: nonsteroidal anti-inflammatory drug.

^b Recalcitrance of ACE was commonly reported at the time this study began (Jekel et al., 2015).

^c Froehner et al. (2011).

^d Monsalvo et al. (2014).

^e Quintana et al. (2005).

^f Suarez et al. (2010).

^g Fernandez-Fontaina et al. (2012).

^h Zwiener and Frimmel (2003).

ⁱ Lahti and Oikari (2011).

^j Liu et al (2011).

^k Falás et al. (2016).

^l Burke et al. (2017).

^m Medium to high biodegradability of ACE has been documented only recently (Castronovo et al., 2017).

ⁿ König et al. (2016).

mass transitions were detected in multiple reaction monitoring (MRM) and scheduled MRM (sMRM) mode, respectively. Entrance potential was set to 10 V (positive mode) and –10 V (negative mode), respectively. Additional parameters for each transition are shown in Table S2.

Quantification was based on the isotopically labelled internal standards and calibration curves obtained from external calibration standards. These standards (prepared in ultrapure water) contained different concentrations of the analytes, but constant concentration of the internal standards. Calibration curves were generated from relative signal intensities and relative concentrations of an analyte and its isotope-labelled internal standard. Concentration data for ACE and DCL refers to the free-acid form of these analytes. Matrix effects, as determined by the response of the isotope-labelled internal standards in each sample type, were minimal. Signal

suppression was below 10%. For more details on the quantification and quality control procedure, EOC LOD and LOQ values and criteria the reader is referred to the supporting information.

2.2.4. Data analysis

If the respective chromatographic peaks were too small or not detected, EOC concentrations were replaced by half of the Limit of Detection (LOD). Half of the Limit of Quantification (LOQ) was used if peaks were detected but the instrument software (Analyst 1.6.2, AB SCIEX) did not calculate an explicit value. For inorganic nitrogenous species and five-day carbonaceous biological oxygen demand (CBOD₅), analytical findings below the LOQ were replaced with half of the respective limit. Limits are shown in Table S3.

Removal efficiency of the treatment wetlands was calculated on a mass basis, according to Equation (1) (Kadlec and Wallace, 2009).

Inflow concentration is C_i ($\mu\text{g/L}$), outflow concentration is C_o ($\mu\text{g/L}$), inflow rate is Q_i (L/d) and outflow rate is Q_o (L/d). For the conventional WWTP only inflow rate was available. Inflow and outflow were therefore assumed to be equal and removal was calculated based on concentration (Equation (2)).

$$\% \text{ Mass Removal} = 100 \times \left(\frac{Q_i C_i - Q_o C_o}{Q_i C_i} \right) \quad (1)$$

$$\% \text{ Concentration Removal} = 100 \times \left(\frac{C_i - C_o}{C_i} \right) \quad (2)$$

Treatment wetland performance is most commonly reported as mean concentrations and standard deviations (Kadlec and Wallace, 2009). However, these can be skewed by outliers (Helsel and Hirsch, 2002). Therefore, median and interquartile ranges are reported in the present study.

Annual treatment performance was calculated using annual medians of concentration and flow, respectively. Flow data gathered during and after heavy rain events as well as during maintenance work was excluded. Monthly median of flow was used for calculation of weekly removal performance. For comparing removal efficiency between warm and cold season, box-and-whisker plots based on weekly removal were generated. These plots illustrate the extent and spread of removal efficiency for the respective EOC, treatment wetland, and season. Calculating removal efficiency based on weekly pollutant loads adds uncertainty to the computed value, since contemporaneous sampling of influent and effluent disregards transport delay within the treatment system (Kadlec and Wallace, 2009). Therefore, the systems were compared using median values calculated over the whole period of warm and cold season, respectively, or over the whole year. Variability of the individual, weekly values is accounted for in the box-and-whisker plots. SPSS Statistics 21 software was used to calculate median values and interquartile ranges as well as to generate box-and-whisker plots. Missing values were excluded pairwise.

3. Results and discussion

3.1. Treatment performance parameters

The indicator compounds used in this study reflect the system performance with respect to microbial degradation of a broad spectrum of EOCs. Thus, representatives of readily biodegradable (CAF, IBU), moderately biodegradable (NPX, BTZ, DCL, ACE), and recalcitrant (CBZ) compounds in aerobic environments (Table 2) were selected according to Jekel et al. (2015). DCL was included although its removal can be highly variable, and is yet not fully understood (Zhang et al., 2008; Jekel et al., 2015). Biodegradation of ACE has recently been reported (Burke et al., 2017; Castronovo et al., 2017) under certain conditions, but was not commonly known at the time the indicator compounds were chosen (Jekel et al., 2015).

Standard water quality parameters were used to characterize the system status, e.g. redox condition, and general performance of the treatment wetlands regarding classic pollutants. Moreover, they ought to help identify crucial operational conditions for EOC removal and support conclusions drawn from EOC removal pattern.

3.2. Annual treatment performance

Wastewater pollutant load and composition depend on consumer behavior regarding water consumption and compound use. Accordingly, the concentrations of pollutants, including EOCs, in raw wastewater are variable and often exhibit diurnal patterns. At

the research facility in Langenreichenbach, such variations were balanced by the septic tank prior to the treatment wetlands, which had an HRT of about two days.

Indicator EOCs and conventional wastewater parameters were analyzed in grab samples of the effluent of the six treatment wetlands and the septic tank. Grab sampling is the most commonly used sampling method for treatment wetlands (Kadlec and Wallace, 2009), although this sampling mode can cause uncertainties in concentration and removal due to diurnal variation of water quality. However, the septic tank prior to the treatment wetlands (see above) and the comparatively long HRT of the treatment wetlands (at least three days) strongly reduce diurnal variations in the influent as well as in the effluent. Moreover, frequent and regular sampling along with data averaging reduces the uncertainties associated with grab sampling. In a previous study three of the indicators were determined in the effluent of one of the systems (H50p) on seven consecutive days with samples taken every 2 h. The mean difference between the mean daily effluent concentrations of two consecutive days (six data pairs) ranged from 4 to 9% for DCL, IBU, and NPX, respectively. This illustrates that the uncertainty originating from the sampling strategy is negligible, if averaged rather than single data are used. Correspondingly, the systems are compared using data averaged over at least one month. This complies with the recommendation of Kadlec and Wallace (2009) to average data over at least three times the HRT of a system.

From June 2014 to May 2015 ($n = 40\text{--}42$) median influent indicator EOC concentration ranged from 3 $\mu\text{g/L}$ (CBZ, NPX) to 64 $\mu\text{g/L}$ (CAF) (Table 3). Individual concentration ranges were characteristic for municipal wastewater (Chen et al., 2016; Knopp et al., 2016; Castronovo et al., 2017). This also applied for CBOD₅, TOC, TN, and NH₄-N (Zorita et al., 2009; Chen et al., 2016; Knopp et al., 2016). Median influent concentrations observed during this study (Table 4) were comparable to previous studies conducted at this research site (Nivala et al., 2013a, 2013b; Avila et al., 2014).

Pollutant removal efficiency was calculated based on mass loads according to Equation (1). Annual median elimination of indicator EOCs and conventional pollutants is exhibited in Tables 3 and 4, respectively. Negative removals are commonly observed in field studies (Verlicchi and Zambello, 2014; Chen et al., 2016; Auvinen et al., 2017) and were interpreted as no removal.

Median annual EOC removal of the six systems studied increased from wetlands with conventional design (H50p, VGp) to those with intensified treatment (VAp, HAp, R). The two-staged system VGp + VSp showed EOC removal performance comparable to the intensified systems (Table 3). These trends were also observed for CBOD₅, TOC, TN, NH₄-N, and NO_x-N (Table 4). Although intensification of treatment wetlands mainly aims at increasing removal of bulk organic matter and nutrients by elevating dissolved oxygen content (Kadlec and Wallace 2009, Nivala et al., 2013a, 2013b), it also proved beneficial for EOC removal.

Of the seven indicator EOCs readily biodegradable compounds (CAF, IBU) were removed to higher extents than moderately biodegradable ones (NPX, BTZ, DCL, ACE). No removal was observed for the recalcitrant CBZ (Table 3). ACE was noticeably removed in some of the systems (VAp, HAp, R, VGp + VSp). This was surprising, because at the time this study began, ACE had been reported to be persistent in biological treatment (Jekel et al., 2015). Biodegradability of ACE under certain boundary conditions was documented only recently (Burke et al., 2017; Castronovo et al., 2017).

Based on WWTP data from six samplings of two consecutive 24-h composites each the treatment wetlands VGp + VSp and HAp had lower effluent EOC concentrations and accordingly higher removal efficiency than the adjacent conventional WWTP, which shares the raw incoming wastewater with the pilot plants septic tank. This

Table 3
Annual median concentration ($\mu\text{g/L}$) of EOCs in the influent and effluent of the investigated treatment wetlands from June 2014 to May 2015. Interquartile ranges are given in parentheses. Values in italics represent annual median mass removal.

	Caffeine	Ibuprofen	Naproxen	Benzotriazole	Diclofenac ^a	Acesulfame ^a	Carbamazepine
Influent	64 (55)	24 (6)	3 (2)	15 (4)	6 (2)	19 (7)	3 (1)
Conventional designs							
H50p	4 (17)	93%	20 (5)	19%	3 (2)	23%	12 (4)
VGp	2 (3)	97%	1.3 (0.9)	95%	0.4 (0.3)	89%	6 (2)
VGp + VSp	0.2 (0.2)	100%	< LOQ	98%	0.1 (0.1)	97%	2 (2)
Intensified designs							
R	0.4 (2.7)	99%	1.1 (2.1)	95%	0.6 (0.3)	84%	6 (2)
VAp	0.5 (0.8)	99%	0.5 (0.3)	98%	0.2 (0.2)	94%	4 (1)
HAp	0.2 (0.1)	100%	0.3 (0.4)	99%	0.05 (0.05)	99%	2 (2)

Number of corresponding influent-effluent pairs for each parameter is exhibited in Table S4.

^a Concentration data refers to the free-acid form of the compound.

WWTP only achieved annual median removal of BTZ, DCL, and ACE of 77%, 54%, and 43%, compared to 87%, 78%, and 49% for the treatment wetland VGp + VSp and 87%, 75%, and 78% for HAp. Higher elimination of moderately biodegradable EOCs in HAp and VGp + VSp (Table 3) is even more remarkable when taking into account that the Langenreichenbach WWTP has an extremely high hydraulic residence time of seven days. This resulted in higher treatment efficiency compared to other conventional WWTPs. Removal of BTZ and DCL in other WWTPs is reported to be in the range of less than 50% (Vieno and Sillanpää, 2014; Jekel et al., 2015). Castronovo et al. (2017), who monitored ACE removal in a German WWTP over a period of two years, observed median ACE elimination of only 39%.

3.3. Seasonality of treatment performance

Effluent quality and removal performance of the treatment wetlands was variable over the course of the one-year study. These variations were due to seasonal patterns, which are characteristic for treatment wetland performance in temperate climates (Kadlec and Wallace, 2009). Year-round monitoring of removal performance is essential to allow a robust evaluation of the effects of operational conditions, including highest and lowest treatment performance well as the sensitivity of the systems towards changing operational conditions. However, year-round observation is not commonly performed in studies on EOC removal in treatment wetlands due to logistical and/or economic reasons.

Highest removal performance was achieved in June and July 2014 (warm season, median effluent water temperature 18–21 °C). Least efficient removal was observed in February and March 2015 (cold season, median effluent water temperature 7 °C). Higher

treatment wetland performance in warm season compared to cold season was also reported by Hijosa-Valsero et al. (2010) in seven systems (mesocosm) of different design and for nine EOCs, including CAF, NPX, IBU, DCL, and CBZ. Zhang et al. (2017) also found that removal of IBU in saturated mesocosm treatment wetlands fed with artificial influent was positively influenced by water and air temperature, resulting in higher treatment performance in summer compared to winter months. In both studies higher performance in warm season was attributed to increased biological activity. In contrast, Chen et al. (2016) observed no significant seasonality in removal of most EOC under study in three full-scale treatment wetlands. The authors suggested that rhizosphere sorption and plant uptake, which would not be as temperature-sensitive as biodegradation, might be the dominating removal processes for EOC in the cold season. Consequently, the authors recommend assessing the impact of different removal processes, like biodegradation or sorption, onto EOC removal in order to identify individual and joint effects during different seasons. Seasonality in treatment performance also occurs in conventional treatment plants. Herzog et al. (2014) observed seasonal variation in removal of benzotriazoles in three different WWTPs.

3.3.1. Warm season

Indicator EOC removal efficiency of each treatment wetland during warm season is presented in Fig. 1. Compounds are arranged according to decreasing biodegradability. Weekly removal efficiency of seven regular sampling events in June and July 2014 was considered.

Horizontal subsurface flow (HSSF) is one of the most common and utilized treatment wetland designs (Kadlec and Wallace, 2009). At the Langenreichenbach research facility this design is

Table 4
Annual median water quality data of influent and effluent of the investigated treatment wetlands from June 2014 to May 2015. Interquartile ranges are given in parentheses. Values in italics represent annual median mass removal.

	Flow		Redox potential	Dissolved oxygen	CBOD ₅	TOC	TN	NH ₄ -N	NO _x -N
	Q _{in} (L/d)	Q _{out} (L/d)	(mV)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Influent ^a	–	–	–277 (41)	1.0 (0.6)	315 (51)	149 (37)	90 (11)	77 (12)	< LOQ
Conventional designs									
H50p	193 (1)	192 (36)	–228 (44)	3 (3)	79 (38)	75%	35 (17)	77%	72 (11)
VGp	575 (6)	557 (38)	+111 (76)	4 (1)	6 (5)	98%	14 (3)	91%	56 (15)
VGp + VSp	575 (6)	536 (56)	+216 (56)	10 (3)	0.3 (0.8)	100%	11 (3)	93%	53 (16)
Intensified designs									
R	1461 (20)	1441 (16)	+169 (98)	5 (1)	2.0 (2.2)	99%	10 (3)	93%	39 (22)
VAp	576 (6)	557 (38)	+86 (146)	8 (2)	1.7 (2.8)	99%	13 (3)	92%	45 (16)
HAp	770 (1)	742 (63)	+208 (90)	10 (3)	0.5 (1.0)	100%	15 (3)	90%	52 (16)

Number of corresponding influent-effluent pairs for each parameter is exhibited in Table S4.

^a Median influent concentration was calculated using all influent data collected (n = 39–41).

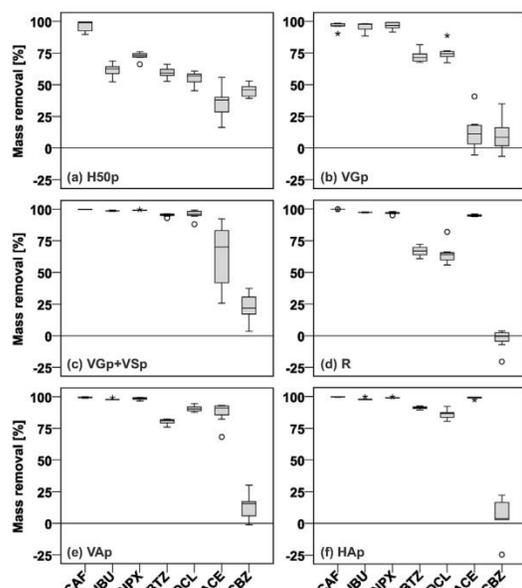


Fig. 1. Mass removal (%) of the indicator EOCs in the investigated treatment wetlands during period of highest performance (warm season, June and July 2014) ($n = 7$).

represented by H50p. In H50p (Fig. 1a), readily biodegradable CAF was removed to more than 90% in warm season. The removal of all other indicator compounds was ineffective. Even the well biodegradable IBU was removed with median efficiency of only 63%. H50p was, however, the only system constantly showing CBZ removal during warm period, with median efficiency of 46%. Significant contribution of plant uptake, which was previously observed for *P. australis* (Sauvêtre and Schroeder, 2015), can be excluded because noticeable CBZ removal was not observed in any of the other planted systems. CBZ removal in H50p can therefore be related to reductive transformation (Hai et al., 2011; Jekel et al., 2015; König et al., 2016). Overall indicator EOC removal pattern clearly indicated insufficient oxygen availability inside H50p. This was in agreement with incomplete ammonium oxidation (median removal of 51%, Table S5), efficient denitrification ($C_{NOX-N} < 0.3$ mg/L), and redox potential of -185 mV at the highest in the effluent during warm season (data not shown). Nevertheless, partial removal of IBU and ammonium indicated the presence of aerobic (micro-) zones in the oxygen lacking bulk system H50p. These might have formed around plant roots, which are known to release oxygen (Kadlec and Wallace, 2009).

Moderate performance of HSSF systems in removing conventional pollutants, especially ammonia, is well documented (Vymazal, 2007; Kadlec and Wallace, 2009). Increased oxygen availability is considered a key factor for improving wetland performance (Kadlec and Wallace, 2009; Nivala et al., 2013a,b; Wu et al., 2014). An early strategy to elevate oxygen supply was utilizing unsaturated vertical flow in subsurface flow treatment wetlands (Kadlec and Wallace, 2009). In the present study, these systems are represented by VGp. Indeed, indicator EOC removal in VGp (Fig. 1b) was more efficient than in H50p. During June and July 2014, readily biodegradable CAF and IBU as well as moderately biodegradable NPX were removed to at least 88%. BTZ and DCL

were eliminated to at least 67%. In contrast to H50p, CBZ was persistent in VGp. The pattern of indicator compound removal in VGp demonstrated higher oxygen availability than in H50p, resulting in higher treatment performance for pollutants eliminated via aerobic pathways. This was supported by median effluent redox potential of $+40$ mV (data not shown), ammonium removal of 92%, limited denitrification and therefore TN removal of 65% during warm season (Table S5).

The use of an unsaturated sand filter (VSp) subsequent to VGp markedly enhanced EOC removal. Median elimination of moderately biodegradable BTZ and DCL in June and July 2014 increased from 71% (BTZ) and 75% (DCL) in VGp (Fig. 1b) to 96% (BTZ, DCL) in the two-staged system VGp + VSp (Fig. 1c). The beneficial effect of the subsequent sand filter was even more pronounced for ACE removal, which increased from insignificant (median 11%) in VGp (Fig. 1b) to median of 70% in VGp + VSp (Fig. 1c). Removal of ACE in VGp + VSp also constantly increased from early June, reaching its maximum (92%) in mid-July. Variability of ACE removal was therefore high and median performance does not represent the maximum performance in this time period well (Fig. 1c). The clear improvement in EOC removal by the subsequent sand filter is remarkable, as no comparable effect was observed for the bulk parameters (Table S5). Pollutant removal pattern suggested that the subsequent sand filter further increased oxygen availability, making VGp + VSp one of the most efficient treatment wetland systems for EOC removal of this study.

In intensified treatment, recurring fill-and-drain cycles (treatment wetland R) are an option to increase subsurface oxygen availability and treatment performance (Behrends, 1999). In terms of EOC removal R showed performance similar to VGp (Fig. 1b, d). DCL and ACE were, however, eliminated more efficiently, showing median removal of 64% and 95%. The EOC removal pattern along with quantitative ammonium removal (median 99%; Table S5), and median effluent redox potential of $+84$ mV (data not shown) indicated elevated oxygen availability in R compared to VGp. Interestingly, R showed the highest TN removal (85%, Table S5) of all treatment wetlands investigated, indicating efficient denitrification. Likely, anoxic zones were formed during stagnation periods of the wastewater, in which oxygen consumption was high due to oxidation of carbonaceous compounds and ammonium. Although R had twice the footprint size of VGp (Table 1), its inflow rate was around three times higher (Table 4), resulting in markedly higher absolute mass removal in the more complex system R.

The two aerated treatment wetlands VAp and HAp showed very high EOC removal performance (Fig. 1e and f), with HAp exhibiting lowest variability in treatment performance of all treatment wetlands investigated. Elimination of TN was higher in VAp (median 79%) compared to HAp (68%) due to more efficient denitrification. This could have been promoted by antiparallel flow of water and air in VAp. Fresh influent was fed on the top of the system, while oxygen was supplied from the bottom. Fresh influent and treated water were likely re-mixed, bringing together nitrate and carbonaceous compounds. In HAp, the air flow was orthogonal to the water flow, not enabling such mixing effects and noticeable denitrification.

Based on indicator EOC removal efficiency of the treatment wetlands in the warm season, three groups of systems can be formed. The conventional design H50p offered moderate to low EOC removal, restricted by limited oxygen availability. However, it was the most effective of the investigated systems eliminating compounds that are degraded under anaerobic conditions. The conventional system VGp and the intensified system R showed markedly elevated oxygen availability, increasing removal of EOC eliminated via aerobic pathways. In terms of absolute mass removal R, however, performed better than VGp. Further increased EOC

removal was observed in a conventional system using a subsequent sand filter (VGp + VSp) and in the aerated systems HAp and VAp. Conclusively, increased design complexity and accordingly oxygen availability proved beneficial for the removal of conventional pollutants as well as of EOCs.

3.3.2. Cold season

Robustness can be related to the extent to which the performance of a system is affected by suboptimal operational conditions and the time needed for adaption. In practical terms robustness can be more important for the year-round performance than the performance under optimal conditions. This is especially true with respect to operational parameters that cannot be influenced, like the external temperature, which directly affects water temperature, microbial activity, and oxygen solubility. Monitoring operational conditions and pollutant removal frequently for a full year period allows a thorough evaluation of system robustness.

The variability of the annual removal performance (Table 3, Table 4) already provides indication for the robustness of the six wetland systems. The lower the exhibited interquartile ranges of annual removal performance were, the higher the system robustness towards seasonally changing conditions was. In order to illustrate the duration of transition periods time-resolved data is even more instructive. The course of median monthly DCL removal and influent water temperature is shown in Fig. 2. Influent and effluent water temperatures were comparable for all systems and were the operational parameter(s) with the strongest seasonal variation.

In all treatment wetlands investigated, DCL removal was highest in July and lowest in February or March. This coincides with the highest (20 °C) and lowest (9 °C) median influent water temperature. DCL removal performance clearly followed water temperature, but the extent of seasonal variation as well as the duration of the period of low performance differed for the systems (Fig. 2). For example, the period of low DCL removal lasted four months in VGp + VSp (January to April 2015), but more than five months in R, illustrating higher robustness of VGp + VSp. Removal of other EOCs, except ACE, was less affected by season, if seasonal differences occurred at all.

As a general trend, the treatment wetlands performing best in warm season (Fig. 1) were also the most robust systems, i.e. performance in these systems was least affected by suboptimal conditions (Fig. 3). Accordingly, H50p, which was the system with the lowest performance already in warm season, exhibited the

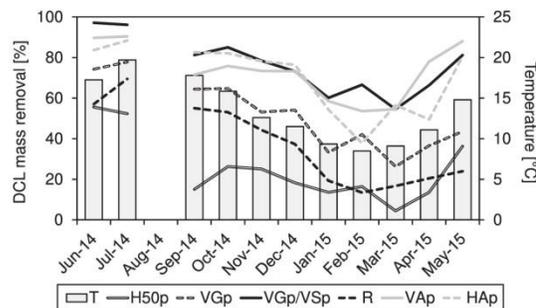


Fig. 2. Monthly median mass removal (%) of DCL in the treatment wetlands and influent water temperature throughout the year. Monthly median removal was calculated using median monthly flow and median monthly DCL concentration. Influent and effluent temperatures of all systems were comparable. No sampling in August 2014 due to construction works at the research facility.

strongest seasonal variability. R and VGp showed higher and less seasonally variable performance compared to H50p. HAp, VAp, and VGp + VSp had the highest and least seasonally variable EOC removal performance. This also applied for removal of TOC, CBOD₅, and ammonia. Nitrate and TN removal was most effective and least seasonally variable in R, followed by VAp, HAp, VGp + VSp, VGp and H50p.

Consequently, improved oxygen supply does not only improve treatment performance under optimal conditions (maximum removal achievable) but also allows for high performance in cold season and enhances system robustness by extending the period of high removal efficiency. This improves the year-round performance of a treatment wetland.

Concerning the different EOCs, seasonality was weakest for the easily biodegradable CAF and most pronounced for the compounds of moderate biodegradability (BTZ, DCL, ACE) (Figs. 1 and 3). In case of CBZ, no seasonal variation was observed as removal was insignificant (except for H50p). A comparable trend of increasing seasonality with increasing compound recalcitrance is noticeable in the data of a few other studies, but has not been discussed explicitly (Matamoras et al., 2008; Sui et al., 2011).

3.4. Factors affecting EOC removal

With increasing recalcitrance of a compound removal generally decreased, seasonality increased (robustness decreased), and differences in treatment performance between the wetland systems became more pronounced. Indicator EOC removal in the wetland systems also increased with increasing design complexity. Elevated dissolved oxygen concentrations inside these systems proved beneficial for removal EOCs that are removable via oxidative pathways. The positive effect of increased dissolved oxygen content

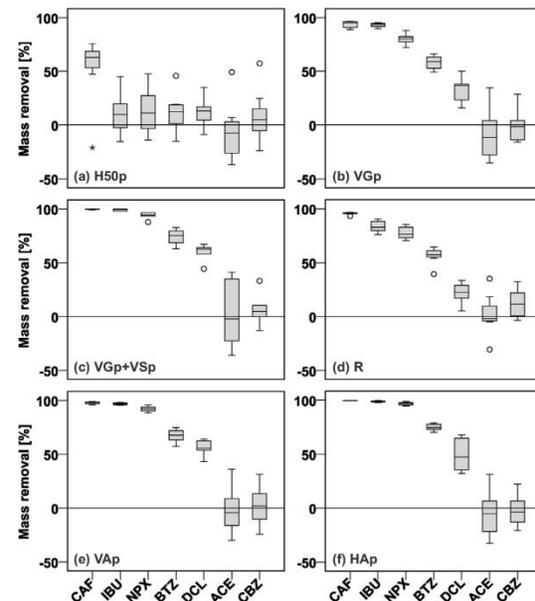


Fig. 3. Mass removal (%) of the indicator EOCs in the investigated treatment systems during period of lowest performance (cold season, February and March 2015) (n = 8; n = 6 for VGp and VGp + VSp).

and redox potential on removal of these EOCs is in agreement with previous studies (Suarez et al., 2010; Auvinen et al., 2017). In order to remove EOCs eliminated via reductive pathways (like CBZ) additional anaerobic steps might be reasonable. Elevated temperature also proved beneficial for EOC removal in the present study as well as in several previous works (Matamoros et al., 2008; Verlicchi and Zambello, 2014; Zhang et al., 2014).

There is long-lasting and ongoing dispute on whether biotransformation of EOCs in wastewater treatment and the environment occurs metabolically or cometabolically (Quintana et al., 2005; Fernandez-Fontaina et al., 2014; Fischer and Majewsky, 2014). Metabolic processes maintain vital functions via transformation of growth substrates; cometabolism describes transformation of non-growth substrates in mandatory presence of growth substrates via unspecific enzymes. In order to obtain insight into the course of biotransformation the concentration profile of EOCs was studied along the flow path of HAp during a period of high treatment performance (September 2014, Fig. 4).

Inside HAp, removal of the readily biodegradable compounds IBU (not shown), CAF, and CBOD₅ started instantaneously and reached 90% within the first 25% fractional length (Fig. 4). Significant removal of compounds of higher recalcitrance, namely NPX, DCL (Fig. 4), and BTZ (not shown), started later, at fractional lengths of 12.5%, 25%–50%, and 25%, respectively. Relative concentration of ACE was comparable to DCL within the first 25% length of HAp, after 50% length it was similar to NPX. Ammonium relative concentration followed the same trend as NPX. The more recalcitrant an EOC, the later noticeable removal started inside HAp and the higher reactor length was (or would have been) required for efficient removal of the compound. Moreover, the fractional system length required for 50% removal increased. For example, 50% elimination of CAF, NPX, and DCL was achieved at approximately 15%, 25%, and 50% fractional length of HAp.

The early onset and rapid progress of CAF, NPX (Fig. 4), and IBU (not shown) removal, as well as their similarity to CBOD₅ elimination (Fig. 4) is in line with cometabolic degradation. High amounts of bulk organic matter (TOC, CBOD₅) near the influent induced high expression of enzymes for standard metabolic processes. This increased the likelihood of EOCs reaching the active center of unspecific enzymes and getting transformed, provided the molecular structure is suitable. Cometabolic degradation of IBU and NPX would be in agreement with lab studies conducted by Quintana et al. (2005). The removal of EOCs in later sections of HAp, where CBOD₅ had been reduced to below detection limits, makes metabolic transformation a more likely biotransformation pathway. In late sections of HAp the microbial community was forced to

metabolize substrates that are more difficult to degrade and occur at lower concentration to maintain vital functions and more specific enzymes may have been expressed, e.g. for metabolization of DCL (Fig. 4), as well as for BTZ and ACE (data not shown).

However, cometabolic biodegradation of EOCs even in late sections of HAp cannot be excluded. On the one hand, removal only in late sections can be due to a simple kinetic effect. The higher concentration of e.g. DCL relative to main substrates in late sections of the wetland (Fig. 4) increases the likelihood of DCL reaching the active center of an unspecific enzyme and getting transformed. On the other hand, in later parts of the wetland enzymes different from the ones in early parts might be expressed to transform remaining, unusual substrates contained in the bulk organic matter (TOC). Some of those enzymes might be able to cometabolically degrade EOCs. For clear differentiation between metabolic and cometabolic processes participating in EOC removal lab studies would be mandatory. However, it has to be considered that the microbial community establishing in lab experiments might differ from the consortium in the treatment wetland, limiting the transferability of results to pilot and full scale systems treating real wastewater.

In summary, the presented data on EOC removal in the different systems shows that high temperature, dissolved oxygen content and redox potential (oxic conditions), as well as low CBOD₅ content can positively affect the biodegradation of EOC. Beneficial effects of aerobic conditions and high temperature on removal of a variety of EOCs has also been reported in systematic laboratory studies conducted by Burke et al. (2014, 2017) as well as in treatment wetland studies (Li et al., 2014; Verlicchi and Zambello, 2014). In the present study, it appeared that a combination of both low CBOD₅ and high oxygen availability is crucial for the transformation of the least biodegradable EOCs (e.g. DCL). Enhanced removal of EOCs in carbon-depleted environments with high oxygen availability was also observed in managed aquifer recharge as well as in ground-water recharge (Rauch-Williams et al., 2010; Hoppe-Jones et al., 2012; Regnery et al., 2016). EOC removal pattern indicated that such oligotrophic, aerobic conditions were established in the tertiary sand filter of VGp + VSp and in late sections of HAp. The removal of the critical EOCs BTZ and DCL was highest in these two systems year-round (Table 3, Figs. 1 and 3). It was noticeably lower in VAp, in which mixing along the vertical flow path may have prevented the establishment of zones in which oxygen concentration was high and CBOD₅ content was low. The need of co-occurring high oxygen concentration and low CBOD₅ for efficient removal of the least biodegradable EOCs, as realized in VGp + VSp and HAp, would also explain, why these two systems perform better than conventional WWTPs: Water inside the aeration tanks of WWTPs is properly mixed, which ensures sufficient oxygen supply but prevents the establishment of zones with carbon depletion.

4. Conclusions

In this one year study with more than 40 sampling events, seven indicator EOCs were analyzed to assess the general EOC removal performance of six wetland systems treating municipal wastewater and to gain insight into critical operational factors affecting EOC removal. Indicator compounds were of different biodegradability under certain redox conditions and can serve as a proxy for a much larger number of chemicals of comparable biodegradability.

Of the six treatment wetlands investigated, systems with improved oxygen supply showed highest removal of bulk organic matter, ammonium, and EOCs. This was especially true for systems with active aeration (HAp, VAp) and with use of a subsequent sand filter (VGp + VSp). Here, even moderately biodegradable BTZ, DCL, and ACE were removed to >80% during period of highest performance. These systems exceed the removal performance of

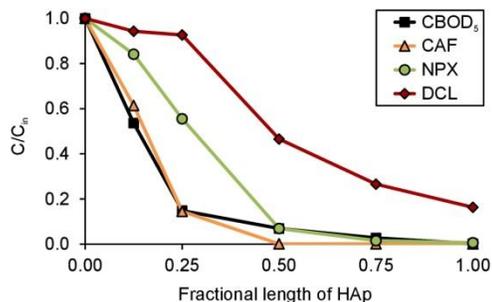


Fig. 4. Relative concentration (C/C_{in}) of CBOD₅, CAF, NPX, and DCL along the flow path in HAp. 0.00: treatment wetland influent, 1.00: treatment wetland effluent. Samples were taken on 4 September 2014.

conventional WWTPs utilizing activated sludge process. However, improved treatment performance of treatment wetlands comes at cost of higher footprint size (VGp + VSp) or increased operation and maintenance effort (HAp, VAp).

Systems exhibiting highest performance in the warm season (June, July 2014) also proved to be the most robust ones and accordingly performed best under less favorable operational conditions in cold season (February, March 2015). Period of highest and lowest performance do not accurately agree with meteorological summer and winter season, nicely illustrating the need for year-round monitoring campaigns. Apart from warmer water temperature, elevated content of dissolved oxygen as well as positive redox potential proved favorable for the removal of EOCs. This applied especially for moderately biodegradable compounds, such as NPX, ACE and BTZ. For the EOCs most difficult to degrade, like DCL, co-occurrence of high oxygen availability in the subsurface and low CBOD₅ content appeared essential for elimination.

In future it may be worthwhile to study the robustness of the different wetlands towards system failures as those lead to much more rapid changes of operational conditions than seasonality.

While there are good reasons to study the behavior of novel EOCs in wastewater treatment systems, routine monitoring should rely on a limited number of representative EOCs. Indicator EOCs, whose behavior in wastewater treatment is well known, help to assess the general performance of wastewater treatment systems. These compounds proved a meaningful addition to conventional water quality parameters and can indicate processes as well as conditions inside a system without need for internal sampling.

Since ACE proved to be biodegradable, an alternative truly persistent EOC may be included in future studies. Oxypurinol or valsartan acid may be used for this purpose (Nödler et al., 2013; Funke et al., 2015; Castronovo et al., 2017).

Acknowledgements

This work was supported in part by funding from the German Ministry of Education and Research (BMBF) within the context of the SMART-MOVE Project: Management of Highly Variable Water Resources in Semi-Arid Regions (FKZ: 02WM1355B). Stefanie Kahl acknowledges the Helmholtz Center for Environmental Research - UFZ and the Helmholtz Interdisciplinary Graduate School for Environmental Research (HIGRADE) for funding and support. The authors acknowledge the Helmholtz Center for Environmental Research (UFZ) Integrated Projects "Urban Transformations" and "Water Scarcity". The authors are particularly grateful to Katy Bernhard for her support in operation and sampling of the facility at Langenreichenbach and to Gabriele Strenge for support in EOC analysis. The authors also thank Monika Möder for the helpful discussions. Grit Weichert, Johannes Boog, Ganbaatar Khurelbaatar, Thomas Aubron, Carola Bönisch, and Karsten Marien are acknowledged for analytical support. Volker Dreher and his team (AZV Heidelberg) are acknowledged for support at the WWTP.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.004>.

References

- Auvinen, H., Havran, I., Hubau, L., Vanseveren, L., Gebhardt, W., Linnemann, V., Van Oirschot, D., Du Laing, G., Rousseau, D.P.L., 2017. Removal of pharmaceuticals by a pilot aerated sub-surface flow constructed wetland treating municipal and hospital wastewater. *Ecol. Eng.* 100, 157–164.
- Avila, C., Nivala, J., Olsson, L., Kassa, K., Headley, T., Müller, R.A., Bayona, J.M., Garcia, J., 2014. Emerging organic contaminants in vertical subsurface flow constructed wetlands: influence of media size, loading frequency and use of active aeration. *Sci. Total Environ.* 494, 211–217.
- Behrends, L.L., 1999. Reciprocating subsurface-flow constructed wetlands for improving wastewater treatment, Google Patents.
- Burke, V., Greskowiak, J., Grunenbaum, N., Massmann, G., 2017. Redox and temperature dependent attenuation of twenty organic micropollutants - a systematic column study. *Water Environ. Res.* 89 (2), 155–167.
- Burke, V., Greskowiak, J., Asmuß, T., Bremermann, R., Taute, T., Massmann, G., 2014. Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Sci. Total Environ.* 482–483 (0), 53–61.
- Castronovo, S., Wick, A., Scheurer, M., Nödler, K., Schulz, M., Ternes, T.A., 2017. Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Res.* 110, 342–353.
- Chen, Y., Vymazal, J., Brezinová, T., Kozeluh, M., Kule, L., Huang, J., Chen, Z., 2016. Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Sci. Total Environ.* 566–567, 1660–1669.
- Falås, P., Wick, A., Castronovo, S., Habermacher, J., Ternes, T.A., Joss, A., 2016. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Res.* 95, 240–249.
- Fernandez-Fontaina, E., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M., 2012. Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Res.* 46 (16), 5434–5444.
- Fernandez-Fontaina, E., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2014. Modelling cometabolic biotransformation of organic micropollutants in nitrifying reactors. *Water Res.* 65, 371–383.
- Fischer, K., Majewsky, M., 2014. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (15), 6583–6597.
- Froehner, S., Piccioni, W., Machado, K.S., Aisse, M.M., 2011. Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment. *Water Air Soil Pollut.* 216 (1–4), 463–471.
- Funke, J., Prasse, C., Eversloh, C.L., Ternes, T.A., 2015. Oxypurinol - a novel marker for wastewater contamination of the aquatic environment. *Water Res.* 74, 257–265.
- Hai, F.L., Li, X., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2011. Removal of carbamazepine and sulfamethoxazole by MBR under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 102 (22), 10386–10390.
- Helsel, D.R., Hirsch, R.M., 2002. *Statistical Methods in Water Resources Techniques of Water Resources Investigations, Book 4, Chapter A3*, U.S. Geological Survey. <https://pubs.usgs.gov/twri/twri4a3/>. (Accessed 29 May 2017).
- Herzog, B., Lemmer, H., Helmreich, B., Horn, H., Mueller, E., 2014. Monitoring benzotriazoles: a 1 year study on concentrations and removal efficiencies in three different wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 69 (4), 710–717.
- Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Bécares, E., Bayona, J.M., 2010. Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Res.* 44 (12), 3669–3678.
- Hoppe-Jones, C., Dickenson, E.R.V., Drewes, J.E., 2012. The role of microbial adaptation and biodegradable dissolved organic carbon on the attenuation of trace organic chemicals during groundwater recharge. *Sci. Total Environ.* 437, 137–144.
- Jekel, M., Dott, W., Bergmann, A., Dünnebier, U., Gnirß, R., Haist-Gulde, B., Hamscher, G., Letzel, M., Licha, T., Lyko, S., Miede, U., Sacher, F., Scheurer, M., Schmidt, C.K., Reemtsma, T., Ruhl, A.S., 2015. Selection of organic process and source indicator substances for the anthropogenically influenced water cycle. *Chemosphere* 125, 155–167.
- Kadlec, R.H., Wallace, S.D., 2009. *Treatment Wetlands*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Knopp, G., Prasse, C., Ternes, T.A., Cornel, P., 2016. Elimination of micropollutants and transformation products from a wastewater treatment plant effluent through pilot scale ozonation followed by various activated carbon and biological filters. *Water Res.* 100, 580–592.
- König, A., Weidauer, C., Seiwert, B., Reemtsma, T., Unger, T., Jekel, M., 2016. Reductive transformation of carbamazepine by abiotic and biotic processes. *Water Res.* 101, 272–280.
- Lahti, M., Oikari, A., 2011. Microbial transformation of pharmaceuticals naproxen, bisoprolol, and diclofenac in aerobic and anaerobic environments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (2), 202–210.
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Sci. Total Environ.* 468, 908–932.
- Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2011. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 45 (16), 5005–5014.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Long Duc, N., Hai, F.L., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473, 619–641.
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., de Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chevre, N., Schaerer, M., Barry, D.A., 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Sci. Total Environ.* 461, 480–498.

- Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J.M., 2008. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* 42 (3), 653–660.
- Matamoros, V., Salvadó, V., 2012. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. *Chemosphere* 86 (2), 111–117.
- Monsalvo, V.M., McDonald, J.A., Khan, S.J., Le-Clech, P., 2014. Removal of trace organics by anaerobic membrane bioreactors. *Water Res.* 49, 103–112.
- Nivala, J., Headley, T., Wallace, S., Bernhard, K., Brix, H., van Afferden, M., Mueller, R.A., 2013a. Comparative analysis of constructed wetlands: the design and construction of the ecotechnology research facility in Langenreichenbach, Germany. *Ecol. Eng.* 61, 527–543.
- Nivala, J., Wallace, S., Headley, T., Kassa, K., Brix, H., van Afferden, M., Mueller, R., 2013b. Oxygen transfer and consumption in subsurface flow treatment wetlands. *Ecol. Eng.* 61, 544–554.
- Nödler, K., Hillebrand, O., Idzik, K., Strathmann, M., Schipperski, F., Zirlwagen, J., Licha, T., 2013. Occurrence and fate of the angiotensin II receptor antagonist transformation product valsartan acid in the water cycle – a comparative study with selected β -blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and aceulfame. *Water Res.* 47 (17), 6650–6659.
- Onesios, K.M., Yu, J.T., Bouwer, E.J., 2009. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation* 20 (4), 441–466.
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathway's and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39 (12), 2654–2664.
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C., Drewes, J.E., 2010. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Res.* 44 (2), 449–460.
- Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., Ventura, F., Knepper, T.P., 2006. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: a European perspective. *Environ. Sci. Technol.* 40 (17), 5451–5458.
- Regnery, J., Wing, A.D., Kautz, J., Drewes, J.E., 2016. Introducing sequential managed aquifer recharge technology (SMART) - from laboratory to full-scale application. *Chemosphere* 154, 8–16.
- Rühmland, S., Wick, A., Ternes, T.A., Barjenbruch, M., 2015. Fate of pharmaceuticals in a subsurface flow constructed wetland and two ponds. *Ecol. Eng.* 80, 125–139.
- Sauvêtre, A., Schroeder, P., 2015. Uptake of carbamazepine by rhizomes and endophytic bacteria of *Phragmites australis*. *Front. Plant Sci.* 6.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313 (5790), 1072–1077.
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2010. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44 (10), 3214–3224.
- Sui, Q., Huang, J., Deng, S.B., Chen, W.W., Yu, G., 2011. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in different biological wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 45 (8), 3341–3348.
- Tran, N.H., Gan, J., Viet Tung, N., Chen, H., You, L., Duarah, A., Zhang, L., Gin, K.Y.-H., 2015. Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes. *Bioresour. Technol.* 197, 329–338.
- Verlicchi, P., Zambello, E., 2014. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. *Sci. Total Environ.* 470, 1281–1306.
- Vieno, N., Sillanpää, M., 2014. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - a review. *Environ. Int.* 69, 28–39.
- Vymazal, J., 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 380 (1–3), 48–65.
- Vymazal, J., 2011. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environ. Sci. Technol.* 45 (1), 61–69.
- Wu, S., Kusch, P., Brix, H., Vymazal, J., Dong, R., 2014. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: a nitrogen and organic matter targeted review. *Water Res.* 57, 40–55.
- Zhang, D.Q., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: a review. *Environ. Pollut.* 184, 620–639.
- Zhang, Y., Geissen, S.-U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73 (8), 1151–1161.
- Zhang, Y., Lv, T., Carvalho, P.N., Zhang, L., Arias, C.A., Chen, Z.H., Brix, H., 2017. Ibuprofen and iohexol removal in saturated constructed wetland mesocosms. *Ecol. Eng.* 98, 394–402.
- Zorita, S., Martensson, L., Mathiasson, L., 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci. Total Environ.* 407 (8), 2760–2770.
- Zwiener, C., Frimmel, F.H., 2003. Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrilic acid, ibuprofen, and diclofenac. *Sci. Total Environ.* 309 (1–3), 201–211.

Supporting Information**Assessing design and operation effects on the performance of subsurface flow wetlands – emerging organic contaminants as indicators**

Stefanie Kahl^a, Jaime Nivala^b, Monika Möder^a, Manfred van Afferden^b, Roland A. Müller^b, Thorsten Reemtsma^{a*}

^a *Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany*

^b *Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Centre for Environmental Biotechnology (UBZ), Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany*

* Corresponding author:

Prof. Thorsten Reemtsma

Department of Analytical Chemistry

Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ

Permoserstrasse 15

04318 Leipzig

Germany

Phone: +49 341 235 1261

E-Mail: thorsten.reemtsma@ufz.de

Table S1

Monthly rainfall and air temperature data at the research site in Langenreichenbach, Germany from June 2014 – May 2015.

Month	Median air temperature (°C)	Minimum air temperature (°C)	Maximum air temperature (°C)	Rainfall (mm/month)
Jun 2014	16	4	36	25
Jul 2014	21	7	38	73
Aug 2014	17	6	33	77
Sep 2014	16	4	30	35
Oct 2014	13	0	25	32
Nov 2014	7	-2	19	8
Dec 2014	3	-8	13	30
Jan 2015	3	-5	15	46
Feb 2015	1	-8	12	4
Mar 2015	6	-5	18	36
Apr 2015	9	-4	23	30
May 2015	13	-1	28	15

Table S2

Optimized mass spectrometer parameters for the analysis of indicator compounds and deuterated internal standards by HPLC-MS/MS (MRM mode).

Analyte	Retention time (min)	Precursor (m/z)	Product (m/z)	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	CXP ^c (V)	Ionization mode
Acesulfame	2.05	161.90	81.90	-50	-20	-13	negative
			77.90	-50	-40	-13	
Acesulfame-d ₄	1.95	165.87	86.10	-25	-20	-7	negative
			78.00	-25	-46	-3	
Benzotriazole	3.73	120.01	65.00	126	29	10	positive
			91.90	126	23	12	
Benzotriazol-d ₄	3.69	124.01	68.00	51	29	10	positive
			69.10	51	33	12	
Caffeine	3.50	194.90	137.90	80	27	8	positive
			110.00	80	31	18	
Caffeine-d ₃	3.47	204.05	144.10	61	31	8	positive
			116.20	61	33	8	
Carbamazepine	4.82	237.04	194.10	106	25	6	positive
			193.10	106	47	8	
Carbamazepine-d ₁₀	4.79	247.02	204.10	71	31	10	positive
			201.00	71	19	6	
Diclofenac	5.83	295.88	252.00	-40	-16	-11	negative
			294.00	-40	-16	-13	
Diclofenac-d ₄	5.80	297.88	254.10	-50	-18	-13	negative
			298.85	-45	-20	-13	
Ibuprofen	5.95	205.08	161.10	-80	-10	-13	negative
			159.10	-80	-10	-13	
Ibuprofen-d ₃	5.92	207.87	163.70	-55	-18	-13	negative
			162.00	-10	-10	-10	
Naproxen	5.26	230.98	185.10	51	19	10	positive
			115.00	51	79	8	
Naproxen-d ₃	5.24	233.97	114.90	36	39	10	positive
			188.20	36	19	8	

^a Depolarization potential

^b Collision energy

^c Cell exit potential

Table S3
Analysis method limits.

Analyte	Limit of detection (LOD)	Limit of quantification (LOQ)
CBOD ₅	-	0.3 mg/L
TOC	-	0.15 mg/L
TN	-	0.02 mg/L
Ammonium	-	0.03 mg/L
Nitrate	-	0.3 mg/L
Nitrite	-	0.02 mg/L
Acesulfame	0.001 µg/L	0.003 µg/L
Benzotriazole	0.11 µg/L	0.34 µg/L
Caffeine	0.19 µg/L	0.49 µg/L
Carbamazepine	0.02 µg/L	0.05 µg/L
Diclofenac	0.12 µg/L	0.32 µg/L
Ibuprofen	0.81 µg/L	1.28 µg/L
Naproxen	0.06 µg/L	0.09 µg/L

EOC quantification and quality control procedure

Determination of LOD and LOQ for indicator EOCs

LOD and LOQ of the actual, non-labelled EOCs could not be determined in real samples, as no effluent sample was free of all analytes. Therefore, the limits of the isotope-labelled standards were determined instead via standard addition of the internal standards to effluent of treatment wetland R. Additionally, samples of unspiked effluent of R were analyzed. LOD corresponded to the mean noise signal intensity in unspiked effluent of R plus three times its standard deviation. For calculation of LOQ, the mean signal intensity in unspiked effluent and nine times its standard deviation were used for calculation of the corresponding concentration.

Calibration

All calibration standards, each prepared in ultrapure water, were analyzed two or three times with every batch of samples to consider the current performance of the instrument on each measuring day. The standards were routinely analyzed at the beginning and the end of a sample batch, and in case of higher sample number also after half of the samples to be measured. Calibration standards were freshly prepared every month and stored in the freezer between measurements.

Calibration was accepted in the range in which the spiked concentration of the standard and the concentration calculated according to the current calibration curve did not differ by more than 20%.

Detection of analytes in samples

For positive detections of analytes in the samples the following criteria had to be fulfilled:

- Peak intensity of the quantifier mass transitions had to have a signal to noise ratio (S/N) of at least five;
- peak intensity of qualifier mass transition had to have S/N of at least three;
- both transitions had to occur at the correct retention time;
- the ratio of the peak area of both mass transitions differed by no more than 20%, at low analyte concentration, peak area difference of up to 50% was accepted;

Possible analyte carry-over on the LC-MS system was checked and avoided via measurements of blank samples (ultrapure water) within each measurement batch.

Instrument precision

Intraday precision was calculated based on analyte peak area determined at least twice in the same calibration standards on the same measurement day. Peak area of these standards usually differed to less than 10%, which applied for each analyte.

As calibration standards were used for a whole month, the same set of calibration standards was analyzed on up to five different days. The interday precision was calculated based on peak areas of these measurements.

Relative standard deviation of peak areas for the individual calibration standards was below 10% for CBZ and DCL, around 10% for NPX and IBU, 15% to 20% for BTZ, and 20% - 30% for ACE. For CAF, relative standard deviation increased with decreasing analyte concentration, resulting in 10% to over 100% relative standard deviation of peak areas determined on different days. The high variation in peak area of ACE and CAF was caused by their relatively broad peak shape. High variation in peak area of these analytes also illustrated that calibrating on each measurement day was reasonable in order to report accurate concentration data.

Every influent and effluent sample was injected twice and the mean concentration was reported for the respective sample and each individual analyte. Difference in calculated concentration between duplicate samples was generally higher if the amount of analyte was close to the LOQ. Nevertheless, calculated concentration of the duplicate samples usually differed by less than 10% and rarely exceeded 20%.

Table S4
Number of corresponding influent-effluent pairs and data points included for calculation of flow, respectively. Data was gathered from June 2014 to May 2015.

	Inflow	Outflow	Redox potential	Dissolved oxygen	CBOD ₅	TOC	TN	NH ₄ -N	NO _x -N	CAF	IBU	NPX	BTZ	DCL	ACE	CBZ
Conventional designs																
H50p	281	281	41	39	41	41	40	41	41	42	42	42	42	42	42	42
VGp	268	268	39	37	37	39	38	39	39	40	40	40	40	40	40	40
VGp+V	268	268	39	37	37	39	37	39	39	40	40	40	40	40	40	40
Sp																
Intensified designs																
VAp	277	277	41	39	41	41	40	41	41	42	42	42	42	42	42	42
HAp	271	271	41	39	41	41	40	41	41	42	42	42	42	42	42	42
R	281	281	41	39	41	41	40	41	41	42	42	42	42	42	42	42

Table S5

Median mass removal (%) of conventional pollutants in the investigated treatment systems during warm season (n = 7) and cold season (n = 5 -8), respectively.

Season	CBOD ₅		TOC		TN		NH ₄ -N	
	warm	cold	warm	cold	warm	cold	warm	cold
Conventional designs								
H50p	93	68	92	71	59	21	51	9
VGp	98	98	94	90	65	31	92	59
VGp+VSp	100	100	97	92	75	35	100	98
Intensified designs								
VAp	99	99	94	92	79	46	100	97
HAp	100	100	94	91	68	36	100	100
R	99	99	95	93	85	51	99	72

6.2. Publikation 2

Emerging biodegradation of the previously persistent artificial sweetener acesulfame

Stefanie Kahl, Sabine Kleinsteuber, Jaime Nivala, Manfred van Afferden, Thorsten Reemtsma

Environmental Science & Technology, **2018**, 52 (5), 2717-2725

Der Artikel ist abrufbar unter:

<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05619>

Erklärung zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Idee, die in Feldstudien beobachtete Entfernung von ACE genauer zu untersuchen, stammt von Prof. Dr. Thorsten Reemtsma und mir. An der Konzeption und Diskussion der mikrobiologischen Experimente war zudem Dr. Sabine Kleinsteuber beteiligt. Die Proben der Kleinkläranlage bzw. der konventionellen kommunalen Kläranlage sowie die konventionellen Abwasserparameter wurden durch das Team des Umwelt- und Biotechnologischen Zentrums (UBZ) bzw. des Abwasserzweckverbandes Heidelberg zur Verfügung gestellt. Alle Laborexperimente (Säulen, Flüssigkulturen) wurden von mir betreut, z. T. mit Unterstützung durch Frau Gabriele Strenge. Die Analyse aller Proben auf ACE erfolgte durch mich und Frau Gabriele Strenge, die Auswertung aller erfassten Parameter durch mich. Prof. Reemtsma und ich holten bei Klärwerksbetreibern ACE-Entfernungsdaten ein. Die Auswertung dieser Daten sowie der Daten zur ACE-Fracht in sächsischen Flüssen (bereitgestellt durch das Sächsische Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie) erfolgte durch mich. Die Probenvorbereitung zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung erfolgte durch Ute Lohse. Die Sequenzierungen wurden z. T. von externen Auftragslaboren durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung dieser Daten nahm Dr. Sabine Kleinsteuber vor, die Ergebnisse diskutierten wir zusammen. Die Idee zum Manuskript hatten Prof. Dr. Thorsten Reemtsma und ich. Bis auf den Methodenteil zur Identifikation der mikrobiellen Gemeinschaft (verfasst von Dr. Sabine Kleinsteuber) wurde das Manuskript von mir erstellt. Die Diskussion der Ergebnisse und die Formulierung des Manuskriptes erfolgten in Zusammenarbeit aller Autoren.

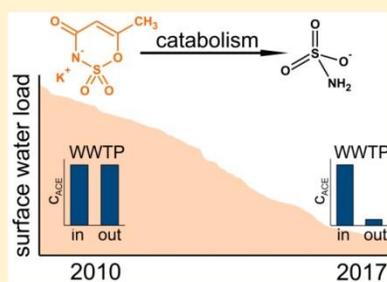
Emerging Biodegradation of the Previously Persistent Artificial Sweetener Acesulfame in Biological Wastewater Treatment

Stefanie Kahl,[†] Sabine Kleinstüber,[‡] Jaime Nivala,[§] Manfred van Afferden,[§] and Thorsten Reemtsma^{*,†}

[†]Department of Analytical Chemistry, [‡]Department of Environmental Microbiology, and [§]Centre for Environmental Biotechnology (UBZ), Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The persistence of acesulfame (ACE) in wastewater treatment (and subsequently the aquatic environment) has led to its use as a marker substance for wastewater input into surface water and groundwater. However, ACE degradation of >85% during summer and autumn was observed in nine German wastewater treatment plants (WWTPs). Annual removal performance was more stable in larger plants, enhanced by low biological oxygen demand and impeded by water temperatures below 10 °C. Literature data suggest that the potential to degrade ACE emerged in WWTPs around the year 2010. This development is ongoing, as illustrated by ACE content in the German rivers Elbe and Mulde: Between 2013 and 2016 the ACE mass load decreased by 70–80%. In enrichment cultures with ACE as sole carbon source the carbonaceous fraction of ACE was removed completely, indicating catabolic biotransformation and the inorganic compound sulfamic acid formed in quantitative amounts. Sequencing of bacterial 16S rRNA genes suggests that several species are involved in ACE degradation, with proteobacterial species affiliated to *Phyllobacteriaceae*, *Methylophilaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, and *Pseudomonas* becoming specifically enriched. ACE appears to be the first micropollutant for which the evolution of a catabolic pathway in WWTPs has been witnessed. It can yet only be speculated whether the emergence of ACE removal in WWTPs in different regions of the world is due to independent evolution or to global spreading of genes or adapted microorganisms.



INTRODUCTION

Acesulfame potassium (ACE), initially named acetosulfam,¹ was developed in the early 1970s.^{2,3} It was first approved as a sweetener in food in the UK in 1983⁴ and in the European Union in 1994.⁵ Apart from food and beverages, the artificial sweetener ACE is used in personal care products, e.g. for oral hygiene, and in pharmaceuticals.^{3,6}

Annual ACE intake of 60–210 mg/kg body weight was reported for European adults,^{7,8} which corresponds to an annual uptake of 4–15 g per capita. This results in high concentrations in municipal wastewater as ACE is not metabolized in the human body and is excreted unchanged via the kidneys.⁹ In Europe, China, and Australia, typically 10–80 µg/L ACE occur in influent of wastewater treatment plants (WWTPs).^{10–14} In the US, India, South Korea, and Singapore, concentrations 1 order of magnitude lower (1–9 µg/L) have been reported.^{15–18} Different influent concentrations are likely due to a different usage pattern in each country as well as to the time and status of approval of different sweeteners.

In 2009, the first study on ACE removal in WWTPs, conducted by Buerge et al.,¹⁰ revealed the persistence of ACE in nine Swiss plants. Since then, several studies have confirmed the recalcitrance of ACE in WWTPs, e.g. in Germany in 2010,¹⁹ in the USA, China, and Singapore in 2013,^{13,15,17} and in

India in 2014.¹⁶ Once discharged, ACE, which is highly hydrophilic, is very mobile in the aquatic environment, and is therefore widely found in surface water, groundwater, and drinking water.^{10,13,20} ACE was even detected in field-grown crops irrigated with treated municipal wastewater,²¹ which, together with detection of ACE in groundwater,^{10,19} illustrates the mobility of ACE in soil environments. As in many studies, natural removal processes, such as biodegradation, hydrolysis, and sorption, were shown to have only a minor impact on ACE concentration in the environment, ACE has been considered as a conservative tracer and is often used as an indicator of wastewater input into aquatic environments.^{10,19,22}

Since 2014 however, an increasing number of lab studies on ACE question its recalcitrance. For example, in laboratory tests with different soils, dissipation of at least 60% of ACE was reported during aerobic incubation over 70 d.²³ Burke et al.²⁴ observed ACE attenuation (ca. 50%) in a laboratory column study using material from the oxic to suboxic zone of a riverbank filtration site. In a nitrifying culture enriched by Tran

Received: November 3, 2017

Revised: January 22, 2018

Accepted: February 8, 2018

Published: February 20, 2018

et al.²⁵ ACE was removed by up to 21% within 7 days. These studies suggest ACE removal to be attributed to biotic processes. Recently, efficient elimination of ACE in wastewater treatment has been reported in different countries.^{11,12,14,26} In laboratory experiments, Castronovo et al.¹¹ could clearly attribute efficient ACE removal in German and Swiss WWTPs to microbial degradation. The authors demonstrated complete ACE elimination under aerobic and anoxic conditions and quantitative transformation of ACE into sulfamic acid (SA). It appears that ACE, which was previously proven to be persistent in biological wastewater treatment, can now be biodegraded in these systems.

The present study sought to identify whether or not the removal of ACE in WWTPs is now a more general trend, in which environmental conditions support biodegradation of ACE, and if microorganisms can use ACE as a sole carbon source. This was done by studying ACE removal in wastewater treatment systems, conducting laboratory experiments using both chemical and microbiological analyses, and by exploiting ACE monitoring data from German WWTPs and surface waters.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. Details on chemicals and reagents are provided in the Supporting Information (SI). Aqueous stock solutions of ACE were used in order to avoid input of other carbon sources.

Site Description and Sampling. In a previous study, treatment performance of a conventional WWTP (16000 population equivalents (PE)) and different treatment wetlands, located at the Research Facility Langenreichenbach (Germany), were investigated from June 2014 to May 2015.²⁷ In the present study, samples from one of these systems, an aerated horizontal flow treatment wetland (TW; subsurface flow, 24 h aeration, 1 m depth, surface area 5.6 m², median inflow rate 0.77 m³/d, planted with *Phragmites australis*) and the adjacent municipal WWTP (aerobic and anaerobic activated sludge treatment, biological and chemical phosphorus precipitation; median inflow rate 1164 m³/d) were considered. Both systems were sampled between July 2014 and June 2015. Additionally, samples from within the TW were taken (May, June 2015; 50% depth; at 12.5%, 25%, 50%, 75% fractional length). The Research Facility shares the raw wastewater with the adjacent municipal WWTP. This wastewater was pretreated in a septic tank preceding the TW. Detailed description of the site and the sample collection is reported elsewhere.^{27,28} Briefly, grab samples of influent (effluent of the preceding septic tank) and effluent of the TW were taken every week. At the conventional WWTP, two consecutive 24 h composite samples (flow-proportional) of influent and effluent were collected in August, October, and December 2014, January, March, May, and June 2015 ($n = 14$) for ACE analysis. Conventional water quality parameters were routinely determined every week in 24 h composites ($n = 51$). Uncertainties related to grab sampling and provisions for reducing their influence are discussed by Kahl et al.²⁷ and can also be found in the SI (chapter 1.2). Air temperature data was collected by an automated onsite weather station.

ACE concentration data from eight other German WWTPs (denoted A–H), located all over the country, was provided by the operating companies and laboratories conducting ACE analysis, respectively. Plants A–D were grouped together because data for the same period was available. For the plants

E–H, data of different periods was supplied. All plants utilize an activated sludge process and treat municipal wastewater. Capacities of the plants were 550 000 PE (A), 30 000 PE (B), and 18 000 PE (C, D) as well as 400 000 PE (E), 250 000 (F), 220 000 PE (G), and 160 000 PE (H).

Biomass for laboratory experiments was obtained as follows. At 50% fractional length (at each sampling point of fractional depth) of the TW, 10 L of water, naturally containing sludge, were taken. The sludge was allowed to settle overnight, then separated from the supernatant, and used as biomass for the laboratory studies. Such biomass sampling was conducted during time of no ACE elimination (April 21, 2015) and efficient ACE elimination (July 7, 2015).

Column Experiments. Biodegradation activity during the cold season was investigated in a column experiment. The column consisted of a dropping funnel (300 mL) filled with gravel (4–8 mm) and sludge sampled from the TW taken on April 21, 2015. The column was operated at room temperature and in the dark. An open flask served as reservoir in order to allow unhindered gas exchange. The supernatant from biomass settling (400 mL) was spiked with 125 µg/L ACE and pumped in an upward flow direction (2 mL/min). After flushing the column with 100 mL of the prepared solution, the remaining volume (300 mL) was recirculated. A more detailed description and a schematic (Figure S1) can be found in the SI.

Enrichment of ACE-Degrading Microorganisms and Biodegradation Tests. Biodegradation of ACE and the microorganisms involved in it were investigated in enrichment cultures. Unless stated otherwise, liquid cultures and agar plates were incubated at 14 °C in the dark. Liquid cultures were agitated at 120–125 rpm, and the ACE concentration was increased successively. Microbial biomass for DNA extraction was harvested by centrifugation.

Biomass (50 mL) taken from the TW on July 7, 2015 was suspended in an equal volume of mineral medium DSMZ 462 (D462, composition see Table S1) and spiked with 125 µg/L ACE (culture I). The culture (35 mL) was transferred twice in fresh D462 with ACE (cultures II, III; details reported in the SI). After two months culture aliquots (culture IV) were plated on selective mineral agar medium (D462, 50 mg/L ACE). The resulting very small colonies were transferred to liquid D462 containing 62 mg/L ACE as mixed cultures (cultures A, B, C). Aliquots of these cultures were later plated on nutrient agar and biomass from each plate was transferred to D462 with 31 mg/L ACE (cultures a, b, and c, respectively; Table S2). After several months (125 mg/L ACE), 20% glycerol was added to aliquots of each culture and stocks were stored at –155 °C. Two months later, one aliquot per glycerol stock was reactivated in D462 with 125 mg/L ACE and incubated at room temperature. Cultures were regularly transferred and incubation temperature was increased to 30 °C. For investigating ACE transformation products, an aliquot of culture B was centrifuged, and cells were washed and resuspended in D462 with 5 g/L ACE. An abiotic control was prepared in parallel. The concentrations of ACE, sulfamic acid (SA), and total organic carbon (TOC) were followed in the supernatant after centrifugation (10 min, 10 620g). A more detailed description of the enrichment procedure can be found in the SI.

Microbial Community Analysis. Total DNA was extracted from cells harvested by centrifugation using the NucleoSpin Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the supplier's manual. Community composition was investigated by amplicon sequencing of

bacterial 16S rRNA genes. PCR products from cultures A–C and a–c generated with primers 27F and 519R were sequenced on the Roche GS Junior platform as described previously,²⁹ while PCR products from cultures I–IV generated with primers 341F and 785R³⁰ were sequenced on the Illumina MiSeq platform. Raw data for cultures A–C and a–c were analyzed with the QIIME pipeline as described by Lucas et al.³¹ with the exception that the MiDAS database³² was used for taxonomic assignment. For cultures I–IV, the SILVA 119 SEED alignment³³ was used for taxonomic assignment. Details on the MiSeq sequencing procedure and data analysis are given in the SI. Demultiplexed sequence reads from each sample were deposited under the study accession number PRJEB24423 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB24423>).

Analytical Methods. Analysis of conventional water quality parameters in the WWTP (five-day carbonaceous biochemical oxygen demand (CBOD₅) and ammonium and nitrate concentration) and TW samples (temperature, redox potential, dissolved oxygen, CBOD₅, and ammonium and nitrate concentration) is described elsewhere.²⁷ ACE was determined using HPLC-MS/MS and quantified via deuterated, internal standards.²⁷ The limit of quantification (LOQ) was 0.003 µg/L (Table S3). In biodegradation studies, TOC was determined in diluted (1:2, ultrapure water) samples using a multi N/C 2100 S analyzer (Analytik Jena AG, Jena, Germany). SA was determined by ion chromatography using a Dionex DX-500 system with conductivity detector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). If necessary, samples were diluted with ultrapure water prior to SA analysis. A more detailed description of the analysis methods is located in the SI.

Data Analysis. For descriptive statistics, single data of ammonium and CBOD₅, below the LOQ (Table S3) were replaced with half of the LOQ. Removal efficiency of the TW was calculated on a mass basis according to eq 1³⁴ with inflow concentration C_{in} (µg/L), outflow concentration C_{out} (µg/L), inflow rate Q_{in} (L/d), and outflow rate Q_{out} (L/d). For calculating annual and monthly removal, annual and monthly median of concentration as well as flow rate was used, respectively. Removal efficiency of WWTPs was calculated based on concentration, according to eq 2.

$$\% \text{ mass removal} = 100 \times \left(\frac{Q_{in} C_{in} - Q_{out} C_{out}}{Q_{in} C_{in}} \right) \quad (1)$$

$$\% \text{ concentration removal} = 100 \times \left(\frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \right) \quad (2)$$

Surface Water Data. Water quality data and flow rates of the German rivers Elbe (sampling stations in Schmilka and Dommitzsch, river kilometers 726 and 557) and Mulde (sampling station in Bad Dübener, river kilometer 67) from 2013 to 2016 were provided by the Saxon State Office for the Environment, Agriculture, and Geology. The river catchments cover 5995 km² (Mulde, Bad Dübener) and 51391 km² to around 55600 km² (Elbe, Schmilka, and Dommitzsch). In both rivers, high water occurred in 2013 and low water in 2015. ACE concentration was determined in the grab samples, and the respective daily flow rates were used to calculate individual mass load; these values were averaged to obtain median annual mass load. Annual median of flow rate as well as concentration and mass load of ACE are exhibited in Table S4.

RESULTS AND DISCUSSION

ACE Removal in Wastewater Treatment. ACE removal was first studied in two different systems treating the same municipal wastewater: An aerated fixed bed reactor with horizontal flow (TW) and the adjacent municipal WWTP.²⁷ Annual median pollutant concentrations and number of samples analyzed are exhibited in Tables S5 and S6, respectively. The annual median concentration of ACE in the effluents of the two systems was comparable (4–5 µg/L), resulting in annual median removal of 78% and 64% in the TW and the WWTP, respectively. However, ACE removal efficiency was highly variable during the year and exhibited a clear seasonal pattern (Figure 1a). In both systems, monthly median

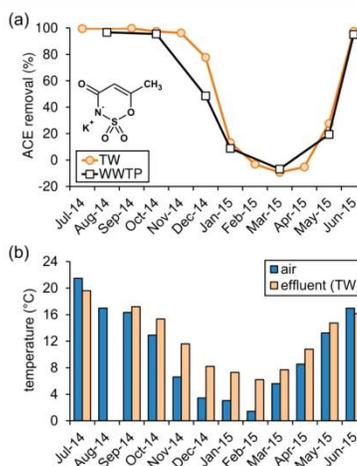


Figure 1. (a) Median monthly acesulfame (ACE) removal in the treatment wetland (TW) and the adjacent municipal wastewater treatment plant (WWTP) along with the chemical structure of ACE. (b) Median monthly temperature of the air and the treatment wetland (TW) effluent. Removal was calculated on a mass basis for the TW and on a concentration basis for the WWTP. TW was not sampled in August 2014 due to construction work at the research facility.

removal exceeded 95% from July to October/November 2014, while less than 15% ACE were removed between January and April 2015. It took until June 2015 for ACE removal to recover. These data show that ACE biodegradation occurs in wastewater treatment but is influenced by temperature, with a pronounced hysteresis (Figure 1b). The removal of other micropollutants, such as the easily biodegradable caffeine, ibuprofen, or naproxen in the TW was hardly affected by temperature (ref 27, system HAp).

To date, ACE removal in WWTPs has not been reported over the course of an entire year. The strong seasonality was therefore unknown. However, data shown in a previous study exhibits a seasonal trend as well:¹¹ In one WWTP, ACE removal increased from 30% in May 2013 to 90% in October, November, and December 2013. It was low (<10%) again in March 2014 but increased until June 2014 (80%). However, the data reported in ref 11 was not taken at regular intervals over the course of an entire year.

ACE Removal Performance of German WWTPs. In order to investigate the seasonality of ACE removal in WWTPs, ACE

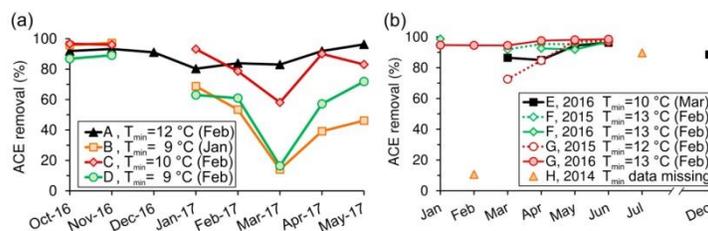


Figure 2. Acesulfame (ACE) removal and minimum median monthly water temperature (T_{min}) in WWTPs (a) A–D from October 2016 to May 2017 and (b) E–H during different periods. WWTPs are divided by time period for which data was available and sorted by decreasing capacity (PE) in each plot.

removal data of eight other German WWTPs was compiled (Figure 2). All WWTPs efficiently eliminated ACE during the Autumn (Figure 2a) and Summer (Figure 2b). Some WWTPs showed efficient ACE elimination throughout the observation period, while in others removal decreased to below 20% in late winter and early spring, respectively (B, D in Figure 2a; H in Figure 2b), with re-establishment of full ACE removal taking several weeks.

Data shown in Figure 2 suggest seasonality to be more pronounced for smaller WWTPs: In larger plants with a capacity of more than 200 000 PE (A, E–G), ACE removal was efficient (>80%) throughout the year. Noticeable seasonality in ACE removal occurred in WWTPs with capacity of 160 000 PE or less (B–D, H), which can again be attributed to the water temperature (Figure 2a). In plant A, which showed the lowest seasonality of A–D, the minimum monthly median water temperature was 12 °C (February). In plant C, which showed more pronounced seasonality in ACE removal, a minimum monthly median water temperature of 10 °C was recorded (January, February). In the plants B and D, this temperature was 9 °C (January, February) and strong seasonality occurred, with ACE elimination of <20% in March (Figure 2a). Although the differences in the minimum monthly water temperature between the plants A–D were small, ACE degradation was highly affected. When water temperatures below 9–10 °C were sustained over a longer period (weeks), ACE removal decreased drastically. This is in agreement with data presented in Figure 1 and supported by water temperature data and ACE removal in plants E–H (Figure 2b). The WWTPs E, F, and G always exhibited ACE removal of greater than 85%, with minimum monthly median water temperatures of 10, 13, and 12 °C, respectively. ACE removal of only 73% in plant G in March 2015 was likely due to ongoing establishment of ACE removal potential, as the minimum median monthly water temperature was as high as 12 °C (February). ACE removal of only 11% in February 2014 in plant H was likely due to temperatures below 10 °C in previous months (data missing).

Beneficial Conditions for ACE Elimination. The seasonality of ACE removal observed for the aerated TW (Figure 1a) is also visible from ACE concentration profiles within the system (Figure 3a). While no removal was noticeable in early May 2015, slight removal occurred at the end of the TW in mid-May. Until the end of June, ACE removal efficiency was re-established and the zone of ACE degradation shifted upstream, until, on 30 June, elimination started between 25% and 50% of the fractional length (Figure 3a). From May to June 2015, water temperature inside the system increased from 16 to 19 °C. These changes were not observed for any other operational

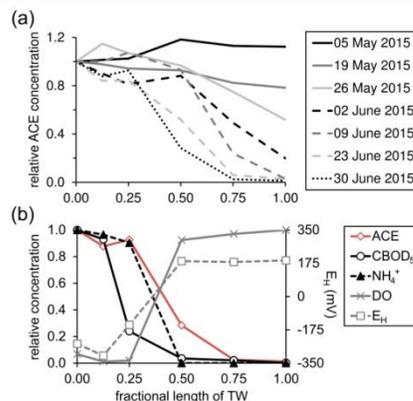


Figure 3. (a) Relative concentration (C/C_{in}) of ACE from May to June 2015 inside the treatment wetland (TW). (b) Relative concentration (C/C_{in}) of ACE, five-day carbonaceous biochemical oxygen demand (CBOD₅), ammonium (NH₄⁺), dissolved oxygen (DO), and redox potential (E_H) in samples taken on June 30, 2015: influent 0.00, effluent 1.00 fractional length.

parameter (dissolved oxygen, redox potential, pH, electrical conductivity), confirming that the recovery of ACE removal was temperature-driven. However, the recovery of ACE degradation was slow. It occurred only in May (Figure 3a), while the threshold temperature of 9–10 °C was exceeded already between March and mid-April. Temperature dependence of ACE removal was also reported by Burke et al.^{24,35} in laboratory column experiments, in which ACE was eliminated at 20–21 °C, but not at 6 °C. Also other lab experiments reporting ACE removal were performed at ≥ 20 °C.^{11,23}

To validate that ACE biodegradation activity is restored by temperature increase, sludge extracted from the TW during a period of no observable ACE removal (21 April 2015, Figure 1) was utilized in a laboratory column experiment operated at room temperature. Within 47 days, 66% of around 40 $\mu\text{g/L}$ ACE originating from the matrix and 125 $\mu\text{g/L}$ added ACE was removed (Figure S2). Thus, ACE transforming microorganisms were present but inactive in the TW during the cold season. In follow-up experiments with elevated ACE concentration, the removal rate increased, reflecting adaptation of the microbial community (data not shown).

According to the concentration profiles in the aerated TW during the period of high performance (June 30, 2015), ACE

removal did not start until at least 25% length of the system was passed (Figure 3b). Obviously, other parameters besides temperature affect ACE biodegradation. In the zone of effective ACE removal (25–75% fractional length) the initial CBOD₅ content was reduced by 76–98% (8 mg/L remaining at 75% length), while the redox potential and dissolved oxygen concentration markedly increased (Figure 3b). This suggests that ACE removal is most efficient under conditions of low biodegradable organic carbon and high oxygen availability. Such conditions prevailed at the end of the wetland throughout the year (see annual median effluent quality, Table S5). This also explains why re-establishment of ACE degradation started from the end of the TW and moved forward (Figure 3a) rather than the other way around and again points out the importance of mesophilic temperatures. Low organic carbon content is also beneficial for ammonium oxidation (Figure 3b), which might suggest a correlation between nitrification and ACE removal, as postulated by Tran et al.²⁵ Dedicated experiments could, however, not confirm this hypothesis.¹¹

Low organic carbon content and oxic conditions also prevailed in previous laboratory experiments with successful ACE degradation, e.g. in column experiments^{24,35,36} as well as with biomass in suspension.¹¹ ACE degradation was not observed in experiments that did not meet these conditions, e.g. in oxic soil columns fed with untreated wastewater¹⁰ or with elevated contents of dissolved organic carbon³⁷ as well as in nitrate reducing (zones of) soil columns with elevated organic carbon content.^{35,36} However, ACE removal has also been reported for nitrate reducing conditions with low background organic carbon content.^{11,24}

Microbial ACE Degradation. Microorganisms Involved in ACE Biodegradation. Precipitated suspended sludge from the TW, sampled during a period of efficient ACE removal (7 July 2015), served as inoculum for enrichment experiments. The microbial communities in this biomass and the enrichment cultures, which all showed ACE degradation activity until the end of the study, were compared with respect to their composition to reveal which microbial species were enriched and could be the ones utilizing ACE. The detailed taxonomic composition is listed in the SI (Tables S7, S8). From raw sludge (culture I) over the subsequent transfer cultures II and III to the second transfer culture after several weeks of incubation (culture IV) the relative abundance of *Alpha*- and *Beta*proteobacteria increased (Figure 4a) due to a significant enrichment of *Phyllobacteriaceae* and *Methylophilaceae*, respectively (Figure 4b). Both families represent less than 1% of the total sequences in culture I, but together account for 41% in culture IV. Aliquots from culture IV were streaked on selective mineral agar medium containing ACE in order to isolate single pure cultures. However, none of the very small resulting colonies showed ACE removal after transfer to liquid mineral medium with ACE as sole carbon source, suggesting that ACE degradation might be either performed by multiple species rather than a single one or by bacteria that did not grow on agar plates. Therefore, representatives of the different colonies were transferred to liquid mineral medium as mixed culture. The resulting ACE degrading cultures A, B, and C showed a significantly reduced microbial diversity (Figure 4a, b): *Beta*proteobacteria and, accordingly, *Methylophilaceae* abundance decreased to below 0.5% while *Alpha*- and *Gammaproteobacteria* accounted for 97–99% of the total sequences. The relative abundance of *Alphaproteobacteria* increased due to the enrichment of *Phyllobacteriaceae* and *Bradyrhizobiaceae*, while

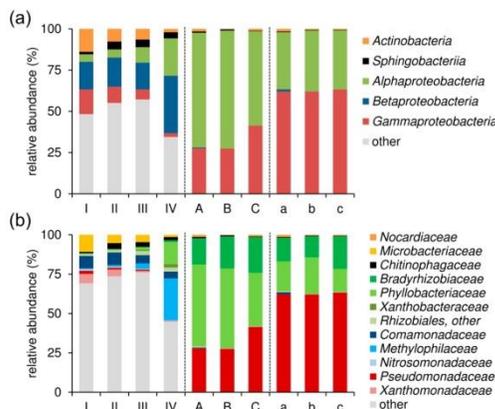


Figure 4. Bacterial community composition according to 16S rRNA gene sequences (a) on a class level and (b) on a family level. Taxa with relative abundances of less than 1% in all samples and taxa not found in samples A–C and a–c are summarized to “other”. The complete taxonomic composition can be found in Tables S7 and S8. (I) Original sludge from the treatment wetland (Jul 7, 2015, 20 °C, 24 µg/L ACE). (II) Biomass after first transfer (Aug 13, 2015, 14 °C, 6 mg/L ACE). (III) Biomass after second transfer (Oct 8, 2015, 14 °C, 31 mg/L ACE). (IV) Biomass of culture III after 54 days of incubation (Dec 1, 2015, 14 °C, 125 mg/L ACE). (A–C) Biomass from liquid cultures after selective mineral agar passage of IV (14 °C, 50 mg/L ACE), reactivation of glycerol stocks, and one transfer (Mar 2, 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE). (a–c) Biomass of liquid cultures prepared after nutrient agar plate passage (14 °C) of A–C, reactivation of glycerol stocks, and one transfer step (Mar 2, 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE).

the share of *Gammaproteobacteria* was higher due to the increased abundance of *Pseudomonadaceae*. In a further attempt to isolate pure cultures, cultures A–C were streaked on nutrient agar. As the isolation of liquid pure cultures able to degrade ACE failed, the total biomass of each initial plate was resuspended in liquid mineral medium with ACE as sole carbon source. This passage caused a further enrichment of *Pseudomonadaceae* and depletion of *Phyllobacteriaceae* (Figure 4b).

The observed community shifts suggest *Phyllobacteriaceae* to be involved in metabolization of ACE (Figure 4b). Pronounced enrichment of *Methylophilaceae* from culture I to IV as well as *Bradyrhizobiaceae* from culture III to IV and IV to A–C indicated that these families might also be relevant for ACE degradation. In general, the enrichment experiments might have discriminated (other) species involved in ACE degradation in the TW, as culture conditions were not suitable for all organisms. This is illustrated by the significant reduction of microbial diversity after the first agar passage and might explain the different patterns of *Methylophilaceae* and *Bradyrhizobiaceae*.

It was not possible to isolate pure cultures capable of growing on ACE, implying that ACE catabolism is not performed by a single species. Sharing of the carbon flow during ACE degradation among different community members is conceivable. The observed enrichment of *Pseudomonadaceae* from culture IV to A–C and further increase in cultures a–c might be due to their better adaptation to growth on agar. During nutrient agar passage copiotrophic organisms could out-compete oligotrophic or slow-growing ones, which could

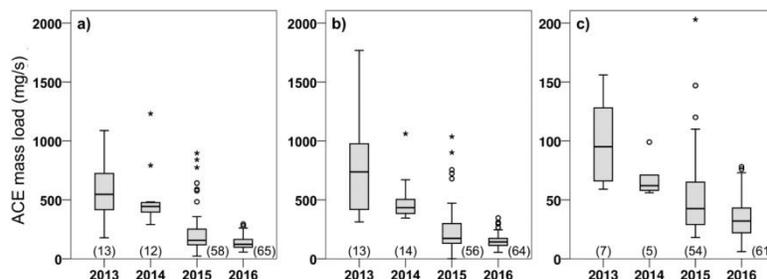


Figure 5. Mass load of acesulfame (ACE) in the rivers Elbe and Mulde from 2013 to 2016 at the sampling stations (a) Schmilka (Elbe), (b) Dommitzsch (Elbe), and (c) Bad Dübren (Mulde). Single data points were calculated from ACE concentrations in grab samples and the respective daily water flow rate; number of samples analyzed for ACE in each year is given in brackets. In each plot one outlier in 2013 is not shown: (a) 2280, (b) 2717, (c) 560 mg/s.

explain increased shares of *Pseudomonadaceae* and decreased abundance of *Phyllobacteriaceae* in cultures a–c compared to A–C. Assuming that the first degradation step can only be performed by an oligotrophic, slow-growing specialist, while metabolites of ACE biotransformation can be consumed by various species, the community shifts after agar passages might be also explained by horizontal gene transfer (HGT). Genes encoding the first step of the ACE transformation pathway might have been received from an ACE-degrading specialist that was eventually outcompeted after the agar transfer. HGT is commonly anticipated as a natural mechanism contributing to evolution and spread of new metabolic pathways for xenobiotics.^{38–41} The fact that ACE degradation only occurred under conditions of low organic carbon content further suggests an oligotrophic species to play a key role in ACE degradation.

Phyllobacteriaceae, *Methylophilaceae*, and *Bradyrhizobiaceae* are common in wastewater and soil,^{42–46} which might facilitate the prevalence and fast spread of ACE elimination in wastewater treatment. Some species also play a role in denitrification^{42,47,48} and might therefore degrade ACE under anoxic conditions, as e.g. observed by Castronovo et al.¹¹

Evidence for Catabolic Biodegradation. After successful enrichment of ACE degrading microbial communities, the biodegradation of ACE was studied in the enrichment culture with the highest ACE removal rate (B in Figure 4). Washed cells were incubated in liquid mineral medium containing 25 mM ACE (5 g/L) as sole carbon source. Within 28 days more than 99% of ACE and TOC was removed (Figure S3), indicating mineralization of the carbonaceous fraction of ACE. Simultaneously, stoichiometric amounts of the inorganic compound sulfamic acid were formed. No removal of ACE was observed in the abiotic control. Formation of sulfamic acid from ACE is in agreement with findings of Castronovo et al.¹¹ Experiments performed in the present study moreover indicate catabolic transformation of ACE: ACE was repeatedly removed during enrichment steps (transfer, ACE concentration increase) despite being the only carbon source and TOC was quantitatively removed.

The pathway along which ACE is biodegraded to sulfamic acid is still unknown.¹¹ Based on the structure of ACE (Figure 1a) it is reasonable to assume that the cleavage of the ring system by either hydrolytic or oxidative enzymes is the initial and probably the only critical step in ACE biodegradation. The resulting (carbonaceous) cleavage product with four linearly

arranged carbons should be easily accessible to mineralization by existing enzymatic systems. Under conditions of limited organic carbon (CBOD₅) the energy yield of ACE mineralization may be beneficial enough to allow for the difficult ring cleavage. This would explain why ACE removal was only observed under conditions of low CBOD₅.

ACE Concentration in Surface Water. The data of this study and recent literature strongly suggest that ACE is now widely eliminated in WWTPs in Germany (Figures 1 and 2), at least in warm months, while this was not the case in the past. This developing removal of ACE in WWTPs should also be visible in surface waters. Data provided for the German rivers Mulde and Elbe for the period 2013–2016 indeed show a decrease of the ACE mass load in surface waters (Figure 5, Table S4): The annual median mass load of ACE gradually decreased from 17–23 t/y (Elbe) and 3.0 t/y (Mulde) in 2013 to 3.9–4.5 and 1.0 t/y in 2016. This corresponds to a reduction of around 80% in the Elbe and 70% in the Mulde river. At the sampling sites the two rivers have catchment sizes of 51 000–56 000 km² (Elbe at Schmilka, Dommitzsch) and 6000 km² (Mulde at Bad Dübren).

Unfortunately, reliable long-term data on ACE consumption or continuous data on ACE concentration in influent and effluent of WWTPs from 2010 until today are not available. It can therefore not completely be ruled out that decreasing mass loads in Elbe and Mulde were due to decreasing ACE consumption rather than to the gradually developing ACE degradation ability in WWTPs. However, a decrease in ACE consumption of 70–80% between 2013 and 2016 is rather unlikely. Nonalcoholic beverages were consistently reported as a major food group contributing to ACE intake (37–68%) among European adults.^{7,8,49} Between 2010 and 2016 consumption of low-calorie beverages in Germany was almost stable,⁵⁰ and no indication could be found that ACE was replaced by other artificial sweeteners to a substantial extent in food and beverages. Moreover, WWTP influent concentrations of ACE in the present study (10–70 µg/L) correspond well with influent concentrations reported for other WWTPs in Germany and Switzerland in 2008 (12–43 µg/L),¹⁰ in 2010 (8–37 µg/L),¹⁹ as well as with more recent data (20–80 µg/L).¹¹ This suggests that ACE consumption in Germany did not decrease significantly in recent years. It is therefore very likely that decreasing ACE loads in the rivers Elbe and Mulde (Figure 5) reflect the increasing ACE removal efficiency in the WWTPs discharging into these rivers. Nevertheless, ACE can still be

detected in the low microgram per liter range in Mulde and Elbe, illustrating that ACE removal in WWTPs is still not complete.

In 2015 and 2016 sampling frequency in the rivers Elbe and Mulde was high enough to check for seasonal trends in ACE mass load. Besides the ongoing interannual trend of decreasing ACE mass load, noticeably elevated loads are visible in late winter/spring in both catchments in 2016 (Figure S4). The median ACE mass loads between February and April 2016 in Elbe (Domnitzsch, 208 mg/s) and Mulde (Bad Dübren, 42 mg/s) were twice as high as the mass loads between July and September (94 and 19 mg/s). These seasonal differences, though not very pronounced, could be attributed to the seasonality in ACE removal in (smaller) WWTPs, as decreased removal efficiency in winter/spring (Figures 1a and 2) results in an elevated discharge of ACE into receiving waters. For 2015, seasonal differences in ACE mass load were less pronounced (Figure S4), which may reflect less effective average removal in WWTPs in the warm season of 2015 compared to 2016.

Development of ACE Removal in WWTPs. The results shown above (Figures 1, 2, and 5) along with literature data^{11,19,20,51} suggest that the potential to catabolize ACE emerged in different WWTPs in Germany within the past decade. Biological wastewater treatment technology has not substantially changed during this period, so that suitable conditions for ACE degradation (low CBOD₅, high oxygen availability, mesophilic temperature range) were present already in the past. It is therefore very likely that the persistency of ACE in wastewater treatment reported in older studies was due to the absence of microbial strains capable of ACE degradation rather than due to inappropriate operational conditions. ACE appears to be the first organic micropollutant for which the evolution of degradation pathway(s) is reported in WWTPs.

The exact time period during which ACE degradation capability emerged in WWTPs is, unfortunately, not documented. Continuous long-term monitoring data for ACE in influent and effluent of WWTPs dating back to periods of no elimination could not be found. However, available literature allows narrowing down the time period during which the capability to degrade ACE developed. ACE was proven to be persistent in 2008 in Swiss¹⁰ and in 2010 in German WWTPs.¹⁹ However, one Swiss WWTP was reported to eliminate ACE to more than 50% in 2008;¹⁰ in 2009 about 40% removal was observed in a German WWTP;²⁰ and in 2012/2013 average ACE removal of 15–57% occurred in six WWTPs in Germany.⁵² Castronovo et al.¹¹ recently reported 59–97% removal in 13 German and Swiss WWTPs (samples likely originating from 2012–2014). The wider scatter and lower extent of removal reported in these studies compared to data of the present study (2014–2017; Figures 1 and 2) suggest that the potential of German and Swiss WWTPs to degrade ACE started to develop between 2008 and 2012/2013. The mass load data for the German rivers Elbe and Mulde (Figure 5) illustrate that this development is still ongoing.

The potential to degrade ACE also emerged in WWTPs of other regions of the world. In a Chinese study persistence of ACE was reported in 2011,¹³ while 90% removal was reported for nine plants in 2015/2016.¹⁴ In an Australian WWTP, ACE removal of 90% was observed in 2012.¹² Compared to what is known from Europe this is a very early example of almost complete ACE removal; it may be explainable by higher water temperature in the subtropical climate of Queensland, Australia.

Studies stating persistence of ACE in WWTPs are based on results obtained from samples taken until 2014. One may speculate that degradation of ACE in WWTPs is now establishing worldwide, provided that the operational conditions are suitable. However, this remains to be proven.

Open Questions. The presented data suggests that efficient ACE biodegradation pathway(s) evolved and established in wastewater treatment facilities within two decades of its widespread use. Whereas the evolution of microbial degradation of xenobiotics has been occasionally observed, with the herbicide atrazine being a prominent example,^{53,54} ACE appears to be the first micropollutant for which such a process is witnessed in WWTPs. The comparatively high concentrations of ACE compared to other organic micropollutants and the fact that ACE is nontoxic might have facilitated this evolution. It will be interesting to learn whether ACE is, indeed, unique in terms of microbial adaptation in wastewater treatment systems or whether such phenomena have previously been overlooked.

It is striking that microbial degradation of ACE occurred almost simultaneously in WWTPs in different regions of the world. Whether the potential to degrade ACE evolved independently in different regions or by global distribution of the respective organisms or genes remains to be clarified in future studies.

The current knowledge on the degradation pathway of ACE is still fragmentary and to date nothing is known about the genetic background or enzymes metabolizing ACE as well as their natural substrates. It is also not clear yet if the same degradation pathway(s) or microbial communities are responsible for ACE degradation in different WWTPs. Dedicated studies on the composition of ACE degrading microbial communities from different locations, the respective key enzymes, and intermediates are therefore of interest.

Despite effective degradation of ACE in many WWTPs, its mineralization after discharge in surface waters or the subsurface has not been reported yet. Lower concentrations in these environments may hamper or delay the development of the potential to degrade ACE. However, now that ACE degraders established in WWTPs one may assume that ACE degradation will spread into other environmental compartments that are continuously exposed to ACE and with low availability of biodegradable organic carbon, sufficient oxygen supply, and a suitable temperature regime. Answers to some of the questions mentioned above would increase the chance to follow evolution of ACE biodegradation also in the environment.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.est.7b05619.

Additional experimental and analytical details, annual water quality data of the TW and WWTP (Langenreichenbach), detailed taxonomic composition of the mixed cultures, and ACE mass load in the rivers Elbe and Mulde in 2015 and 2016, Figures S1–S4, and Tables S1–S8 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: thorsten.reemtsma@ufz.de (T.R.).

ORCID 

Stefanie Kahl: 0000-0001-8402-5771

Thorsten Reemtsma: 0000-0003-1606-0764

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Parts of this work were funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF) within the context of the SMART-MOVE Project: Management of Highly Variable Water Resources in Semi-Arid Regions (FKZ: 02WM1355B). We are particularly grateful to Gabriele Streng for operating the column experiments and for ACE analyses. The teams of the UFZ departments involved are kindly acknowledged for analytical and technical support. We thank the "Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft" for pollutant monitoring in surface water and Sylvia Rohde (Saxon State Office for the Environment, Agriculture, and Geology) for providing the surface water data. We also acknowledge WWTP operating companies for supplying ACE concentration and other data as well as for their agreement to publication. The helpful criticism and suggestions of three anonymous reviewers are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Clauss, K.; Lück, E.; von Rymon Lipinski, G.-W. Acetosulfam, a new sweetener. 1. synthesis and properties. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1976**, *162* (1), 37–40.
- Clauss, K.; Jensen, H. Oxathiazinone Dioxides- A New Group of Sweetening Agents. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1973**, *12* (11), 869–876.
- von Rymon Lipinski, G.-W. The New Intense Sweetener Acesulfame K. *Food Chem.* **1985**, *16* (3–4), 259–269.
- The Sweeteners in Food Regulations*, No. 1211; HMSO: London, 1983.
- European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on sweeteners for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Communities* **1994**, *L 237*, 3–12.
- National Archives and Records Administration. *Federal Register* **1988**, *53* (145), 28363–28626.
- Vin, K.; Connolly, A.; McCaffrey, T.; McKevitt, A.; O'Mahony, C.; Prieto, M.; Tennant, D.; Hearty, A.; Volatier, J. L. Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK and Ireland as part of the FACET project. *Food Addit. Contam., Part A* **2013**, *30* (12), 2050–2080.
- Huvaere, K.; Vandevijvere, S.; Hasni, M.; Vinkx, C.; Van Loco, J. Dietary intake of artificial sweeteners by the Belgian population. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29* (1), 54–65.
- Volz, M.; Christ, O.; Eckert, H. G.; Herok, J.; Kellner, H.-M.; Rupp, W. Kinetics and biotransformation of acesulfame K. In *Acesulfame-K*; Mayer, D. G., Kemper, F. H., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991.
- Buerge, I. J.; Buser, H.-R.; Kahle, M.; Mueller, M. D.; Poiger, T. Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (12), 4381–4385.
- Castronovo, S.; Wick, A.; Scheurer, M.; Nödler, K.; Schulz, M.; Ternes, T. A. Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Res.* **2017**, *110*, 342–353.
- Cardenas, M. A. R.; Ali, I.; Lai, F. Y.; Dawes, L.; Thier, R.; Rajapakse, J. Removal of micropollutants through a biological wastewater treatment plant in a subtropical climate, Queensland-Australia. *J. Environ. Health Sci. Eng.* **2016**, DOI: 10.1186/s40201-016-0257-8.
- Gan, Z. W.; Sun, H. W.; Feng, B. T.; Wang, R. N.; Zhang, Y. W. Occurrence of seven artificial sweeteners in the aquatic environment and precipitation of Tianjin. *Water Res.* **2013**, *47* (14), 4928–4937.
- Yang, Y.-Y.; Liu, W.-R.; Liu, Y.-S.; Zhao, J.-L.; Zhang, Q.-Q.; Zhang, M.; Zhang, J.-N.; Jiang, Y.-X.; Zhang, L.-J.; Ying, G.-G. Suitability of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) as wastewater indicators in the Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Environ.* **2017**, *590*, 611–619.
- Subedi, B.; Kannan, K. Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (23), 13668–13674.
- Anumol, T.; Vijayanandan, A.; Park, M.; Philip, L.; Snyder, S. A. Occurrence and fate of emerging trace organic chemicals in wastewater plants in Chennai, India. *Environ. Int.* **2016**, *92–93*, 33–42.
- Tran, N. H.; Gan, J.; Nguyen, V. T.; Chen, H.; You, L.; Duarah, A.; Zhang, L.; Gin, K. Y.-H. Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes. *Bioresour. Technol.* **2015**, *197*, 329–338.
- Ryu, J.; Oh, J.; Snyder, S. A.; Yoon, Y. Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant (Seoul, South Korea). *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186* (5), 3239–3251.
- Scheurer, M.; Storck, F. R.; Graf, C.; Brauch, H.-J.; Ruck, W.; Lev, O.; Lange, F. T. Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment. *J. Environ. Monit.* **2011**, *13* (4), 966–973.
- Scheurer, M.; Brauch, H. J.; Lange, F. T. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394* (6), 1585–1594.
- Riemenschneider, C.; Al-Raggad, M.; Moeder, M.; Seiwert, B.; Salameh, E.; Reemtsma, T. Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (29), 5784–5792.
- Liu, Y.; Blowes, D. W.; Groza, L.; Sabourin, M. J.; Ptacek, C. J. Acesulfame-K and pharmaceuticals as co-tracers of municipal wastewater in a receiving river. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2014**, *16* (12), 2789–2795.
- Buerge, I. J.; Keller, M.; Buser, H. R.; Müller, M. D.; Poiger, T. Saccharin and Other Artificial Sweeteners in Soils: Estimated Inputs from Agriculture and Households, Degradation, and Leaching to Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (2), 615–621.
- Burke, V.; Greskowiak, J.; Asmuth, T.; Bremermann, R.; Taute, T.; Massmann, G. Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Sci. Total Environ.* **2014**, *482–483* (0), 53–61.
- Tran, N. H.; Nguyen, V. T.; Uruse, T.; Ngo, H. H. Role of nitrification in the biodegradation of selected artificial sweetening agents in biological wastewater treatment process. *Bioresour. Technol.* **2014**, *161*, 40–46.
- Falás, P.; Wick, A.; Castronovo, S.; Habermacher, J.; Ternes, T. A.; Joss, A. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Res.* **2016**, *95*, 240–249.
- Kahl, S.; Nivala, J.; van Afferden, M.; Müller, R. A.; Reemtsma, T. Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators. *Water Res.* **2017**, *125*, 490–500.
- Nivala, J.; Headley, T.; Wallace, S.; Bernhard, K.; Brix, H.; van Afferden, M.; Mueller, R. A. Comparative analysis of constructed wetlands: The design and construction of the ecotechnology research facility in Langenreichenbach, Germany. *Ecological Engineering* **2013**, *61*, 527–543.
- Ziganshin, A. M.; Liebetrau, J.; Proter, J.; Kleinstaub, S. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (11), 5161–5174.
- Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Gloeckner, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA

gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (1), e1.

(31) Lucas, R.; Kuchenbuch, A.; Fetzer, I.; Harms, H.; Kleinsteuber, S. Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, DOI: 10.1093/femsec/fiv004.

(32) McLroy, S. J.; Saunders, A. M.; Albertsen, M.; Nierychlo, M.; McLroy, B.; Hansen, A. A.; Karst, S. M.; Nielsen, J. L.; Nielsen, P. H. MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database* **2015**, *2015*, bav062.

(33) Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glockner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), D590–D596.

(34) Kadlec, R. H.; Wallace, S. D. *Treatment wetlands*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009.

(35) Burke, V.; Greskowiak, J.; Grunenbaum, N.; Massmann, G. Redox and temperature dependent attenuation of twenty organic micropollutants – A systematic column study. *Water Environ. Res.* **2017**, *89* (2), 155–167.

(36) Regnery, J.; Wing, A. D.; Alidina, M.; Drewes, J. E. Biotransformation of trace organic chemicals during groundwater recharge: How useful are first-order rate constants? *J. Contam. Hydrol.* **2015**, *179* (0), 65–75.

(37) Storck, F. R.; Skark, C.; Remmler, F.; Brauch, H. J. Environmental fate and behavior of acesulfame in laboratory experiments. *Water Sci. Technol.* **2016**, *74* (12), 2832–2842.

(38) Top, E. M.; Springael, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14* (3), 262–269.

(39) Springael, D.; Top, E. M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends Microbiol.* **2004**, *12* (2), 53–58.

(40) Janssen, D. B.; Dinkla, I. J. T.; Poelarends, G. J.; Terpstra, P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7* (12), 1868–1882.

(41) van der Meer, J. R.; Senthil, V. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14* (3), 248–254.

(42) Willems, A. The Family Phyllobacteriaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*; Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin Heidelberg, 2014; pp 355–418.

(43) Doronina, N.; Kaparullina, E.; Trotsenko, Y. The Family Methylophilaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*; Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin Heidelberg, 2014; pp 869–880.

(44) Eyice, O.; Namura, M.; Chen, Y.; Mead, A.; Samavedam, S.; Schaefer, H. SIP metagenomics identifies uncultivated *Methylophilaceae* as dimethylsulphide degrading bacteria in soil and lake sediment. *ISME J.* **2015**, *9* (11), 2336–2348.

(45) Wang, X.; Hu, M.; Xia, Y.; Wen, X.; Ding, K. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78* (19), 7042–7047.

(46) Sait, M.; Hugenholtz, P.; Janssen, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* **2002**, *4* (11), 654–666.

(47) Rissanen, A. J.; Ojala, A.; Fred, T.; Toivonen, J.; Tirola, M. *Methylophilaceae* and *Hyphomicrobium* as target taxonomic groups in monitoring the function of methanol-fed denitrification biofilters in municipal wastewater treatment plants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44* (1), 35–47.

(48) Kalyuzhnaya, M. G.; Martens-Habbena, W.; Wang, T.; Hackett, M.; Stolyar, S. M.; Stahl, D. A.; Lidstrom, M. E.; Chistoserdova, L. *Methylophilaceae* link methanol oxidation to denitrification in fresh-

water lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. *Environ. Microbiol. Rep.* **2009**, *1* (5), 385–392.

(49) Le Donne, C.; Mistura, L.; Gosciniy, S.; Janvier, S.; Cuyppers, K.; D'Addezio, L.; Sette, S.; Catasta, G.; Ferrari, M.; Piccinelli, R.; Van Loco, J.; Turrini, A. Assessment of dietary intake of 10 intense sweeteners by the Italian population. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *102*, 186–197.

(50) Association of the German Non-alcoholic Beverage Industry (Wirtschaftsvereinigung Alkoholfreie Getränke e.V.). www.wafg.de/fileadmin/pdfs/Pro-Kopf-Verbrauch.pdf (accessed June 2017).

(51) Jekel, M.; Dott, W.; Bergmann, A.; Dünnbier, U.; Gnirß, R.; Haist-Gulde, B.; Hamscher, G.; Letzel, M.; Licha, T.; Lyko, S.; Miehe, U.; Sacher, F.; Scheurer, M.; Schmidt, C. K.; Reemtsma, T.; Ruhl, A. S. Selection of organic process and source indicator substances for the anthropogenically influenced water cycle. *Chemosphere* **2015**, *125* (0), 155–167.

(52) LUBW. *Spurestoffinventar der Fließgewässer in Baden-Württemberg-Ergebnisse der Beprobung von Fließgewässern und Kläranlagen 2012/2013*; Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg: Karlsruhe, 2014.

(53) Shapir, N.; Mongodin, E. F.; Sadowsky, M. J.; Daugherty, S. C.; Nelson, K. E.; Wackett, L. P. Evolution of catabolic pathways: Genomic insights into microbial *s*-triazine metabolism. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (3), 674–682.

(54) Devers, M.; Rouard, N.; Martin-Laurent, F. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10* (3), 676–684.

Supporting Information

Emerging biodegradation of the previously persistent artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment

Stefanie Kahl^a, Sabine Kleinsteuber^b, Jaime Nivala^c, Manfred van Afferden^c,
Thorsten Reemtsma^{a*}

^a Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Analytical Chemistry, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

^b Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Environmental Microbiology, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

^c Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Centre for Environmental Biotechnology (UBZ), Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

* Corresponding author: Thorsten Reemtsma, thorsten.reemtsma@ufz.de

This supporting information contains eight tables, four figures, and three references on 36 pages:

Content

1. Materials and methods.....	S2
1.1 Chemicals and Reagents.....	S2
1.2 Uncertainties related to grab sampling.....	S3
1.3 Column experiments.....	S4
1.4 Enrichment of ACE-degrading microorganisms and biodegradation tests.....	S5
1.5 Microbial community analysis: Amplicon sequencing on the MiSeq platform	S7
1.6 Analytical methods.....	S8
1.7 Data analysis.....	S9
1.8 Surface water data.....	S10
2. Results	S11
2.1 ACE removal in wastewater treatment.....	S11
2.1.1 Beneficial conditions for ACE elimination.....	S12
2.2 Microbial ACE degradation	S13
2.2.1 Microorganisms involved in ACE biodegradation.....	S13
2.2.2 Evidence for catabolic degradation.....	S34
2.3 ACE concentration in surface water.....	S35
References	S36

1. Materials and methods

1.1 Chemicals and Reagents

Ultrapure water was obtained from a Merck MilliQ Integral 5 system (Merck, Darmstadt, Germany). Methanol and acetic acid of ULC/MS grade were sourced from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Acesulfame (ACE) potassium salt was sourced from Sigma Aldrich (Munich, Germany), acesulfame-d₄ potassium from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Sulfamic acid (SA) was sourced from Sigma Aldrich (Munich, Germany).

For preparation of DSMZ 462 mineral medium (Table S1) chemicals of analytical grade were sourced from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany), Sigma-Aldrich (Munich, Germany), and Fluka (Sigma Aldrich, Munich, Germany), respectively. Agar plates were prepared using Bacto Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Nutrient broth was sourced from Merck (Darmstadt, Germany).

Table S1. Composition of DMSZ 462 mineral medium (Brunner) with vitamins. All solutions are to be prepared in distilled water. pH of the final solution should be adjusted to 6.9.

Vitamin solution (Schlegel)	Concentration (mg/L)
<i>p</i> -Aminobenzoate	10
Biotin	2
Nicotinic acid	20
Thiamine-HCl x 2 H ₂ O	10
Ca-pantothenate	5
Pyridoxamine	50
Vitamin B ₁₂	20
Trace element solution SL-6	Concentration (mg/L)
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30
Trace element solution SL-4	Amount
EDTA	0.50 g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g/L
Trace element solution SL-6	100 mL/L
Final mineral medium solution	Amount
Na ₂ HPO ₄	2.44 g/L
KH ₂ PO ₄	1.52 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.05 g/L
Trace element solution SL-4	10.0 mL/L
Vitamin solution (Schlegel)	2.50 mL/L

1.2 *Uncertainties related to grab sampling*

Influent and effluent samples of the treatment wetland WWTP were contemporaneously sampled. Uncertainties related to this sampling method (grab sampling) and provisions for reducing their impact, as also discussed by Kahl et al. (1), will be summarized in this chapter. Although grab sampling is most commonly used in sampling of treatment wetlands, this method disregards transport delays in the system (2). This can cause uncertainties in pollutant concentration and removal due to (diurnal) variation of water quality.

At the research facility Langenreichenbach, incoming wastewater is pre-treated and mixed in a septic tank before being delivered to the treatment systems. With an approximate residence time of two days this tank strongly reduces diurnal variations in the influent.

Treatment wetlands were shown to not exhibit plug flow, which resulted in “remnant effects of inlet events at three or more nominal detention times” (2). To avoid such synoptic errors, Kadlec and Wallace (2) therefore recommend to average inlet and outlet data over at least three times the nominal detention time of the treatment wetland. In the present study, data was averaged over at least one month, including pollutant concentrations and flow data before calculating mass removal. This complies with the recommendation of Kadlec and Wallace (2009) to average data over at least three times the HRT of a system.

1.3 Column experiments

The column consisted of a 300 mL dropping funnel, gravel of the same size as used in the treatment wetland (4 – 8 mm), and precipitated suspended sludge from the treatment wetland (125 mL, sampled on 21 April 2015), which was taken at 50% fractional length of the system. An Ismatec Reglo Digital tubing pump (Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) with a Tygon LFL pumping tube (Idex Europe GmbH, Erlangen, Germany) and Tygon E-3603 tubes (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany) for connections were used. Supernatant of sludge settling (400 mL, initial ACE concentration: around 40 µg/L) was spiked with 125 µg/L ACE and transferred to an open flask as storage vessel allowing gas exchange. The system was run at 2 mL/min (solution pumped in upward flow direction) at room temperature and under exclusion of light. The column was flushed with 100 mL of the spiked solution prior to recirculating the remaining volume (300 mL). Solution in the storage vessel was frequently stirred during the experiment to enhance gas exchange and ensure homogeneity of the solution. Samples for ACE analysis were taken from the storage vessel after additional thorough mixing. The schematic of the system is shown in Fig. S1.

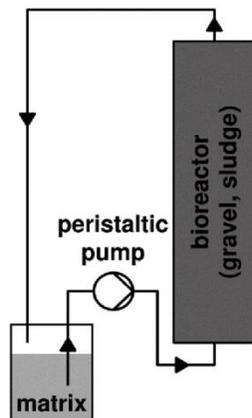


Figure S1. Schematic of the column experiment used for evaluation of temperature effect on biomass (extracted from the treatment wetland during a period of no noticeable ACE removal, 21 April 2015).

1.4 *Enrichment of ACE-degrading microorganisms and biodegradation tests*

In order to identify the microorganisms involved in ACE degradation and the transformation products formed, suspended sludge of the treatment wetland was taken during a period of high removal efficiency (7 July 2015). Sludge was taken at 50% length of the treatment wetland, as, indicated by internal concentration profiles, this zone showed the highest ACE removal activity. Unless stated otherwise, all liquid cultures and agar plates were incubated at 14°C in the dark; liquid cultures were agitated at 120–125 rpm and ACE concentration was increased successively. Evaporation losses were compensated by adding ultrapure, sterile water. Biomass was harvested by centrifugation of liquid culture aliquots. If necessary, the biomass pellets were stored at -20 °C until further analysis.

In a first step, 50 mL of precipitated sludge from the treatment wetland (7 July 2015) was mixed with equal volume of sterile DSMZ medium 462 (D462, composition see Table S1) in duplicate. Both cultures were spiked with 125 µg/L ACE (culture I, 8 July 2015). After 36 d (13 August 2015, 6 mg/L ACE) 35 mL of each culture were mixed with 50 mL of fresh D462 and spiked with 6 mg/L ACE (culture II). 56 d later (8 October 2015, 31 mg/L ACE), the duplicate culture solutions were pooled and 20 mL of the resulting solution were transferred to 40 mL of fresh D462. This culture was spiked with 31 mg/L ACE (culture III). 47 d later (24 November 2015, 125 mg/L ACE), aliquots of culture III were streaked on selective mineral agar medium (D462, 62 mg/L ACE) and biomass of the liquid culture was sampled 7 d later (1 December 2015, 125 mg/L ACE; culture IV). On the agar plates, two different morphologies, seemingly grown on and into the agar medium, became visible after 10 days of incubation (4 December 2015). Pure liquid cultures, isolated via streaking and re-suspension in D462, did not show ACE degrading activity. Therefore, mixed cultures, prepared via cutting representative colonies of each type from the first plates and transfer to 3 mL of fresh D462 with 62 mg/L ACE, were used for further studies (7 December 2015, resulting cultures: A, B, C). ACE content and culture volume was frequently checked and readjusted, if necessary. 119 d after preparation (4 April 2016), aliquots of A, B, and C were plated on nutrient agar without ACE to quickly obtain a larger amount of biomass. Again, it was not possible to obtain pure liquid cultures degrading ACE (mineral medium D462). Therefore, the complete biomass (= mixed culture) of each initial plate was transferred to 4 mL of fresh D462 containing 31 mg/L ACE (11 April 2016). The resulting cultures are labeled a, b, and c, with culture a resulting from plating culture A, b from plating B, and c from plating C. In cultures A – C and a – c, ACE concentration and culture volume were increased successively. After 380 d (A – C) and 254 d (a – c) of incubation (21 December 2016, 125 mg/L ACE), respectively, 20% glycerol was added to aliquots of these cultures and the stocks were stored at -155 °C. After two months (20 February 2017), one glycerol stock of each culture was thawed and centrifuged after addition of equal volume of D462 (20 min at 12,190xg). Cells were re-suspended in 2 mL of fresh D462 with 125 mg/L ACE and incubated at room temperature. After three days, the now turbid solutions were filled up to 10 mL with fresh D462 and spiked with 125 mg/L ACE (24 February 2017). One week after this step (2 March 2017), biomass from each culture was harvested from culture aliquots (10 min at 12,190xg) and used for community composition analysis in cultures A – C and a – c. From the

remaining culture solutions, aliquots were regularly transferred (every three to six weeks) to fresh D462 (20 mL) with increasing ACE content. At 0.5 g/L ACE the cultures were divided into two 10 mL aliquots each; these aliquots were centrifuged (20 min, 12,190xg) and the cells were re-suspended in fresh D462 with 0.5 g/L ACE. One set was incubated at room temperature, the other at 30 °C (27 March 2017). Cultures of both sets were regularly transferred (every three to five weeks) and ACE concentration was increased gradually. At 2 g/L ACE SA formation rate was analyzed in each culture (9 d incubation, 18 May 2017). This compound was identified as stable transformation product by Castronovo et al. (3) and preliminary analysis in the enrichment cultures confirmed this finding. Analysis revealed higher activity in the set incubated at 30 °C; therefore, the set incubated at room temperature was discarded and all follow-up cultures were incubated at 30°C.

Table S2. Labeling of the liquid cultures after the first (selective) agar passage and the corresponding liquid cultures after second (nutrient agar) agar passage.

Culture after selective mineral agar passage	Corresponding culture after nutrient agar passage
A	a
B	b
C	c

Culture B showed the highest SA formation rate at 2 g/L ACE (30°C), and was therefore used to follow ACE and TOC removal as well as SA formation. For this purpose, 10 mL of B (19 June 2017, 5 g/L ACE) were centrifuged (15 min at 7,200 g). Cells were washed with 10 mL D462 and sedimented via centrifugation (15 min at 7,200 g). After suspending the cells in 30 mL D462, a sample was taken (background) and ACE stock solution was added to final content of 5 g/L. In parallel, 30 mL of D462 with 5 g/L ACE but no biomass were incubated, serving as abiotic control. Both solutions were incubated at 30 °C and 3 mL of each were taken at 0, 4, 10, 16, 22, 28, 38, and 51 days of incubation, centrifuged (10 min at 10,620xg), and the supernatant was frozen until further analysis. For ACE analysis samples were diluted 1:100,000, for TOC analysis 1:2 with ultrapure water.

1.5 *Microbial community analysis: Amplicon sequencing on the MiSeq platform*

DNA concentration was determined by fluorimetric quantitation using the Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). The samples were sent to LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany) for PCR, tagging, equimolar mixing, clean-up and sequencing run on the MiSeq platform (Illumina, San Diego, USA). A 2x300 bp paired-end read sequencing approach with the Illumina MiSeq V3 chemistry was performed using the bacteria-specific primer set 341F-785R. Raw data processing was performed as follows: Demultiplexing using the Illumina bcl2fastq 1.8.4 software; sorting of reads by amplicon inline barcodes, clipping of adapter and primer sequences; combination of forward and reverse reads using BBMerge 34.48 (<http://bmap.sourceforge.net/>). Resulting FASTQ files were analyzed with Mothur 1.35.1 (<http://www.mothur.org/>) comprising the following steps: removal of sequences containing ambiguous bases (N), with homopolymer stretches of more than 8 bases or with an average Phred quality score below 33; alignment against the 16S Mothur-Silva SEED r119 reference alignment; filtering of short alignments (truncated or unspecific PCR products); sequence subsampling to 20,000 sequences per sample; sequencing error reduction by pre-clustering (up to 1 differing base per 100 bases allowed in a cluster); elimination of chimera with the uchime algorithm; taxonomic classification against the Silva reference classification and removal of sequences from other domains of life; OTU picking by clustering at the 97 % identity level (using the cluster.split method); OTU consensus taxonomic calling; integrating the taxonomic classification of the cluster member sequences; de novo phylogenetic tree generation with the FastTree method; creation of OTU count tables in the BIOM format. QIIME 1.9.0 (<http://qiime.org/>) was used to create OTU tables.

1.6 Analytical methods

Prior to ACE analysis, influent samples from the treatment wetland and the WWTP were diluted 1:2, samples taken at 12.5% and 25% fractional length of the treatment wetland were diluted 1:1 with ultrapure water. After addition of methanolic internal standard (acesulfame-d₄) solution, the samples were filtered using 0.45 µm Micropur regenerated cellulose (RC) filters. Samples from lab experiments were filtered (column experiments; Micropur RC syringe filter, 0.45 µm pore size, 15 mm diameter) or centrifuged (enrichment studies) and diluted with ultrapure water, if necessary. Due to this often high dilution and accordingly insignificant matrix effects, samples were not spiked with internal standard; relative ACE concentration was calculated using peak areas after HPLC-MS/MS analysis.

ACE was analyzed by HPLC-MS/MS using an Agilent 1260 Infinity series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTRAP 5500 mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) controlled by Analyst 1.6.2 software. Chromatographic separation was performed on an Ascentis Express C18 column (50 x 3 mm, 2.7 µm) (Supelco/Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany) following a SecurityGuard C18 guard column (4 x 2 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The column temperature was set to 35 °C. 10 µL of samples from the treatment wetland and WWTP, 5 µL of samples from lab experiments were injected into the HPLC-MS/MS-system with 0.1% (v/v) acetic acid in ultrapure water (A) and 0.1% acetic acid in methanol (B) as mobile phases. The flow rate was set to 300 µl/min with the following gradient: 0 min 90% A, 0.5 min 90% A, 3 min 15% A, 8 min 15% A, 8.1 min 90% A, 12.5 min 90% A. ACE was detected using multiple reaction monitoring (MRM) in negative electrospray-ionization (ESI) mode. Retention time of ACE was 2.05 min and mass transitions m/z 161.90 to m/z 81.90 and m/z 161.90 to m/z 77.90 were monitored.

Sulfamic acid (SA) was determined by ion chromatography (IC) using a Dionex DX-500 system with conductivity detector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). IonPac AS18 analytical column (250 x 4 mm) and IonPac AG18 guard column (50 x 4 mm) were used for chromatographic separation. Column temperature was set to 30 °C. Flow rate of 1 mL/min was applied. Injection volume was 5 µl. With use of an Eluent Generator Cartridge the following gradient was applied: 0 min 2 mM KOH, 7 min 2 mM KOH, 7.5 min 60 mM KOH, 12 min 60 mM KOH, 12.5 min 2 mM KOH, 16 min 60 mM KOH.

1.7 Data analysis

To allow conduction of descriptive statistics, half of the limit of quantification (LOQ) was inserted if the analytical finding was below this value.

Table S3. Limit of quantification (LOQ) of the analysis methods used to determine the given parameters.

Analyte	LOQ
CBOD ₅	0.3 mg/L
NH ₄ ⁺	0.03 mg/L
NO ₃ ⁻	0.3 mg/L
ACE	0.003 µg/L
SA	0.03 mg/L

1.8 Surface water data

Water quality data of Saxon rivers and streams, including Elbe and Mulde, is routinely analyzed by the "Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft (BfUL)". Data on emerging organic contaminant concentrations is collected by the Saxon State Office for the Environment, Agriculture and Geology (LfULG) in the context of the Water Framework Directive Annex VIII. Water quality and flow rate data until the end of 2016 as well as further information is publically available (<https://www.umwelt.sachsen.de/umwelt/wasser/index.html>, only available in German).

Table S4. Median annual flow rate, acesulfame (ACE) concentration and mass load in the rivers Mulde (sampling station Bad Düben) and Elbe (sampling stations Schmilka and Dommitzsch); flow rate was recorded on a daily basis ($n = 365 - 366$), ACE was determined in grab samples (number of samples see Fig. 5). High-water occurred in 2013, low water in 2015.

Year	Mulde, Bad Düben	Elbe, Schmilka	Elbe, Dommitzsch
Median annual flow rate (m ³ /s)			
2013	61	335	368
2014	26	193	210
2015	35	165	195
2016	42	178	209
Median annual ACE concentration (ng/L)			
2013	1500	1600	1600
2014	3200	2400	2250
2015	1500	1200	1100
2016	730	650	625
Median annual ACE mass load (kg/a)			
2013	3009	17219	23239
2014	1963	13975	13631
2015	1333	4928	5573
2016	1028	3871	4497

2. Results

2.1 ACE removal in wastewater treatment

Table S5. Annual median concentration of conventional wastewater parameters (carbonaceous biological oxygen demand (CBOD₅), nitrogen originating from ammonium (NH₄-N) or nitrate (NO₃-N)) and acesulfame (ACE) from July 2014 to June 2015. Values in italics represent annual median removal. Influent of the treatment wetland was primary treated municipal wastewater (septic tank). This tank and the WWTP share the same municipal wastewater.

	Treatment wetland				WWTP						
	Influent		Effluent		Influent		Effluent				
Flow rate (m ³ /d)	0.770	(0.001)	0.742	(0.052)	1164	(270)					
CBOD ₅ (mg/L)	299	(45)	0.3	(1)	100%	413	(227)	7	(4)	98%	
NH ₄ -N (mg/L)	77	(12)	0.03	(0.09)	100%	59	(11)	0.1	(0.2)	100%	
NO ₃ -N (mg/L)	< LOQ		51	(12)		0.9	(0.4)	4	(1)		
ACE (µg/L)	15	(6)	4	(12)	78%	15	(4)	5	(12)	64%	

Number of individual samples can be found in Table S6.

Table S6. Number of samples used for calculation of annual performance of the treatment wetland and the WWTP.

	Treatment wetland		WWTP	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent
Flow	259	259	51	51
CBOD ₅	41	41	51	51
NH ₄ -N	41	41	51	40
NO ₃ -N	41	41	51	40
ACE	42	42	14	14

2.1.1 Beneficial conditions for ACE elimination

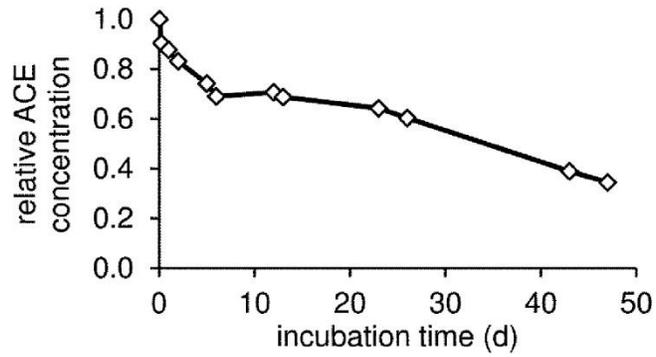


Figure S2. Acesulfame (ACE) removal in column experiment (room temperature) utilizing sludge and treated wastewater taken at 50% length of the treatment wetland on 4/21/2015, spiked with 125 $\mu\text{g/L}$ ACE.

2.2 Microbial ACE degradation

2.2.1 Microorganisms involved in ACE biodegradation

Table S7. Relative abundance (% of total sequences) of different bacterial taxa on class level according to 16S rRNA amplicon sequencing. I: original sludge from the treatment wetland (7 Jul 2015, 20 °C, 24 µg/L ACE); II: biomass after first transfer (13 Aug 2015, 14 °C, 6 mg/L ACE); III: biomass after second transfer (8 Oct 2015, 14 °C, 31 mg/L ACE); IV: biomass of culture III after 54 days of incubation (1 Dec 2015, 14 °C, 125 mg/L ACE); A–C: biomass from liquid cultures after selective mineral agar passage of IV (14 °C, 50 mg/L ACE), re-activation of glycerol stocks, and one transfer (2 Mar 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE); a–c: biomass of liquid cultures prepared after nutrient agar plate passage (14 °C) of A–C, re-activation of glycerol stocks, and one transfer (2 Mar 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE).

Phylum	Class	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Acidobacteria	<i>Acidobacteria</i>	1.66	1.74	4.09	1.39						
	<i>Holophagae</i>	0.71	0.78	0.41	0.09						
	<i>Subgroup 22</i>	0.01	0.00	0.01	0.01						
	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.01						
Actinobacteria	<i>Acidimicrobia</i>	2.46	3.03	1.41	0.68						
	<i>Actinobacteria</i>	13.90	7.72	6.47	2.05	1.58	0.31	1.11	1.62	0.62	0.63
	<i>Coriobacteriia</i>	0.02	0.01	0.01	0.00						
	<i>MB-A2-108</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
	<i>Thermoleophila</i>	0.85	1.04	0.70	0.41						
	unclassified	1.02	1.31	1.18	0.67						
Armatimonadetes	<i>Chthonomonadetes</i>	0.00	0.00	0.02	0.01						
	unclassified	0.05	0.15	0.21	0.06						
BD1-5	unclassified	0.03	0.00	0.00	0.00						
	<i>BD2-2</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
Bacteroidetes	<i>BSV13</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
	<i>Bacteroidia</i>	0.02	0.00	0.00	0.00						
	<i>Cytophagia</i>	1.30	2.58	1.63	0.81						
	<i>Flavobacteriia</i>	0.87	2.93	1.23	0.78						

Phylum	Class	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Bacteroidetes	SB-1	0.05	0.05	0.11	0.03						
	SB-5	0.00	0.01	0.00	0.00						
	SM1A07	0.00	0.01	0.00	0.00						
	<i>Sphingobacteriia</i>	1.52	4.72	4.65	3.74	0.78	0.71	0.31	0.41	0.36	0.28
	VC2.1 Bac22	0.06	0.05	0.03	0.03						
	WCHB1-32	0.01	0.00	0.01	0.00						
	unclassified	0.24	0.21	0.27	0.16						
	vadinHA17	0.07	0.04	0.02	0.00						
	<i>Candidate division BRC1</i>	0.15	0.08	0.25	0.06						
	<i>Candidate division OD1</i>	0.52	0.13	0.76	0.35						
<i>Candidate division OP11</i>	0.00	0.00	0.01	0.00							
<i>Candidate division OP3</i>	0.00	0.00	0.01	0.01							
<i>Candidate division SR1</i>	0.02	0.00	0.00	0.00							
<i>Candidate division TM7</i>	0.72	0.40	1.02	0.31							
<i>Candidate division WS3</i>	0.01	0.00	0.00	0.00							
<i>Chlamydiae</i>	unclassified	0.48	0.27	0.28	0.06						
	<i>Chlamydiae</i>	0.43	0.21	0.52	0.44						
<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	0.16	0.06	0.22	0.04						
	<i>Ignavibacteria</i>	0.12	0.14	0.07	0.04						
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	0.50	0.54	0.26	0.09						
	<i>Ardenitacenia</i>	0.00	0.01	0.00	0.00						
	<i>Caldiineae</i>	0.49	1.01	0.85	0.76						
	<i>Chloroflexia</i>	0.01	0.02	0.01	0.00						
	JG30-KF-CM66	0.04	0.05	0.07	0.04						
	KD4-96	1.28	1.39	1.00	0.98						
	S085	0.01	0.01	0.05	0.01						
	TK10	0.20	0.65	0.60	0.30						

Phylum	Class	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Chloroflexi</i>	<i>Thermomicrobia</i>	0.61	0.75	0.49	0.40						
	unclassified	0.06	0.09	0.07	0.02						
	ML635J-21	0.04	0.00	0.03	0.00						
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Melainabacteria</i>	0.17	0.04	0.17	0.01						
	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococci</i>	0.01	0.01	0.02	0.00						
<i>Elusimicrobia</i>	<i>Elusimicrobia</i>	0.04	0.04	0.07	0.01						
<i>Fibrobacteres</i>	<i>Fibrobacteria</i>	0.00	0.03	0.01	0.00						
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	0.03	0.05	0.09	0.01						
	<i>Clostridia</i>	0.50	0.58	0.47	0.50						
	<i>Erysipelotrichia</i>	0.04	0.04	0.06	0.03						
	<i>Negativicutes</i>	0.01	0.01	0.00	0.00						
	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.01						
	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	12.11	17.40	13.84	8.27					
<i>Lentisphaerae</i>	<i>BS5</i>	0.02	0.00	0.00	0.00						
	<i>DEV055</i>	0.01	0.00	0.01	0.00						
	<i>Lentisphaeria</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
	<i>PBS-III-20</i>	0.06	0.02	0.14	0.01						
	<i>WCHB1-41</i>	0.01	0.01	0.05	0.00						
	unclassified	0.02	0.01	0.06	0.01						
<i>NPL-UPA2</i>	unclassified	0.02	0.00	0.01	0.00						
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	0.47	1.26	1.98	4.39						
	unclassified	0.03	0.10	0.15	0.14						
<i>OC31</i>	<i>BD7-11</i>	0.07	0.01	0.02	0.01						
	<i>OM190</i>	1.00	1.19	0.72	0.22						
<i>Planctomycetes</i>	<i>Phycisphaerae</i>	1.26	1.46	4.04	2.24						
	<i>Pla3 lineage</i>	0.01	0.01	0.02	0.00						

Phylum	Class	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Planctomycetes	<i>Pla4 lineage</i>	0.03	0.00	0.02	0.01						
	<i>Planctomycetacia</i>	4.45	4.50	3.38	2.53						
	unclassified	0.06	0.06	0.04	0.01						
	<i>vadinHA49</i>	0.02	0.30	0.10	0.01						
Proteobacteria	<i>Alphaproteobacteria</i>	4.56	4.98	9.40	22.59	69.56	71.52	57.18	34.65	36.98	35.82
	<i>BJGMM-U27</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
	<i>Betaproteobacteria</i>	16.77	17.72	16.25	34.91	0.49	0.01	0.00	1.35	0.03	0.01
	<i>Deltaproteobacteria</i>	5.58	1.63	4.81	1.31						
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	0.12	0.02	0.01	0.01						
	<i>Gammaproteobacteria</i>	14.95	9.77	6.06	2.25	27.52	27.31	41.17	61.90	61.84	63.07
	<i>SPOTSOC00m83</i>	0.01	0.04	0.10	0.02						
	<i>TA18</i>	0.19	0.12	0.13	0.02						
	unclassified	0.79	0.78	0.53	0.27						
	<i>SHA-109</i>	0.02	0.01	0.01	0.00						
	<i>SM2F11</i>	0.10	0.01	0.00	0.00						
	<i>Spirochaetae</i>	0.07	0.00	0.01	0.01						
<i>Synergistetes</i>	0.01	0.00	0.00	0.00							
<i>TA06</i>	0.03	0.02	0.12	0.03							
<i>TM6</i>	0.03	0.01	0.06	0.47							
<i>Tenericutes</i>	0.00	0.00	0.00	0.00							
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>OPB35 soil group</i>	2.51	2.94	4.39	3.64						
	<i>Opitutae</i>	0.03	0.06	0.09	0.06						
	<i>S-BQ2-57 soil group</i>	0.04	0.02	0.04	0.01						
	<i>Spartobacteria</i>	0.17	0.10	0.21	0.06						
	<i>Verrucomicrobia Incertae Sedis</i>	0.01	0.00	0.01	0.00						
	<i>Verrucomicrobiae</i>	0.69	0.69	1.01	0.20						
unclassified	0.25	0.15	0.45	0.06							

Phylum	Class	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
WCHBT-60	unclassified	0.00	0.01	0.04	0.05						
unclassified	unclassified	1.94	1.65	1.75	0.78						

Table S8. Relative abundance (% of total sequences) of different bacterial taxa on family level according to 16S rRNA amplicon sequencing. . I: original sludge from the treatment wetland (7 Jul 2015, 20 °C, 24 µg/L ACE); II: biomass after first transfer (13 Aug 2015, 14 °C, 6 mg/L ACE); III: biomass after second transfer (8 Oct 2015, 14 °C, 31 mg/L ACE); IV: biomass of culture III after 54 days of incubation (1 Dec 2015, 14 °C, 125 mg/L ACE); A–C: biomass from liquid cultures after selective mineral agar passage of IV (14 °C, 50 mg/L ACE), re-activation of glycerol stocks, and one transfer (2 Mar 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE); a–c: biomass of liquid cultures prepared after nutrient agar plate passage (14 °C) of A–C, re-activation of glycerol stocks, and one transfer (2 Mar 2016, 25 °C, 125 mg/L ACE).

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Acidobacteria</i>												
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	<i>Acidobacteriaceae</i> (Subgroup 1)	0.02	0.01	0.02	0.01						
	Subgroup 17	unclassified	0.10	0.09	0.17	0.05						
	Subgroup 3	AKI/W659	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Elev-16S-1166	0.04	0.05	0.03	0.01						
		PAU/C26f	0.00	0.00	0.00	0.00						
		SJA-149	0.02	0.09	0.12	0.04						
		unknown family	0.09	0.27	0.48	0.24						
		unclassified	0.02	0.03	0.05	0.02						
	Subgroup 4	11-24	0.00	0.02	0.02	0.00						
		DS-100	0.00	0.00	0.00	0.00						
		unknown family	0.69	0.53	0.81	0.48						
	Subgroup 5	unclassified	0.00	0.00	0.01	0.00						
	Subgroup 6	unclassified	0.68	0.66	2.37	0.53						
	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.00						
<i>Holophagae</i>	<i>Holophagales</i>	<i>Holophagaceae</i>	0.05	0.04	0.02	0.00						
	Subgroup 10	ABS-19	0.31	0.44	0.28	0.05						
		unclassified	0.01	0.01	0.00	0.00						
	Subgroup 7	unclassified	0.34	0.29	0.11	0.03						
Subgroup 22	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.01						
unclassified	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.01						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Actinobacteria												
Acidimicrobia												
	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	0.04	0.06	0.03	0.06						
		Acidimicrobiales Incertae Sedis	1.68	1.80	0.73	0.31						
		lamiaceae	0.35	0.42	0.22	0.10						
		OM1 clade	0.01	0.01	0.00	0.00						
		Sva0996 marine group	0.02	0.03	0.00	0.00						
		unclassified	0.37	0.71	0.42	0.21						
Actinobacteria												
	Actinomycetales	Actinomycetaceae	0.02	0.02	0.00	0.00						
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	0.01	0.00	0.01	0.00						
	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	0.01	0.00	0.00	0.00	0.17	0.02	0.08	0.17	0.09	0.02
		Corynebacteriales Incertae Sedis	0.01	0.00	0.00	0.00						
		Dietziaceae	0.01	0.00	0.00	0.00						
		Mycobacteriaceae	0.22	0.21	0.38	0.13						
		Nocardiaceae	0.01	0.01	0.08	0.03	1.40	0.25	1.03	1.44	0.52	0.61
		unclassified	0.02	0.01	0.03	0.01						
	Frankiales	Acidothermaceae	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Cryptosporangiaceae	0.26	0.20	0.09	0.04						
		Frankiaceae	0.03	0.02	0.03	0.01						
		Nakamurellaceae	0.01	0.00	0.02	0.00						
		Sporichthyaceae	0.01	0.03	0.09	0.00						
		unclassified	0.36	0.36	0.16	0.06						
	Kineosporiales	Kineosporiaceae	0.07	0.04	0.02	0.01						
	Micrococcales	Demequinaceae	0.04	0.05	0.01	0.01						
		Dermatophilaceae	0.01	0.00	0.00	0.00						
		Intrasporangiaceae	0.02	0.01	0.00	0.00						
		Microbacteriaceae	10.8	5.28	4.60	1.42	0.00	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c	
Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	0.00	0.00	0.00	0.00							
		Promicromonosporaceae	0.01	0.01	0.00	0.00							
		unclassified	0.07	0.04	0.03	0.01							
	Micromonosporales	Micromonosporaceae	0.01	0.01	0.01	0.00							
		PeM15	0.61	0.42	0.19	0.04							
		Propionibacteriales	0.03	0.03	0.02	0.01							
	Pseudonocardiales	Propionibacteriaceae	0.33	0.21	0.38	0.14							
		unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00							
		Pseudonocardiaceae	0.00	0.00	0.00	0.00							
		Streptomycetales	0.03	0.03	0.02	0.01							
		unclassified	0.88	0.71	0.27	0.10							
	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	0.02	0.01	0.01	0.00							
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00							
		Gaiellales	0.31	0.51	0.33	0.16							
	Solirubrobacteriales	unclassified	0.02	0.06	0.07	0.08							
480-2		0.31	0.21	0.14	0.13								
Elev-16S-1332		0.00	0.00	0.00	0.00								
Patulibacteraceae		0.01	0.01	0.02	0.01								
Solirubrobacteraceae		0.00	0.01	0.01	0.00								
Thermophilales	TM146	0.04	0.04	0.02	0.01								
	unclassified	0.06	0.03	0.02	0.01								
	Thermoleophilaceae	0.01	0.00	0.00	0.00								
	unclassified	0.10	0.16	0.09	0.02								
unclassified	unclassified	unclassified	1.02	1.31	1.18	0.67							
Armatimonadetes													
Chthonomonadetes	Chthonomonadales	Chthonomonadaceae	0.00	0.00	0.01	0.01							
	unclassified	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00							

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
unclassified	unclassified	unclassified	0.05	0.15	0.21	0.06						
BDI-5												
unclassified	unclassified	unclassified	0.03	0.00	0.00	0.00						
Bacteroidetes												
<i>BD2-2</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>BSV13</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		<i>Rikenellaceae</i>	0.02	0.00	0.00	0.00						
<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Cytophagaceae</i>	0.61	2.00	1.49	0.74						
		<i>Flammeovirgaceae</i>	0.02	0.06	0.04	0.01						
		unclassified	0.65	0.52	0.10	0.06						
	unclassified	unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00						
<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	0.04	0.03	0.19	0.06						
		<i>Flavobacteriaceae</i>	0.52	2.41	0.44	0.11						
		<i>NS9 marine group</i>	0.31	0.45	0.59	0.61						
		unclassified	0.00	0.03	0.01	0.00						
<i>SB-1</i>	unclassified	unclassified	0.05	0.05	0.11	0.03						
<i>SB-5</i>	unclassified	unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00						
<i>SM1A07</i>	unclassified	unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00						
<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>AKYH767</i>	0.02	0.08	0.09	0.05						
		<i>Chitinophagaceae</i>	0.78	3.64	2.95	1.97	0.78	0.71	0.31	0.41	0.36	0.28
		<i>KD3-93</i>	0.02	0.06	0.09	0.02						
		<i>NS11-12 marine group</i>	0.09	0.07	0.10	0.01						
		<i>PHOS-HE51</i>	0.08	0.14	0.54	0.88						
		<i>ST-12K33</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		<i>Saprospiraceae</i>	0.29	0.38	0.33	0.70						
		<i>Sphingobacteriaceae</i>	0.01	0.00	0.01	0.01						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>WCHB1-69</i>	0.10	0.05	0.03	0.01						
		<i>env.OPS 17</i>	0.06	0.19	0.21	0.04						
		unclassified	0.06	0.10	0.30	0.06						
VC2.1 Bac22	unclassified	unclassified	0.06	0.05	0.03	0.03						
WCHB1-32	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.24	0.21	0.27	0.16						
<i>vadinHA17</i>	unclassified	unclassified	0.07	0.04	0.02	0.00						
<i>Candidate division BRC1</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.15	0.08	0.25	0.06						
<i>Candidate division OD1</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.52	0.13	0.76	0.35						
<i>Candidate division OP11</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.00	0.00	0.01	0.00						
<i>Candidate division OP3</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.00	0.00	0.01	0.01						
<i>Candidate division SR1</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00						
<i>Candidate division TM7</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.72	0.40	1.02	0.31						
<i>Candidate division WS3</i>												
unknown class	unknown order	unknown family	0.01	0.00	0.00	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.48	0.27	0.28	0.06						
<i>Chlamydiae</i>												
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiales Incertae Sedis</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		<i>Parachlamydiaceae</i>	0.12	0.12	0.17	0.21						
		<i>Simkaniaceae</i>	0.01	0.00	0.01	0.00						
		unclassified	0.30	0.10	0.34	0.23						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Chlorobi</i>												
<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	<i>OPB56</i>	0.13	0.04	0.18	0.02						
		<i>SJA-28</i>	0.03	0.02	0.04	0.01						
		<i>BSV26</i>	0.05	0.06	0.05	0.03						
<i>Ignavibacteria</i>	<i>Ignavibacteriales</i>	<i>Ignavibacteriaceae</i>	0.02	0.00	0.00	0.00						
		<i>IheB3-7</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		<i>LD-RB-34</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
		<i>PHOS-HE36</i>	0.05	0.09	0.01	0.00						
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
<i>Chloroflexi</i>												
<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	0.50	0.54	0.26	0.09						
<i>Ardenticatenia</i>	unclassified	unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00						
<i>Caldilineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	0.49	1.01	0.85	0.76						
<i>Chloroflexia</i>	<i>Chloroflexales</i>	<i>Roseiflexaceae</i>	0.00	0.02	0.01	0.00						
	<i>Herpetosiphonales</i>	<i>Herpetosiphonaceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>JG30-KF-CM66</i>	unclassified	unclassified	0.04	0.05	0.07	0.04						
<i>KD4-96</i>	unclassified	unclassified	1.28	1.39	1.00	0.98						
<i>S085</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.01	0.05	0.01						
<i>TK10</i>	unclassified	unclassified	0.20	0.65	0.60	0.30						
<i>Thermomicrobia</i>	<i>AKYG1722</i>	unclassified	0.02	0.02	0.01	0.01						
	<i>JG30-KF-CM45</i>	unclassified	0.58	0.73	0.48	0.38						
	<i>Sphaerobacterales</i>	<i>Sphaerobacteraceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.01						
unclassified	unclassified	unclassified	0.06	0.09	0.07	0.02						
<i>Cyanobacteria</i>												
<i>ML635J-21</i>	unclassified	unclassified	0.04	0.00	0.03	0.00						
<i>Melainabacteria</i>	<i>Obscuribacterales</i>	unclassified	0.16	0.04	0.17	0.01						
	<i>Vampirovibrionales</i>	unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Deinococcus-Thermus</i>												
Deinococci	Deinococcales	Trueperaceae	0.01	0.01	0.02	0.00						
<i>Elusimicrobia</i>												
	Lineage IIa	unclassified	0.00	0.01	0.01	0.00						
	Lineage IIb	unclassified	0.04	0.02	0.05	0.01						
	Lineage IIc	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	MVP-88	unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00						
<i>Fibrobacteres</i>												
Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	0.00	0.03	0.01	0.00						
<i>Firmicutes</i>												
<i>Bacilli</i>												
	Bacillales	Alicyclobacillaceae	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Bacillaceae	0.00	0.01	0.01	0.00						
		Paenibacillaceae	0.00	0.00	0.03	0.00						
		unclassified	0.00	0.02	0.03	0.00						
	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	0.02	0.01	0.01	0.00						
		Lactobacillaceae	0.00	0.01	0.00	0.00						
		Streptococcaceae	0.01	0.00	0.00	0.00						
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	Clostridiales	Christensenellaceae	0.05	0.01	0.01	0.00						
		Clostridiaceae 1	0.15	0.18	0.14	0.20						
		Defluviitaleaceae	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Eubacteriaceae	0.00	0.00	0.01	0.00						
		Family XI	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Family XIII	0.02	0.00	0.00	0.00						
		Lachnospiraceae	0.01	0.04	0.03	0.02						
		Peptostreptococcaceae	0.18	0.30	0.24	0.24						
		Ruminococcaceae	0.07	0.02	0.03	0.01						
		unclassified	0.02	0.03	0.01	0.01						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Clostridia	<i>Thermoanaerobacteriales</i>	<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
	unclassified	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichales</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.04	0.04	0.06	0.03						
<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
unclassified	unclassified	<i>Veillonellaceae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
		unclassified	0.01	0.00	0.00	0.01						
<i>Gemmatimonadetes</i>												
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>BD2-11 terrestrial group</i>	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
unclassified	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	12.1	17.4	13.8	8.27						
	unclassified	unclassified	0.00	0.02	0.02	0.00						
<i>Lentisphaerae</i>												
<i>BSS</i>	unclassified	unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00						
<i>DEV055</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.00						
<i>Lentisphaeria</i>	<i>Victivallales</i>	<i>Victivallaceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>PBS-III-20</i>	unclassified	unclassified	0.06	0.02	0.14	0.01						
<i>WCHB1-41</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.01	0.05	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.02	0.01	0.06	0.01						
<i>NPL-UPA2</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.02	0.00	0.01	0.00						
<i>Nitrospirae</i>												
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	0.47	1.26	1.98	4.39						
<i>OC31</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.03	0.10	0.15	0.14						
<i>Planctomycetes</i>												
<i>BD7-11</i>	unclassified	unclassified	0.07	0.01	0.02	0.01						
<i>OM190</i>	unclassified	unclassified	1.00	1.19	0.72	0.22						
<i>Physcisphaerae</i>	<i>CCM11a</i>	unclassified	0.01	0.01	0.01	0.00						
	<i>CPla-3 termite group</i>	unclassified	0.02	0.03	0.17	0.13						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Phycisphaerae</i>	<i>KCLunmb-38-53</i>	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
	<i>Phycisphaerales</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	0.84	1.19	2.72	0.89						
	<i>Pla1 lineage</i>	unclassified	0.03	0.05	0.11	0.13						
	<i>S-70</i>	unclassified	0.01	0.00	0.01	0.00						
	<i>SHA-43</i>	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
	<i>WD2101 soil group</i>	unclassified	0.33	0.18	1.01	1.08						
	<i>mle1-8</i>	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.01						
<i>Pla3 lineage</i>	unclassified	unclassified	0.01	0.01	0.02	0.00						
<i>Pla4 lineage</i>	unclassified	unclassified	0.03	0.00	0.02	0.01						
<i>Planctomycetacia</i>	<i>Brocadiales</i>	<i>Brocadiaceae</i>	0.91	1.50	1.01	0.92						
	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	3.54	2.99	2.38	1.61						
	unclassified	unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.06	0.06	0.04	0.01						
<i>vadinHA49</i>	unclassified	unclassified	0.02	0.30	0.10	0.01						
<i>Proteobacteria</i>												
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>BF195</i>	unclassified	0.00	0.00	0.01	0.00						
	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	0.16	0.13	0.23	0.06						
		<i>Hyphomonadaceae</i>	0.29	0.54	0.92	0.77						
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	<i>DB1-14</i>	unclassified	0.06	0.03	0.20	0.05						
	<i>Parvularculales</i>	<i>Parvularculaceae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						
	<i>Rhizobiales</i>	<i>A0839</i>	0.17	0.15	0.25	0.10						
		<i>BC13-20</i>	0.01	0.01	0.00	0.00						
		<i>Beijerinckiaceae</i>	0.03	0.01	0.03	0.04						
		<i>Bradyrhizobiaceae</i>	0.16	0.21	0.26	1.11	16.7	20.3	22.7	15.0	13.4	20.7
		<i>Brucellaceae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Alphaproteobacteria	Rhizobiales	D05-2	0.00	0.00	0.00	0.00						
		DUNssu371	0.01	0.02	0.03	0.00						
		F0723	0.01	0.01	0.00	0.00						
		Hyphomicrobiaceae	0.36	0.45	0.76	0.96	0.62	0.32	0.18	0.25	0.20	0.13
		JG34-KF-361	0.00	0.00	0.01	0.00						
		JG35-K1-AG5	0.01	0.00	0.00	0.00						
		KF-JG30-B3	0.00	0.00	0.03	0.00						
		MNG7	0.19	0.27	0.33	0.19						
		Methyllobacteriaceae	0.03	0.05	0.04	0.01						
		Methylocystaceae	0.01	0.04	0.02	0.01						
		Phyllobacteriaceae	0.12	0.21	1.73	14.1	51.9	50.4	34.0	19.0	23.2	14.8
		Rhizobiaceae	0.10	0.12	0.21	0.19	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
		Rhizobiales Incertae Sedis	0.11	0.18	0.65	0.35						
		Rhodobiaceae	0.01	0.02	0.03	0.02						
		Xanthobacteraceae	0.28	0.25	0.63	2.14	0.03	0.19	0.05	0.00	0.09	0.05
		alpha cluster	0.00	0.00	0.01	0.01						
		unclassified	0.28	0.32	0.33	0.72						
		Rhodobacteraceae	0.35	0.34	0.31	0.20						
		AKYH478	0.04	0.02	0.11	0.11						
		Acetobacteraceae	0.84	0.47	0.48	0.36						
		B79	0.02	0.01	0.02	0.00						
		DA111	0.02	0.01	0.02	0.01						
		I-10	0.01	0.01	0.01	0.00						
		JG37-AG-20	0.04	0.07	0.17	0.19						
		KCM-B-15	0.01	0.02	0.03	0.03						
		MNC12	0.00	0.00	0.01	0.00						
		MND8	0.00	0.00	0.00	0.00						
	Rhodobacterales											
	Rhodospirillales											

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c	
Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	0.07	0.08	0.18	0.06							
		Rhodospirillales Incertae	0.16	0.21	0.28	0.15							
		Sedis unclassified	0.03	0.08	0.14	0.09							
	Rickettsiales	AKIW1012	0.01	0.00	0.00	0.00							
		EF100-94H03	0.01	0.00	0.00	0.00							
		Holosporaceae	0.00	0.01	0.01	0.01							
		RB446	0.00	0.01	0.00	0.00							
		Rickettsiaceae	0.01	0.00	0.00	0.00							
		Rickettsiales Incertae	0.02	0.03	0.04	0.06							
		Sedis											
		SM2D12	0.04	0.01	0.03	0.00							
		TK34	0.00	0.01	0.00	0.00							
		unclassified	0.01	0.00	0.03	0.00							
Erythrobacteraceae	0.01	0.02	0.05	0.01									
Sphingomonadales	M05-Pilesti	0.00	0.00	0.00	0.00								
	Sphingomonadaceae	0.26	0.32	0.48	0.29	0.16	0.06	0.02	0.02	0.00	0.00	0.01	
	unclassified	0.04	0.04	0.01	0.01								
	unclassified	0.22	0.18	0.26	0.15								
	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00								
	unknown family	0.01	0.00	0.00	0.00								
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	0.02	0.00	0.00	0.00						
			Burkholderiaceae	0.21	0.14	0.10	0.10						
			Burkholderiales Incertae	0.01	0.01	0.00	0.00						
		Sedis											
Comamonadaceae		7.84	7.94	5.21	4.32	0.32	0.01	0.00	1.35	0.00	0.00	0.01	
Oxalobacteraceae		0.02	0.02	0.01	0.00								
unclassified		0.06	0.03	0.01	0.02								

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c	
Betaproteobacteria	Hot Creek 32	unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00							
	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	0.24	0.31	0.35	0.14							
	Methylophilales	Methylophilaceae	0.35	0.89	3.39	26.5	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Neisseriales	Neisseriaceae	0.04	0.03	0.00	0.00							
	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	0.05	0.05	0.02	0.00							
		Nitrosomonadaceae	1.20	0.85	0.59	0.40	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	3.81	3.75	4.15	1.44							
	SC-I-84	unclassified	1.90	2.49	1.22	0.91							
	TRA3-20	unclassified	0.02	0.07	0.11	0.11							
	unclassified	unclassified	0.98	1.14	1.09	0.97							
	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	unclassified	0.01	0.01	0.00	0.00						
		Bacteriovoraceae	0.01	0.01	0.00	0.00							
		Bdellovibrionaceae	0.18	0.48	2.18	0.80							
	DTB120	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00							
Deltaproteobacteria	Syntrophorhabdaceae	0.00	0.00	0.00	0.00								
Incertae S													
Desulfobacteriales	Desulfobacteraceae	0.11	0.10	0.05	0.01								
	Desulfobulbaceae	0.09	0.10	0.05	0.01								
	unclassified	0.00	0.00	0.01	0.00								
Desulfovibrionales	Desulfomicrobiaceae	0.01	0.00	0.00	0.00								
	Desulfovibrionaceae	0.00	0.00	0.00	0.00								
Desulfuromonadales	GR-WP33-58	0.03	0.01	0.00	0.00								
	Geobacteraceae	0.01	0.00	0.00	0.00								
	M20-Pitesti	0.01	0.00	0.00	0.00								
	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00								
GR-WP33-30	unclassified	0.06	0.04	0.06	0.02								
Myxococcales	0319-6G20	0.06	0.13	0.20	0.04								
	Cystobacteraceae	0.02	0.02	0.04	0.00								

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c		
Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	0.12	0.10	0.50	0.20								
		Nannocystaceae	0.05	0.02	0.01	0.01								
		Phaselicystidaceae	0.10	0.11	0.18	0.07								
		Polyangiaceae	4.01	0.09	1.14	0.02								
		Sandaracinaceae	0.02	0.03	0.05	0.01								
		mle1-27	0.04	0.01	0.01	0.00								
		unclassified	0.20	0.16	0.10	0.01								
		unclassified	0.08	0.09	0.07	0.03								
		Syntrophobacterales	Syntrophaceae	0.09	0.01	0.02	0.01							
			Syntrophobacteraceae	0.13	0.08	0.09	0.05							
			unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00							
			unclassified	0.16	0.03	0.05	0.03							
		Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	0.06	0.00	0.00	0.01						
Helicobacteraceae	0.05			0.01	0.01	0.00								
Gammaproteobacteria	unclassified	unclassified	0.02	0.01	0.00	0.00								
		unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00								
		unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00								
		Aeromonadales	0.07	0.11	0.03	0.00								
		Alteromonadales	1.42	1.39	1.11	0.54								
			Shewanellaceae	0.00	0.00	0.00	0.00							
			Chromatiaceae	0.01	0.00	0.00	0.00							
			Halothiobacillaceae	0.02	0.00	0.00	0.00							
			unclassified	0.01	0.00	0.00	0.00							
			Enterobacteriales	0.01	0.00	0.00	0.00							
Gammaproteobacteria	Incertae S	unknown family	0.17	0.16	0.19	0.06								
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.01								
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.01								

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	0.05	0.02	0.32	0.30						
		Legionellaceae	0.02	0.02	0.04	0.10						
	Methylococcales	Crenotrichaceae	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Methylococcaceae	0.14	0.16	0.09	0.02						
		unclassified	0.03	0.02	0.01	0.00						
	NKB5	unclassified	0.05	0.04	0.06	0.04						
	Order Incertae Sedis	Family Incertae Sedis	0.05	0.06	0.12	0.04						
	PYR10d3	unclassified	0.01	0.01	0.01	0.00						
	Pseudomonadales	Moraxellaceae	0.04	0.00	0.00	0.00						
		Pseudomonadaceae	1.96	1.11	0.80	0.13	27.5	27.3	41.1	61.9	61.8	63.1
	Run-SP154	unclassified	0.08	0.07	0.07	0.02						
	Thiotrichales	EV818SWSAP88	0.00	0.00	0.01	0.00						
		Thiotrichaceae	3.22	0.53	0.11	0.02						
		unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	Xanthomonadales	Nevskiaceae	0.00	0.00	0.01	0.00						
		Solimonadaceae	0.00	0.00	0.00	0.00						
		Xanthomonadaceae	5.99	4.33	0.93	0.29	0.00	0.02	0.03	0.00	0.03	0.00
		Xanthomonadales Incertae Sedis	0.42	0.45	0.38	0.15						
		unclassified	0.02	0.00	0.00	0.00						
	aaa34a10	unclassified	0.01	0.01	0.00	0.00						
	unclassified	unclassified	1.16	1.26	1.75	0.52						
SPOTSOC700m83	unclassified	unclassified	0.01	0.04	0.10	0.02						
TA18	unclassified	unclassified	0.19	0.12	0.13	0.02						
unclassified	unclassified	unclassified	0.79	0.78	0.53	0.27						
SHA-109	unclassified	unclassified	0.02	0.01	0.01	0.00						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>SM2F-11</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.10	0.01	0.00	0.00						
<i>Spirochaetae</i>												
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Leptospiraceae</i>	0.06	0.00	0.00	0.01						
		<i>PL-11B10</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		<i>Spirochaetaceae</i>	0.00	0.00	0.01	0.00						
<i>Synergistetes</i>												
<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
<i>TA06</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.03	0.02	0.12	0.03						
<i>TM6</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.03	0.01	0.06	0.47						
<i>Tenericutes</i>												
<i>Mollicutes</i>	<i>RF9</i>	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
<i>Verrucomicrobia</i>												
<i>OPB35 soil group</i>	unclassified	unclassified	2.51	2.94	4.39	3.64						
<i>Opitutae</i>	<i>Opitutales</i>	<i>Opitutaceae</i>	0.03	0.05	0.09	0.06						
	unclassified	unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00						
	<i>vadinHA64</i>	unclassified	0.00	0.01	0.00	0.00						
<i>S-BQ2-57 soil group</i>	unclassified	unclassified	0.04	0.02	0.04	0.01						
<i>Spartobacteria</i>	<i>Chthoniobacterales</i>	<i>Chthoniobacteraceae</i>	0.05	0.07	0.06	0.02						
		<i>FukuN18 freshwater group</i>	0.09	0.02	0.14	0.04						
		<i>LD29</i>	0.00	0.00	0.01	0.00						
		<i>Xiphinematobacteraceae</i>	0.01	0.00	0.00	0.00						
		unclassified	0.02	0.00	0.01	0.00						
<i>Verrucomicrobia</i>	unknown order	unknown family	0.01	0.00	0.01	0.00						
<i>Incertae Sedis</i>												
<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>DEV007</i>	0.02	0.01	0.04	0.01						
		<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.65	0.66	0.96	0.19						

Class	Order	Family	I	II	III	IV	A	B	C	a	b	c
<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	unclassified	0.02	0.02	0.01	0.00						
unclassified	unclassified	unclassified	0.25	0.15	0.45	0.06						
<i>WCHB1-60</i>												
unclassified	unclassified	unclassified	0.00	0.01	0.04	0.05						
unclassified												
unclassified	unclassified	unclassified	1.94	1.65	1.75	0.78						

2.2.2 Evidence for catabolic degradation

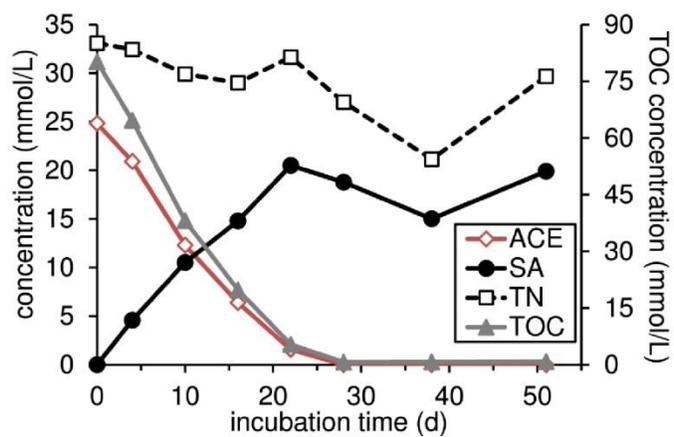


Figure S3. Molar concentration of acesulfame (ACE), sulfamic acid (SA), total organic carbon (TOC), and total nitrogen (TN) in the centrifugate of the enriched culture B, spiked with 5g/L ACE.

2.3 ACE concentration in surface water

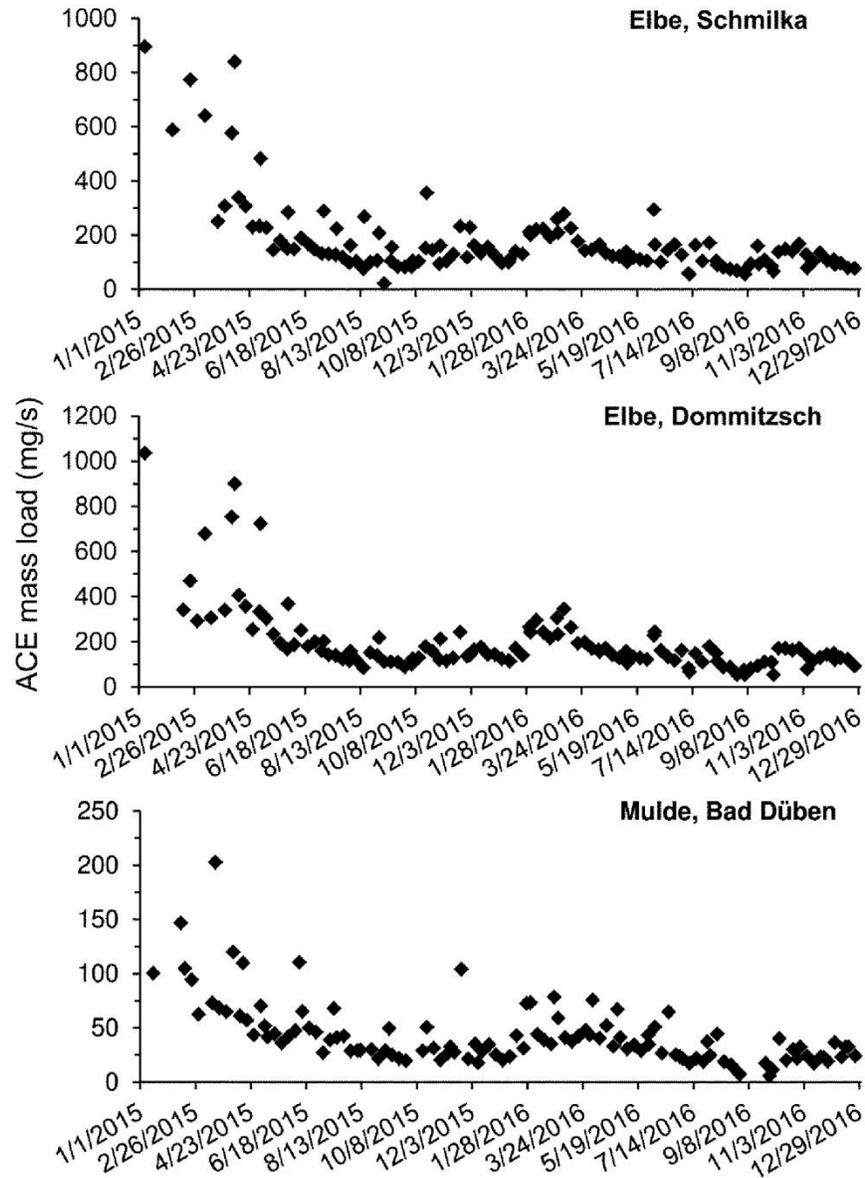


Figure S4. Mass load of acesulfame (ACE) at the different sampling stations of the German rivers Elbe and Mulde from 2015 to 2016, calculated from grab sample concentration and respective daily flow.

References

1. Kahl, S.; Nivala, J.; van Afferden, M.; Müller, R. A.; Reemtsma, T., Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators. *Water Research* 2017, *125*, 490-500.
2. Kadlec, R. H.; Wallace, S. D., *Treatment wetlands*. 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009.
3. Castronovo, S.; Wick, A.; Scheurer, M.; Nödler, K.; Schulz, M.; Ternes, T. A., Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Research* 2017, *110*, 342-353.

Literaturverzeichnis

- A, D.; Yang, Y.; Dai, Y.-n.; Chen, C.-x.; Wang, S.-y.; Tao, R. Removal and factors influencing removal of sulfonamides and trimethoprim from domestic sewage in constructed wetlands. *Bioresource Technology* **2013**, *146*, 363-370.
- Abegglen, C.; Siegrist, H. *Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser - Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen*; Bundesamt für Umwelt (BAFU): Bern, 2012.
- AbwV, Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV) Ausfertigungsdatum: 21.03.1997. **1997**.
- Adamovics, J. A. (Ed.). *Chromatographic analysis of pharmaceuticals, Second Edition*; Chromatographic Science Series Vol. 74; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997.
- Al Baz, I.; Otterpohl, R.; Wendland, C. (Eds.). *Efficient Management of Wastewater - Its Treatment and Reuse in Water-Scarce Countries*; Springer-Verlag: Berlin, 2008.
- Anumol, T.; Vijayanandan, A.; Park, M.; Philip, L.; Snyder, S. A. Occurrence and fate of emerging trace organic chemicals in wastewater plants in Chennai, India. *Environment International* **2016**, *92-93*, 33-42.
- Arbeláez, P.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marce, R. M. Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1393*, 106-114.
- Auvinen, H.; Havran, I.; Hubau, L.; Vanseveren, L.; Gebhardt, W.; Linnemann, V.; Van Oirschot, D.; Du Laing, G.; Rousseau, D. P. L. Removal of pharmaceuticals by a pilot aerated subsurface flow constructed wetland treating municipal and hospital wastewater. *Ecological Engineering* **2017**, *100*, 157-164.
- Ávila, C.; Nivala, J.; Olsson, L.; Kassa, K.; Headley, T.; Müller, R. A.; Bayona, J. M.; Garcia, J. Emerging organic contaminants in vertical subsurface flow constructed wetlands: Influence of media size, loading frequency and use of active aeration. *Science of the Total Environment* **2014**, *494*, 211-217.
- Avila, C.; Pedescoll, A.; Matamoros, V.; Maria Bayona, J.; Garcia, J. Capacity of a horizontal subsurface flow constructed wetland system for the removal of emerging pollutants: An injection experiment. *Chemosphere* **2010**, *81* (9), 1137-1142.
- Ávila, C.; Pelissari, C.; Sezerino, P. H.; Sgroi, M.; Roccaro, P.; García, J. Enhancement of total nitrogen removal through effluent recirculation and fate of PPCPs in a hybrid constructed wetland system treating urban wastewater. *Science of the Total Environment* **2017**, *584-585*, 414-425.
- Avila, C.; Reyes, C.; Bayona, J. M.; Garcia, J. Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influence of redox. *Water Research* **2013**, *47* (1), 315-325.

- Bischel, H. N.; Simon, G. L.; Frisby, T. M.; Luthy, R. G. Management Experiences and Trends for Water Reuse Implementation in Northern California. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46* (1), 180-188.
- Boog, J.; Nivala, J.; Aubron, T.; Mothes, S.; van Afferden, M.; Müller, R. A. Resilience of carbon and nitrogen removal due to aeration interruption in aerated treatment wetlands. *Science of the Total Environment* **2018**, *621*, 960-969.
- Boog, J.; Nivala, J.; Aubron, T.; Wallace, S.; van Afferden, M.; Mueller, R. A. Hydraulic characterization and optimization of total nitrogen removal in an aerated vertical subsurface flow treatment wetland. *Bioresource Technology* **2014**, *162*, 166-174.
- Bourgin, M.; Beck, B.; Boehler, M.; Borowska, E.; Fleiner, J.; Salhi, E.; Teichler, R.; von Gunten, U.; Siegrist, H.; Mc Ardell, C. S. Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant upgraded with ozonation and biological post-treatments: Abatement of micropollutants, formation of transformation products and oxidation by-products. *Water Research* **2018**, *129*, 486-498.
- Bradley, P. M.; Barber, L. B.; Kolpin, D. W.; McMahon, P. B.; Chapelle, F. H. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: Implications for use as wastewater indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26* (6), 1116-1121.
- Braha, A.; Groza, G. *Moderne Abwassertechnik - Erhebung, Modellabsicherung, Scale-Up, Planung*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
- Buerge, I. J.; Buser, H.-R.; Kahle, M.; Mueller, M. D.; Poiger, T. Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43* (12), 4381-4385.
- Buerge, I. J.; Keller, M.; Buser, H. R.; Muller, M. D.; Poiger, T. Saccharin and Other Artificial Sweeteners in Soils: Estimated Inputs from Agriculture and Households, Degradation, and Leaching to Groundwater. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45* (2), 615-621.
- Burke, V.; Greskowiak, J.; Asmuß, T.; Bremermann, R.; Taute, T.; Massmann, G. Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Science of the Total Environment* **2014**, *482-483* (0), 53-61.
- Burke, V.; Greskowiak, J.; Grunenbaum, N.; Massmann, G. Redox and Temperature Dependent Attenuation of Twenty Organic Micropollutants - A Systematic Column Study. *Water Environ Res* **2017**, *89* (2), 155-167.
- Cardenas, M. A. R.; Ali, I.; Lai, F. Y.; Dawes, L.; Thier, R.; Rajapakse, J. Removal of micropollutants through a biological wastewater treatment plant in a subtropical climate, Queensland-Australia. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* **2016**, *14*.

- Castronovo, S.; Wick, A.; Scheurer, M.; Nödler, K.; Schulz, M.; Ternes, T. A. Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters. *Water Research* **2017**, *110*, 342-353.
- Chen, Y.; Vymazal, J.; Březinová, T.; Koželuh, M.; Kule, L.; Huang, J.; Chen, Z. Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Science of the Total Environment* **2016**, *566-567*, 1660-1669.
- Conkle, J. L.; White, J. R.; Metcalfe, C. D. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* **2008**, *73* (11), 1741-1748.
- Copley, S. D. Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5* (8), 560-567.
- Corradini, D. (Ed.) Cazes, J. (Series Ed.). *Handbook of HPLC, Second Edition*; Chromatographic Science Series Vol. 101; CRC Press: Boca Raton, 2011.
- Danzer, K. *Analytical Chemistry - Theoretical and Metrological Fundamentals*; Springer: Berlin, 2007.
- Deo, R. P.; Halden, R. U. Effect of sample filtration on the quality of monitoring data reported for organic compounds during wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring* **2010**, *12* (2), 478-483.
- Devers, M.; Rouard, N.; Martin-Laurent, F. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology* **2008**, *10* (3), 676-684.
- DIN *Norm DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*; Beuth: Berlin, 2008.
- Drewes, J. E.; Anderson, P.; Denslow, N.; Olivieri, A.; Schlenk, D.; Snyder, S. A.; Maruya, K. A. Designing monitoring programs for chemicals of emerging concern in potable reuse - what to include and what not to include? *Water Science and Technology* **2013**, *67* (2), 433-439.
- DWA *Möglichkeiten der Elimination von anthropogenen Spurenstoffen*; DWA-Themen T3/2015 Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V. (DWA): Hennef, 2015.
- ECETOC *Aquatic Toxicity of Mixtures - Technical Report No. 80*; Technical Report No. 80 European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: Brussels, 2001.
- Edwards, Q. A.; Kulikov, S. M.; Garner-O'Neale, L. D.; Metcalfe, C. D.; Sultana, T. Contaminants of emerging concern in surface waters in Barbados, West Indies. *Environmental Monitoring and Assessment* **2017**, *189* (12).

- Engelhardt, I.; Prommer, H.; Moore, C.; Schulz, M.; Schueth, C.; Ternes, T. A. Suitability of temperature, hydraulic heads, and acesulfame to quantify wastewater-related fluxes in the hyporheic and riparian zone. *Water Resources Research* **2013**, *49* (1), 426-440.
- Escher, B. I.; Baumgartner, R.; Koller, M.; Treyer, K.; Lienert, J.; McArdell, C. S. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research* **2011**, *45* (1), 75-92.
- European Commission, Directorate-General for Health & Consumers; Scientific Committees SCHER & SCENIHR & SCCS. Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. **2012**.
- European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015. **2015**.
- European Parliament and Council, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. **2000**.
- European Parliament and Council, Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. **2013**.
- Falås, P.; Wick, A.; Castronovo, S.; Habermacher, J.; Ternes, T. A.; Joss, A. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research* **2016**, *95*, 240-249.
- Fatta-Kassinos, D.; Bester, K.; Kümmerer, K. (Eds.). *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*; Environmental Pollution 16; Springer: Dordrecht, 2010.
- Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **2006**, *76* (2), 122-159.
- Fernandez-Fontaina, E.; Omil, F.; Lema, J. M.; Carballa, M. Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Research* **2012**, *46* (16), 5434-5444.
- Froehner, S.; Piccioni, W.; Machado, K. S.; Aisse, M. M. Removal Capacity of Caffeine, Hormones, and Bisphenol by Aerobic and Anaerobic Sewage Treatment. *Water Air and Soil Pollution* **2011**, *216* (1-4), 463-471.
- Funke, J.; Prasse, C.; Eversloh, C. L.; Ternes, T. A. Oxypurinol - A novel marker for wastewater contamination of the aquatic environment. *Water Research* **2015**, *74*, 257-265.
- Gan, Z. W.; Sun, H. W.; Feng, B. T.; Wang, R. N.; Zhang, Y. W. Occurrence of seven artificial sweeteners in the aquatic environment and precipitation of Tianjin, China. *Water Research* **2013**, *47* (14), 4928-4937.

- Geller, G.; Höner, G. *Anwenderhandbuch Pflanzenkläranlagen - Praktisches Qualitätsmanagement bei Planung, Bau und Betrieb*; Springer-Verlag: Berlin, 2003.
- Gross, J. H. *Mass Spectrometry - A Textbook, Second Edition*; Springer: Berlin, 2011.
- Gujer, W. *Siedlungswasserwirtschaft, 3. Auflage*; Springer-Verlag: Berlin, 2007.
- Haberl, R.; Grego, S.; Langergraber, G.; Kadlec, R. H.; Cicalini, A.-R.; Dias, S. M.; Novais, J. M.; Aubert, S.; Gerth, A.; Thomas, H.; Hebner, A. Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants. *Journal of Soils and Sediments* **2003**, 3 (2), 109.
- Hai, F. I.; Li, X.; Price, W. E.; Nghiem, L. D. Removal of carbamazepine and sulfamethoxazole by MBR under anoxic and aerobic conditions. *Bioresource Technology* **2011**, 102 (22), 10386-10390.
- Hellauer, K.; Karakurt, S.; Sperlich, A.; Burke, V.; Massmann, G.; Hübner, U.; Drewes, J. E. Establishing sequential managed aquifer recharge technology (SMART) for enhanced removal of trace organic chemicals: Experiences from field studies in Berlin, Germany. *Journal of Hydrology* **2017a**, DOI:10.1016/j.jhydrol.2017.09.044.
- Hellauer, K.; Mergel, D.; Ruhl, A. S.; Filter, J.; Huebner, U.; Jekel, M.; Drewes, J. E. Advancing Sequential Managed Aquifer Recharge Technology (SMART) Using Different Intermediate Oxidation Processes. *Water* **2017b**, 9 (3).
- Helsel, D. Much Ado About Next to Nothing: Incorporating Nondetects in Science. *Annals of Occupational Hygiene* **2010**, 54 (3), 257-262.
- Helsel, D. R. Fabricating data: How substituting values for nondetects can ruin results, and what can be done about it. *Chemosphere* **2006**, 65 (11), 2434-2439.
- Hermes, N.; Jewell, K. S.; Wick, A.; Ternes, T. A. Quantification of more than 150 micropollutants including transformation products in aqueous samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using scheduled multiple reaction monitoring. *Journal of Chromatography A* **2018**, 1531, 64-73.
- Herzog, B.; Lemmer, H.; Huber, B.; Horn, H.; Mueller, E. Xenobiotic benzotriazoles-biodegradation under meso- and oligotrophic conditions as well as denitrifying, sulfate-reducing, and anaerobic conditions. *Environmental Science and Pollution Research* **2014**, 21 (4), 2795-2804.
- Hijosa-Valsero, M.; Fink, G.; Schlusener, M. P.; Sidrach-Cardona, R.; Martin-Villacorta, J.; Ternes, T.; Becares, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. *Chemosphere* **2011a**, 83 (5), 713-719.
- Hijosa-Valsero, M.; Matamoros, V.; Martin-Villacorta, J.; Becares, E.; Bayona, J. M. Assessment of full-scale natural systems for the removal of PPCPs from wastewater in small communities. *Water Research* **2010a**, 44 (5), 1429-1439.
- Hijosa-Valsero, M.; Matamoros, V.; Pedescoll, A.; Martin-Villacorta, J.; Becares, E.; Garcia, J.; Bayona, J. M. Evaluation of primary treatment and loading regimes in the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters by subsurface-flow

- constructed wetlands. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2011b**, 91 (7-8), 632-653.
- Hijosa-Valsero, M.; Matamoros, V.; Sidrach-Cardona, R.; Martín-Villacorta, J.; Bécares, E.; Bayona, J. M. Comprehensive assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Research* **2010b**, 44 (12), 3669-3678.
- Hijosa-Valsero, M.; Reyes-Contreras, C.; Dominguez, C.; Becares, E.; Bayona, J. M. Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. *Chemosphere* **2016**, 145, 508-517.
- Hillebrand, O.; Musallam, S.; Scherer, L.; Noedler, K.; Licha, T. The challenge of sample-stabilisation in the era of multi-residue analytical methods: A practical guideline for the stabilisation of 46 organic micropollutants in aqueous samples. *Science of the Total Environment* **2013**, 454, 289-298.
- Holleman, A. F.; Wiberg, N. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 102. Auflage*; Walter de Gruyter & Co.: Berlin, 2007.
- Hoppe-Jones, C.; Dickenson, E. R. V.; Drewes, J. E. The role of microbial adaptation and biodegradable dissolved organic carbon on the attenuation of trace organic chemicals during groundwater recharge. *Science of the Total Environment* **2012**, 437, 137-144.
- Huntscha, S.; Singer, H. P.; McArdell, C. S.; Frank, C. E.; Hollender, J. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1268, 74-83.
- Huvaere, K.; Vandevijvere, S.; Hasni, M.; Vinkx, C.; Van Loco, J. Dietary intake of artificial sweeteners by the Belgian population. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **2012**, 29 (1), 54-65.
- Imhoff, K.; Imhoff, K. R.; Jardin, N. *Taschenbuch der Stadtentwässerung, 32. Auflage*; Deutscher Industrieverlag GmbH: Essen, 2018.
- Janssen, D. B.; Dinkla, I. J. T.; Poelarends, G. J.; Terpstra, P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology* **2005**, 7 (12), 1868-1882.
- Jekel, M.; Dott, W. *Leitfaden der BMBF-Fördermaßnahme "Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf" (RiSKWa): Polare organische Spurenstoffe als Indikatoren im anthropogen beeinflussten Wasserkreislauf - Ergebnisse des Querschnittsthemas „Indikatorsubstanzen“*; DECHEMA e.V.: Frankfurt, 2013.
- Jekel, M.; Dott, W.; Bergmann, A.; Dünnebier, U.; Gnirß, R.; Haist-Gulde, B.; Hamscher, G.; Letzel, M.; Licha, T.; Lyko, S.; Mieke, U.; Sacher, F.; Scheurer, M.; Schmidt, C. K.;

- Reemtsma, T.; Ruhl, A. S. Selection of organic process and source indicator substances for the anthropogenically influenced water cycle. *Chemosphere* **2015**, *125* (0), 155-167.
- Jones, S. M.; Chowdhury, Z. K.; Watts, M. J. A taxonomy of chemicals of emerging concern based on observed fate at water resource recovery facilities. *Chemosphere* **2017**, *170*, 153-160.
- Juan-García, P.; Butler, D.; Comas, J.; Darch, G.; Sweetapple, C.; Thornton, A.; Corominas, L. Resilience theory incorporated into urban wastewater systems management. State of the art. *Water Research* **2017**, *115*, 149-161.
- Kadlec, R. H.; Reddy, K. R. Temperature Effects in Treatment Wetlands. *Water Environment Research* **2001**, *73* (5), 543-557.
- Kadlec, R. H.; Wallace, S. D. *Treatment wetlands*; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009.
- Kellis, M.; Kalavrouziotis, I. K.; Gikas, P. Review of wastewater reuse in the mediterranean countries, focusing on regulations and policies for municipal and industrial applications. *Global Nest Journal* **2013**, *15* (3), 333-350.
- Kellner, R.; Mermet, J.-M.; Otto, M.; Valcarcel, M.; Widmer, H. M. (Eds.). *Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science, Second Edition*; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- König, A.; Weidauer, C.; Seiwert, B.; Reemtsma, T.; Unger, T.; Jekel, M. Reductive transformation of carbamazepine by abiotic and biotic processes. *Water Research* **2016**, *101*, 272-280.
- Krah, D.; Ghattas, A.-K.; Wick, A.; Broeder, K.; Ternes, T. A. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. *Water Research* **2016**, *95*, 348-360.
- Kushnir, M. M.; Rockwood, A. L.; Nelson, G. J.; Yue, B. F.; Urry, F. M. Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* **2005**, *38* (4), 319-327.
- Lahti, M.; Oikari, A. Microbial Transformation of Pharmaceuticals Naproxen, Bisoprolol, and Diclofenac in Aerobic and Anaerobic Environments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2011**, *61* (2), 202-210.
- Le Donne, C.; Mistura, L.; Goscinny, S.; Janvier, S.; Cuypers, K.; D'Addezio, L.; Sette, S.; Catasta, G.; Ferrari, M.; Piccinelli, R.; Van Loco, J.; Turrini, A. Assessment of dietary intake of 10 intense sweeteners by the Italian population. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *102*, 186-197.
- Li, Y.; Zhu, G.; Ng, W. J.; Tan, S. K. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment* **2014**, *468*, 908-932.
- Li, Z.; Sobek, A.; Radke, M. Fate of Pharmaceuticals and Their Transformation Products in Four Small European Rivers Receiving Treated Wastewater. *Environmental Science & Technology* **2016**, *50* (11), 5614-5621.

- Liu, H.; Hu, Z.; Zhang, J.; Ngo, H. H.; Guo, W.; Liang, S.; Fan, J.; Lu, S.; Wu, H. Optimizations on supply and distribution of dissolved oxygen in constructed wetlands: A review. *Bioresource Technology* **2016**, *214*, 797-805.
- Liu, L.; Liu, C. X.; Zheng, J. Y.; Huang, X.; Wang, Z.; Liu, Y. H.; Zhu, G. F. Elimination of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes from swine wastewater in the vertical flow constructed wetlands. *Chemosphere* **2013**, *91* (8), 1088-1093.
- Liu, Y.-S.; Ying, G.-G.; Shareef, A.; Kookana, R. S. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Research* **2011**, *45* (16), 5005-5014.
- LUBW *Spurenstoffinventar der Fließgewässer in Baden-Württemberg - Ergebnisse der Beprobung von Fließgewässern und Kläranlagen 2012/2013*; Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg: Karlsruhe, 2014.
- Lv, T.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Carvalho, P. N.; Arias, C. A.; Brix, H. Removal of the pesticides imazalil and tebuconazole in saturated constructed wetland mesocosms. *Water Research* **2016**, *91*, 126-136.
- Matamoros, V.; Arias, C.; Brix, H.; Bayona, J. M. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from urban wastewater in a pilot vertical flow constructed wetland and a sand filter. *Environmental Science & Technology* **2007**, *41* (23), 8171-8177.
- Matamoros, V.; Arias, C.; Brix, H.; Bayona, J. M. Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Research* **2009**, *43* (1), 55-62.
- Matamoros, V.; Bayona, J. M. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (18), 5811-5816.
- Matamoros, V.; Caselles-Osorio, A.; Garcia, J.; Bayona, J. M. Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. *Science of the Total Environment* **2008**, *394* (1), 171-176.
- Matamoros, V.; Garcia, J.; Bayona, J. M. Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: A pilot-scale study. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (14), 5449-5454.
- Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (13), 3019-3030.
- Men, Y.; Achermann, S.; Helbling, D. E.; Johnson, D. R.; Fenner, K. Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation. *Water Research* **2017**, *109*, 217-226.
- Mizyed, N. R. Challenges to treated wastewater reuse in arid and semi-arid areas. *Environmental Science & Policy* **2013**, *25*, 186-195.

- Moir, J. W. B. (Ed.). *Nitrogen Cycling in Bacteria - Molecular Analysis*; Caister Academic Press: Norfolk, UK, 2011.
- Monsalvo, V. M.; McDonald, J. A.; Khan, S. J.; Le-Clech, P. Removal of trace organics by anaerobic membrane bioreactors. *Water Research* **2014**, *49*, 103-112.
- Müller, J.; Drewes, J. E.; Hübner, U. Sequential biofiltration – A novel approach for enhanced biological removal of trace organic chemicals from wastewater treatment plant effluent. *Water Research* **2017**, *127*, 127-138.
- Murphy, C.; Rajabzadeh, A. R.; Weber, K. P.; Nivala, J.; Wallace, S. D.; Cooper, D. J. Nitrification cessation and recovery in an aerated saturated vertical subsurface flow treatment wetland: Field studies and microscale biofilm modeling. *Bioresource Technology* **2016**, *209*, 125-132.
- Niessen, W. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Third Edition*; Chromatographic Science Series Vol. 97, CRC Press: Boca Raton, 2006.
- Nivala, J.; Headley, T.; Wallace, S.; Bernhard, K.; Brix, H.; van Afferden, M.; Mueller, R. A. Comparative analysis of constructed wetlands: The design and construction of the ecotechnology research facility in Langenreichenbach, Germany. *Ecological Engineering* **2013a**, *61*, 527-543.
- Nivala, J.; Kahl, S.; Boog, J.; van Afferden, M.; Reemtsma, T.; Müller, R. A. Dynamics of emerging organic contaminant removal by conventional and intensified subsurface flow treatment wetland designs. *Science of the Total Environment* **2018a**, *submitted*.
- Nivala, J.; Neale, P. A.; Haasis, T.; Kahl, S.; König, M.; Müller, R. A.; Reemtsma, T.; Schlichting, R.; Escher, B. I. Application of cell-based bioassays to evaluate treatment efficacy of conventional and intensified treatment wetlands. *Environmental Science-Water Research & Technology* **2018b**, *4* (2), 206-217.
- Nivala, J.; Wallace, S.; Headley, T.; Kassa, K.; Brix, H.; van Afferden, M.; Mueller, R. Oxygen transfer and consumption in subsurface flow treatment wetlands. *Ecological Engineering* **2013b**, *61*, 544-554.
- Nödler, K.; Hillebrand, O.; Idzik, K.; Strathmann, M.; Schiperski, F.; Zirlwagen, J.; Licha, T. Occurrence and fate of the angiotensin II receptor antagonist transformation product valsartan acid in the water cycle – A comparative study with selected β -blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and acesulfame. *Water Research* **2013**, *47* (17), 6650-6659.
- OECD, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Test No. 301: Ready Biodegradability; adopted by the Council on 17th July 1992. **1992**.
- Ordóñez, E. Y.; Quintana, J. B.; Rodil, R.; Cela, R. Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1256*, 197-205.
- Pailler, J. Y.; Krein, A.; Pfister, L.; Hoffmann, L.; Guignard, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides,

- tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment* **2009**, 407 (16), 4736-4743.
- Pal, A.; He, Y.; Jekel, M.; Reinhard, M.; Gin, K. Y.-H. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International* **2014**, 71, 46-62.
- Panuwet, P.; Hunter, R. E.; D'Souza, P. E.; Chen, X. Y.; Radford, S. A.; Cohen, J. R.; Marder, M. E.; Kartavenka, K.; Ryan, P. B.; Barr, D. B. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2016**, 46 (2), 93-105.
- Perkola, N.; Sainio, P. Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry. *Environmental Pollution* **2014**, 184, 391-396.
- Petrie, B.; Smith, B. D.; Youdan, J.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. Multi-residue determination of micropollutants in *Phragmites australis* from constructed wetlands using microwave assisted extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2017**, 959, 91-101.
- Quintana, J. B.; Weiss, S.; Reemtsma, T. Pathway's and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research* **2005**, 39 (12), 2654-2664.
- Rauch-Williams, T.; Hoppe-Jones, C.; Drewes, J. E. The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research* **2010**, 44 (2), 449-460.
- Reemtsma, T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000 (1-2), 477-501.
- Reemtsma, T.; Alder, L.; Banasiak, U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1271, 95-104.
- Reemtsma, T.; Berger, U.; Arp, H. P. H.; Gallard, H.; Knepper, T. P.; Neumann, M.; Quintana, J. B.; de Voogt, P. Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds Water Contaminants That Slip Through. *Environmental Science & Technology* **2016**, 50 (19), 10308-10315.
- Regnery, J.; Wing, A. D.; Alidina, M.; Drewes, J. E. Biotransformation of trace organic chemicals during groundwater recharge: How useful are first-order rate constants? *Journal of contaminant hydrology* **2015**, 179 (0), 65-75.
- Rehm, H.; Letzel, T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, 7. Auflage*; Springer-Verlag: Berlin, 2016.
- Reyes-Contreras, C.; Hijosa-Valsero, M.; Sidrach-Cardona, R.; Bayona, J. M.; Becares, E. Temporal evolution in PPCP removal from urban wastewater by constructed wetlands of different configuration: A medium-term study. *Chemosphere* **2012**, 88 (2), 161-167.

- Reyes-Contreras, C.; Matamoros, V.; Ruiz, I.; Soto, M.; Bayona, J. M. Evaluation of PPCPs removal in a combined anaerobic digester-constructed wetland pilot plant treating urban wastewater. *Chemosphere* **2011**, *84* (9), 1200-1207.
- Richardson, S. D.; Kimura, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical chemistry* **2016**, *88* (1), 546-582.
- Richardson, S. D.; Temes, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical chemistry* **2018**, *90* (1), 398-428.
- Riemenschneider, C.; Al-Raggad, M.; Moeder, M.; Seiwert, B.; Salameh, E.; Reemtsma, T. Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables Irrigated with Treated Municipal Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64* (29), 5784-5792.
- Roehrdanz, P. R.; Feraud, M.; Lee, D. G.; Means, J. C.; Snyder, S. A.; Holden, P. A. Spatial Models of Sewer Pipe Leakage Predict the Occurrence of Wastewater Indicators in Shallow Urban Groundwater. *Environmental Science & Technology* **2017**, *51* (3), 1213-1223.
- Rousseau, D. P. L.; Vanrolleghem, P. A.; De Pauw, N. Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis. *Ecological Engineering* **2004**, *23* (3), 151-163.
- Ryu, J.; Oh, J.; Snyder, S. A.; Yoon, Y. Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant (Seoul, South Korea). *Environmental Monitoring and Assessment* **2014**, *186* (5), 3239-3251.
- Salas, D.; Borrull, F.; Fontanals, N.; Marce, R. M. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (15), 4277-4285.
- Sang, Z.; Jiang, Y.; Tsoi, Y.-K.; Leung, K. S.-Y. Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Research* **2014**, *52*, 260-274.
- Schaider, L. A.; Ackerman, J. M.; Rudel, R. A. Septic systems as sources of organic wastewater compounds in domestic drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Science of the Total Environment* **2016**, *547*, 470-481.
- Schaum, C. A. *Abwasserbehandlung der Zukunft: Gesundheits-, Gewässer- und Ressourcenschutz (Habilitationsschrift)*; Schriftenreihe IWAR Verein zur Förderung des Instituts der TU Darmstadt e.V.: Darmstadt, 2016.
- Scheurer, M.; Brauch, H. J.; Lange, F. T. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394* (6), 1585-1594.
- Scheurer, M.; Storck, F. R.; Graf, C.; Brauch, H.-J.; Ruck, W.; Lev, O.; Lange, F. T. Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment. *Journal of Environmental Monitoring* **2011**, *13* (4), 966-973.

- Shapir, N.; Mongodin, E. F.; Sadowsky, M. J.; Daugherty, S. C.; Nelson, K. E.; Wackett, L. P. Evolution of catabolic pathways: Genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *Journal of Bacteriology* **2007**, *189* (3), 674-682.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Instrumentelle Analytik, Grundlagen - Geräte - Anwendungen, 6. Auflage*; Springer: Berlin, 2013.
- Spoelstra, J.; Senger, N. D.; Schiff, S. L. Artificial Sweeteners Reveal Septic System Effluent in Rural Groundwater. *Journal of Environmental Quality* **2017**, *46* (6), 1434-1443.
- Storck, F. R.; Skark, C.; Remmler, F.; Brauch, H. J. Environmental fate and behavior of acesulfame in laboratory experiments. *Water Science and Technology* **2016**, *74* (12), 2832-2842.
- Suarez, S.; Lema, J. M.; Omil, F. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research* **2010**, *44* (10), 3214-3224.
- Subedi, B.; Balakrishna, K.; Sinha, R. K.; Yamashita, N.; Balasubramanian, V. G.; Kannan, K. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants in India. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2015**, *3* (4, Part A), 2882-2891.
- Subedi, B.; Kannan, K. Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (23), 13668-13674.
- Tchobanoglous, G.; Metcalf & Eddy (AECOM) (Ed.) *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery: Treatment and Reuse, Fifth Edition*; McGraw-Hill Education: New York, 2014.
- Tran, N. H.; Gan, J.; Viet Tung, N.; Chen, H.; You, L.; Duarah, A.; Zhang, L.; Gin, K. Y.-H. Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes. *Bioresource Technology* **2015**, *197*, 329-338.
- Tran, N. H.; Hu, J. Y.; Ong, S. L. Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled With HPLC-MS/MS and isotope dilution. *Talanta* **2013**, *113*, 82-92.
- Tran, N. H.; Nguyen, V. T.; Urase, T.; Ngo, H. H. Role of nitrification in the biodegradation of selected artificial sweetening agents in biological wastewater treatment process. *Bioresource Technology* **2014**, *161*, 40-46.
- Umweltbundesamt; Rechenberg, B. (Ed.) *Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern - Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge*; Position: Dessau-Roßlau, 2015.
- Van Stempvoort, D. R.; Roy, J. W.; Brown, S. J.; Bickerton, G. Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology* **2011**, *401* (1-2), 126-133.

- Verlicchi, P.; Al Aukidy, M.; Zambello, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment* **2012**, *429*, 123-155.
- Verlicchi, P.; Zambello, E. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. *Science of the Total Environment* **2014**, *470*, 1281-1306.
- Vin, K.; Connolly, A.; McCaffrey, T.; McKeivitt, A.; O'Mahony, C.; Prieto, M.; Tennant, D.; Hearty, A.; Volatier, J. L. Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK and Ireland as part of the FACET project. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **2013**, *30* (12), 2050-2080.
- Völker, J.; Vogt, T.; Castronovo, S.; Wick, A.; Ternes, T. A.; Joss, A.; Oehlmann, J.; Wagner, M. Extended anaerobic conditions in the biological wastewater treatment: Higher reduction of toxicity compared to target organic micropollutants. *Water Research* **2017**, *116*, 220-230.
- Vymazal, J. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45* (1), 61-69.
- Vymazal, J.; Brezinova, T. D.; Kozeluh, M.; Kule, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in four full-scale constructed wetlands in the Czech Republic - the first year of monitoring. *Ecological Engineering* **2017**, *98*, 354-364.
- Wang, J.; Wang, S. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management* **2016**, *182*, 620-640.
- Watanabe, Y.; Bach, L. T.; Dinh, P. V.; Prudente, M.; Aguja, S.; Phay, N.; Nakata, H. Ubiquitous Detection of Artificial Sweeteners and Iodinated X-ray Contrast Media in Aquatic Environmental and Wastewater Treatment Plant Samples from Vietnam, The Philippines, and Myanmar. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **2016**, *70* (4), 671-681.
- Wellmitz, J.; Gluschke, M. *Leitlinie zur Methodvalidierung*, Texte Umweltbundesamt: Berlin, 2005.
- WHG, Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts (Wasserhaushaltsgesetz - WHG) Ausfertigungsdatum: 31.07.2009. **2009**.
- Yang, Y.-Y.; Liu, W.-R.; Liu, Y.-S.; Zhao, J.-L.; Zhang, Q.-Q.; Zhang, M.; Zhang, J.-N.; Jiang, Y.-X.; Zhang, L.-J.; Ying, G.-G. Suitability of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) as wastewater indicators in the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment* **2017**, *590*, 611-619.
- Zhang, C.-B.; Wang, J.; Liu, W.-L.; Zhu, S.-X.; Ge, H.-L.; Chang, S. X.; Chang, J.; Ge, Y. Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* **2010**, *36* (1), 62-68.

- Zhang, D. Q.; Gersberg, R. M.; Hua, T.; Zhu, J.; Tuan, N. A.; Tan, S. K. Pharmaceutical removal in tropical subsurface flow constructed wetlands at varying hydraulic loading rates. *Chemosphere* **2012a**, 87 (3), 273-277.
- Zhang, D. Q.; Gersberg, R. M.; Ng, W. J.; Tan, S. K. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution* **2014**, 184, 620-639.
- Zhang, D. Q.; Gersberg, R. M.; Zhu, J. F.; Hua, T.; Jinadasa, K.; Tan, S. K. Batch versus continuous feeding strategies for pharmaceutical removal by subsurface flow constructed wetland. *Environmental Pollution* **2012b**, 167, 124-131.
- Zhang, D. Q.; Tan, S. K.; Gersberg, R. M.; Sadreddini, S.; Zhu, J. F.; Nguyen, A. T. Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecological Engineering* **2011**, 37 (3), 460-464.
- Zhang, L.; Lv, T.; Zhang, Y.; Stein, O. R.; Arias, C. A.; Brix, H.; Carvalho, P. N. Effects of constructed wetland design on ibuprofen removal - A mesocosm scale study. *Science of the Total Environment* **2017a**, 609, 38-45.
- Zhang, Y.; Lv, T.; Carvalho, P. N.; Zhang, L.; Arias, C. A.; Chen, Z. H.; Brix, H. Ibuprofen and iohexol removal in saturated constructed wetland mesocosms. *Ecological Engineering* **2017b**, 98, 394-402.
- Zwiener, C.; Frimmel, F. H. Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment* **2003**, 309 (1-3), 201-211.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1. Schema der wichtigsten Schritte des Stickstoffkreislaufs in Untergrundpflanzenkläranlagen. Organisch gebundener Stickstoff (N_{org}) meint Verbindungen in Lösung sowie in Zellen (Mikroorganismen, Pflanzen). Höhere pH-Werte verschieben das Gleichgewicht NH_3/NH_4^+ zunehmend in Richtung Ammoniak, welches ausgasen kann. C: geeignete, oxidierbare organische Verbindungen.....6
- Abbildung 2-2. Schematische Darstellung eines a) horizontal durchströmten und b) vertikal durchströmten, bepflanzten Bodenfilters von Pflanzenkläranlagen.....9
- Abbildung 2-3. Teil-Fließschema der konventionellen Abwasserbehandlung mit verbesserter Nährstoffentfernung, modifiziert nach Tchobanoglous (2014). Primärablauf: Abwasser nach der ersten Reinigungsstufe (mechanische Behandlung), z. B. nach Rechen, Sand- und Fettfang sowie einem ersten Absetzbecken. 10
- Abbildung 3-1. Oben: Chromatogramm des Totalionenstroms (TIC, *engl. total ion current*) und Gradientenprogramm der mobilen Phase (A: Reinstwasser mit 0,1% Essigsäure, B: Methanol mit 0,1% Essigsäure). Unten: Chromatogramm mit allen *Quantifier*-Übergängen der Indikatoren sowie internen Standards. Konzentration der Analyten: 0,5 – 10 ng/mL (Indikatoren) bzw. 5,0 – 40 ng/mL (interne Standards). 28
- Abbildung 3-2. Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Peakfläche gewählter Massenübergänge von der Konzentration des Analyten (Konzentration in Kalibrierstandards veränderlich) bzw. internen Standards (IS, Konzentration in Kalibrierstandards konstant) für alle Analyten und IS außer DCL und DCL-d₄ (a) sowie für DCL und DCL-d₄ (b). Diese unterschiedlichen Verläufe der Massenübergänge der IS resultieren in verschiedenen Kalibriergeradenverläufen (c). 29
- Abbildung 3-3. Schematische Darstellung der Kenngrößen im S/N-Verfahren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD bzw. LOQ): Mittelwert (y_{blank}) und Standardabweichung ($N\sigma$) des Signalgrundrauschens (schwarze Linie) sowie daraus resultierende Signalthöhen y_{LOD} und y_{LOQ} (Formel 3-3, 3-4). .31
- Abbildung 3-4. Monatliche frachtbasierte Entfernung (% , Median) der leicht bioabbaubaren Spurenstoffe Coffein (CAF), Ibuprofen (IBU) und Naproxen (NPX) sowie von Ammoniumstickstoff (NH_4-N) , Gesamtkohlenstoffgehalt (TOC) und des biochemischen Sauerstoffbedarfs ($CBOD_5$) in den neu in Betrieb genommenen Systemen HM und HMc sowie im etablierten System HAp zwischen September 2014 und August 2015. Für HAp liegen im Juli 2015 keine Indikatordaten vor. 52

- Abbildung 3-5. Monatliche frachtbasierte Entfernung (% Median) der moderat bioabbaubaren Spurenstoffe Benzotriazol (BTZ), Diclofenac (DCL) und Acesulfam (ACE) sowie des Gesamtstickstoffgehalts (TN) in den neu in Betrieb genommenen Systemen HM und HMc sowie im etablierten System HAp zwischen September 2014 und August 2015. Für HAp liegen im Juli 2015 keine Indikator Daten vor.53
- Abbildung 3-6. Konzentrationen der leicht bioabbaubaren Indikatoren Coffein (CAF), Ibuprofen (IBU), Naproxen (NPX) und der mäßig bioabbaubaren Indikatoren Benzotriazol (BTZ), Diclofenac (DCL) und Acesulfam (ACE) im Ablauf der Systeme HA und VA vor (Basislinie, bis Tag 0) und nach Abschalten der Belüftung (Tag 0 bis 6) sowie nach Wiedereinschalten der Belüftung (Erholung, ab Tag 6). Datenpunkte im Intervall „Basislinie“ wurden jeweils 35 Tage vor Abschalten der Belüftung bis zum Abschalten wöchentlich ermittelt; sie entsprechen damit nicht der Skalierung der Punkte ab dem Abschalten der Belüftung (Tag 0)...59
- Abbildung 4-1. Schema der Anreicherung Acesulfam-abbauender Mikroorganismen, ausgehend von frischer Biomasse der Pflanzenkläranlage HAp (Juli 2015) durch mehrfaches Überimpfen in bzw. auf frisches Medium (14 °C). Als flüssiges Medium wurde DSMZ-Medium 462 mit sukzessiv steigendem Acesulfamgehalt verwendet. Ausstriche erfolgten auf Agar-Medium basierend auf DSMZ-Medium 462 (Selektiv-Agar) bzw. *nutrient broth* (NB-Agar; Komplexmedium). Biomasse zur DNA-Extraktion und Sequenzierung wurde direkt nach dem Ansetzen der Kulturen I, II und III sowie nach 54 d Inkubation von Kultur III (= Probe IV) entnommen. Die Flüssigkulturen A-C sowie a-c wurden nach längerer Laufzeit (> 250 d) mit Glycerol versetzt, bei -155 °C gelagert und nach zwei Monaten wieder in DSMZ-Medium 462 mit Acesulfam inkubiert (Raumtemperatur). DNA zur Sequenzierung der 16S rRNA-Gene zur Identifikation der Mikroorganismen wurde aus diesen reaktivierten Kulturen extrahiert.66
- Abbildung 4-2. Postulierter, schematischer Abbauweg von Acesulfam (ACE), modifiziert nach Castronovo *et al.* (2017). Bedingungen, Anzahl und Art der Transformationsschritte vor Ringöffnung von ACE bzw. Bildung des stabilen Endproduktes Amidosulfonsäure (SA) sind bisher nicht bekannt und sind durch ein Fragezeichen symbolisiert.82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1.	Anforderungen an die Ablaufqualität behandelten kommunalen Abwassers für die Eileitung in ein Gewässer lt. Abwasserverordnung (AbwV 1997). Die Größenklassen werden anhand des biochemischen Sauerstoffbedarfs von 5 Tagen (BSB ₅) im Rohabwasser festgesetzt. Die BSB ₅ -Fracht im Rohabwasser kann mittels des Einwohnergleichwerts von 60 g/(Einwohner·d) BSB ₅ (Gujer 2007, Imhoff <i>et al.</i> 2018) auf die Ausbaugröße in Einwohnerwerten (EW) umgerechnet werden. CSB: Chemischer Sauerstoffbedarf, NH ₄ -N: Ammoniumstickstoff, N _{ges} : Summe des Stickstoffs aus Ammonium, Nitrat und Nitrit, P _{ges} : Gesamtphosphor.....	11
Tabelle 2-2.	Übersicht von Studien zur Elimination organischer anthropogener Spurenstoffe mittels Pflanzenkläranlagen aus vorbehandeltem realem Abwasser (z. B. mittels Absetztank) oder aus synthetischem Abwasser. Studien, die die Eignung als Nachbehandlungsmethode („ <i>tertiary treatment</i> “) prüfen, wurden nicht einbezogen, da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Eignung von Pflanzenkläranlagen als zweite Reinigungsstufe lag. Abkürzungen sind am Ende der Tabelle erklärt.	14
Tabelle 2-3.	Verwendung und Abbauverhalten der ausgewählten Prozessindikatoren für Bioabbau unter verschiedenen Redoxbedingungen, sortiert nach abnehmender Bioabbaubarkeit unter aeroben Bedingungen.....	17
Tabelle 3-1.	Charakterisierung der untersuchten Untergrundpflanzenkläranlagen inkl. Beschickung während der untersuchten Zeiträume und Zuordnung zu den drei Teilstudien. Studie 1: Juni 2014 – Mai 2015, Studie 2: September 2014 – August 2015, Studie 3: Juni – August 2015. Außer R, VA und HA waren alle Systeme bepflanzt (<i>Phragmites australis</i>), „Tiefe“ meint die effektive Tiefe (maximale Füllhöhe) des Systems. Die Anlagen sind in Abbildung A-1 bis Abbildung A-6 schematisch dargestellt.	24
Tabelle 3-2.	Chemische Strukturen der ausgewählten Indikatoren und der entsprechenden isotoopenmarkierten, internen Standards (IS) sowie Konzentrationen der IS in allen Proben. Die Konzentration von ACE-d ₄ bezieht sich auf die freie Säure.	27
Tabelle 3-3.	Verwendete Matrices zur Bestimmung des Grundrauschens, ermittelte Kenngrößen zur Berechnung sowie resultierende Werte der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD bzw. LOQ) für die Indikatoren. cps: <i>counts per second</i> , Maß für die Signalstärke (Höhe).....	33
Tabelle 3-4.	Indikatorkonzentrationen in den Kalibrierlösungen (Std., in Reinstwasser; Konzentration der internen Standards s. Tabelle 3-2); Standard 8 wurde erst ab 27.1.2015 in die Kalibrierreihe aufgenommen. grün: typischerweise in die tägliche Kalibrierung einbezogene Standards; orange: Standards deren Konzentration unterhalb des ermittelten LOQ (Vgl. Tabelle 3-3) lag, die aber trotzdem regelmäßig die Qualitätskriterien erfüllten und in der Kalibrierung berücksichtigt wurden.....	34

Tabelle 3-5.	Soll-Konzentration sowie Mittelwert (MW) und relative Standardabweichung (RSD) der ermittelten Indikatorkonzentrationen in Reinstwasser mit niedriger (niedrig) und höherer Indikatorkonzentration (hoch) zur Beschreibung der <i>intraday</i> und <i>interday precision</i>	36
Tabelle 3-6.	In verschiedenen (Real-) Probenarten ermittelte Matrixeffekte (ME), basierend auf der Signalveränderung (Peakflächenunterschied) im Vergleich zu Reinstwasser.	40
Tabelle 3-7.	Jahresmedian (September 2014 – August 2015) konventioneller Wasserqualitätsparameter und Indikatorkonzentrationen im gemeinsamen Zulauf und dem Ablauf von HM, HMc und HAp. Daneben sind Interquartilsabstände in Klammern und für die Anlagen auch Entfernungen kursiv dargestellt.	50
Tabelle 3-8.	Mittelwert und Standardabweichung der Indikatorkonzentrationen ($\mu\text{g/L}$) in Zulauf (zu) und Ablauf (ab) der Anlagen VA und HA im störungsfreien Betrieb, Beobachtungszeitraum 09.06. – 14.07.2015 (VA) bzw. 23.06. – 28.07.2015 (HA). Einzelwerte siehe Tabelle A-4.	58
Tabelle 4-1.	Ergebnisse der Identifizierung der auf Agar-Medium (R2A, 7g/L ACE) vereinzelter Kolonien sowie in definierten Mischkulturen verwendete Isolate.	68
Tabelle 4-2.	Konfiguration des Säulenversuches mit dem jeweils zum Zeitpunkt t verbleibenden Anteil der initialen Konzentration (c_t/c_0) von Acesulfam-K (ACE-K) und der ermittelten Umsatzrate (nach Formel 4-1, Kapitel 4.1.2).	76
Tabelle 4-3.	Aufbereitete Analysenergebnisse bzgl. Acesulfam-K (ACE-K) und Amidosulfonsäure (SA) in definierten Mischkulturen (1 g/L ACE-K) inkl. der Inkubationszeit t , dem ermittelten Aufkonzentrierungsfaktor a , dem nach der Inkubationszeit entfernten Anteil von ACE, der gebildeten Menge SA sowie der Ausbeute von SA nach der Inkubation, bezogen auf die bei vollständigem Umsatz von ACE maximal mögliche Konzentration von SA (Formel 4-3, Kapitel 4.1.3). ...	79

Anhang

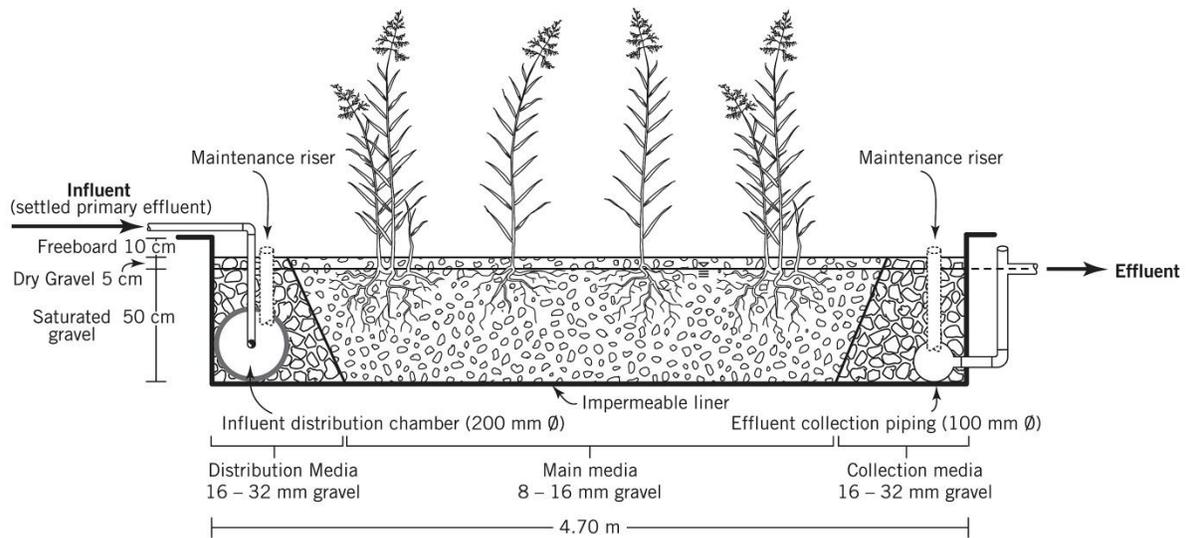


Abbildung A-1. Schematische Darstellung der Anlage H50p nach Nivala *et al.* (2013a).

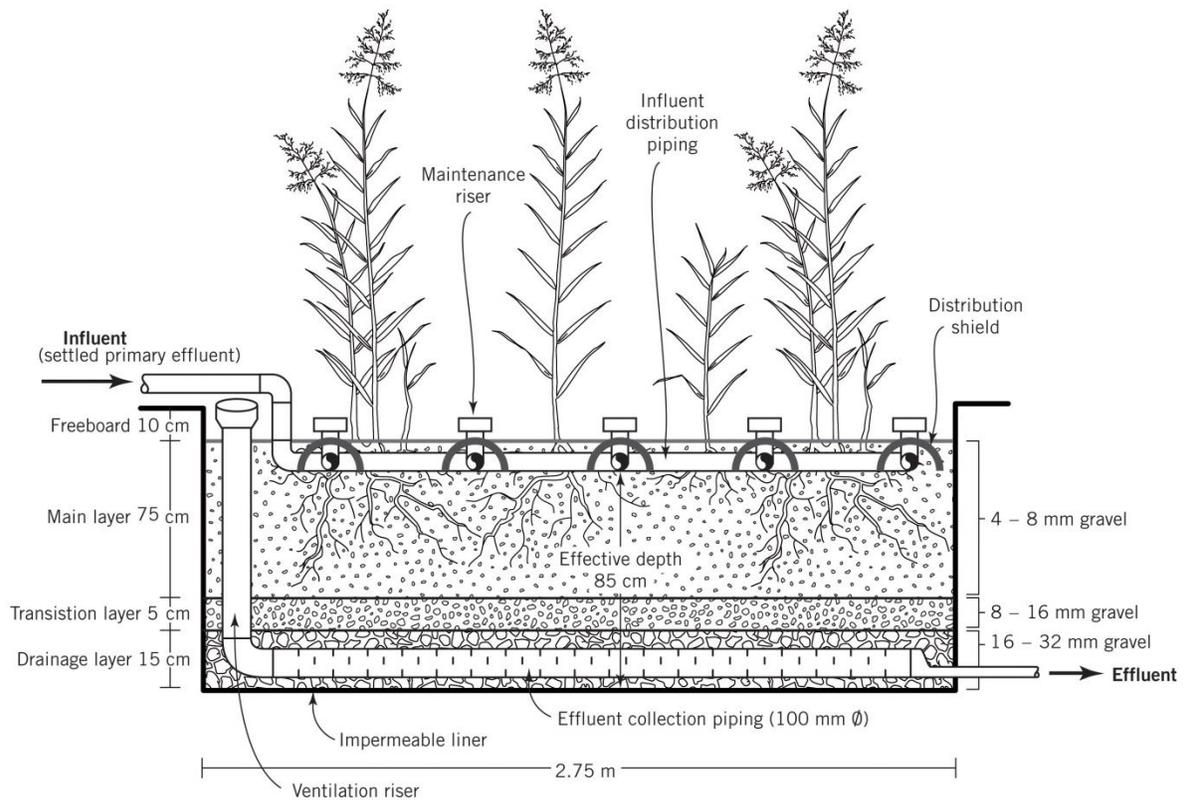


Abbildung A-2. Schematische Darstellung der Anlage VGp nach Nivala *et al.* (2013a).

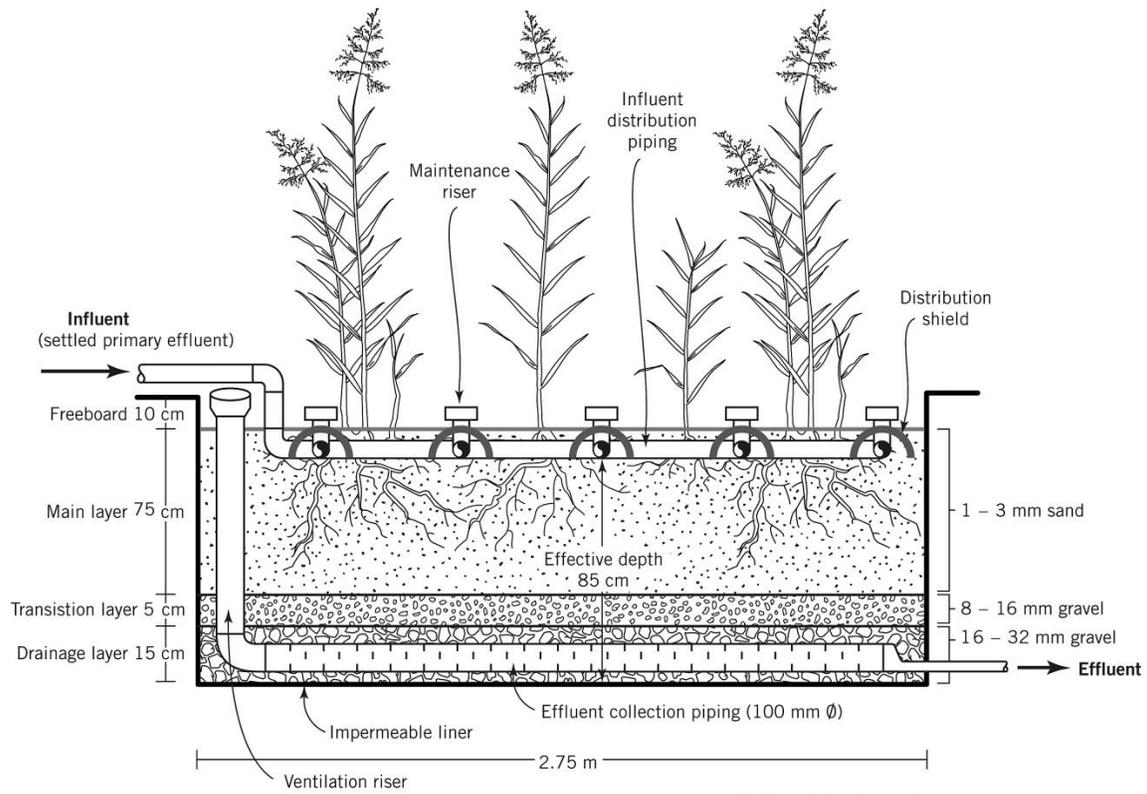


Abbildung A-3. Schematische Darstellung des Sandfilters der zweistufigen Anlage VGp + VSp nach Nivala *et al.* (2013a).

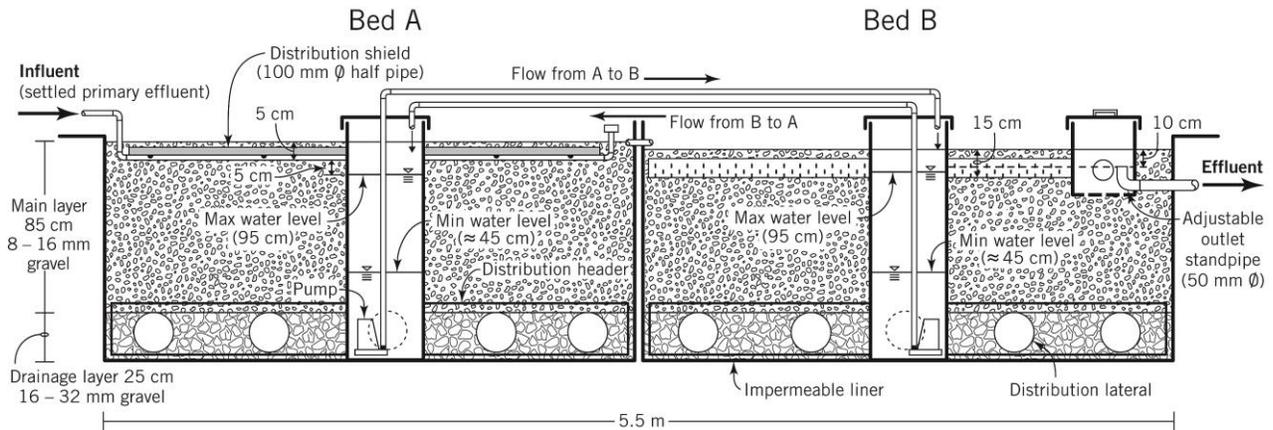


Abbildung A-4. Schematische Darstellung der Anlage R nach Nivala *et al.* (2013a).

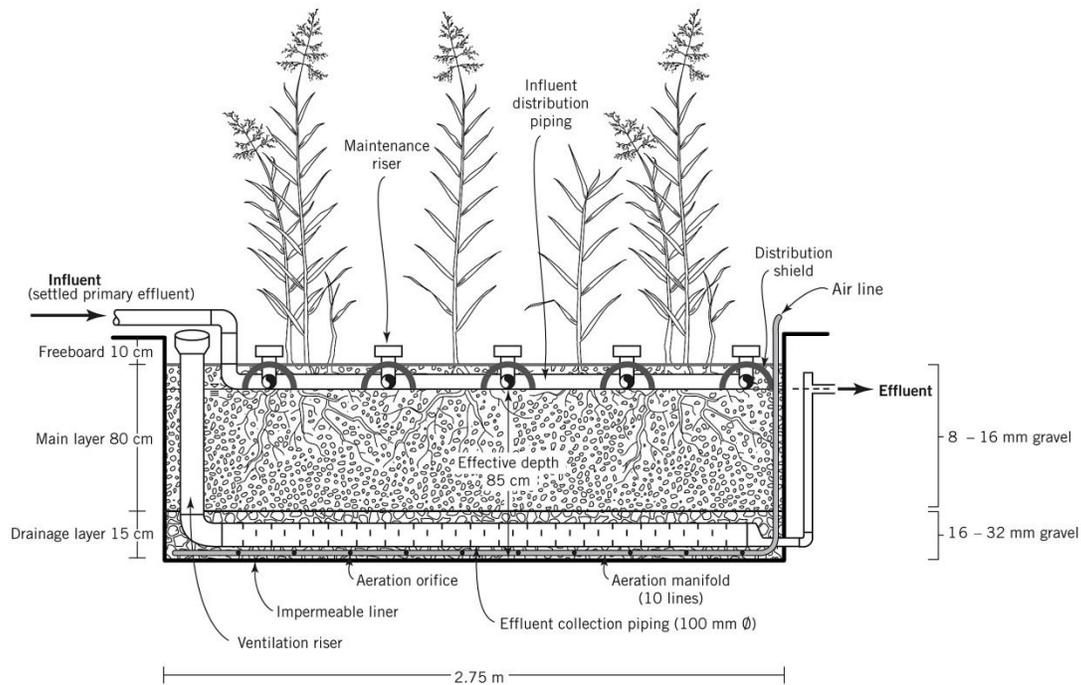


Abbildung A-5. Schematische Darstellung der Anlage VAp nach Nivala *et al.* (2013a). Die Anlage VA weist dieselbe Bauweise, allerdings ohne die Bepflanzung, auf.

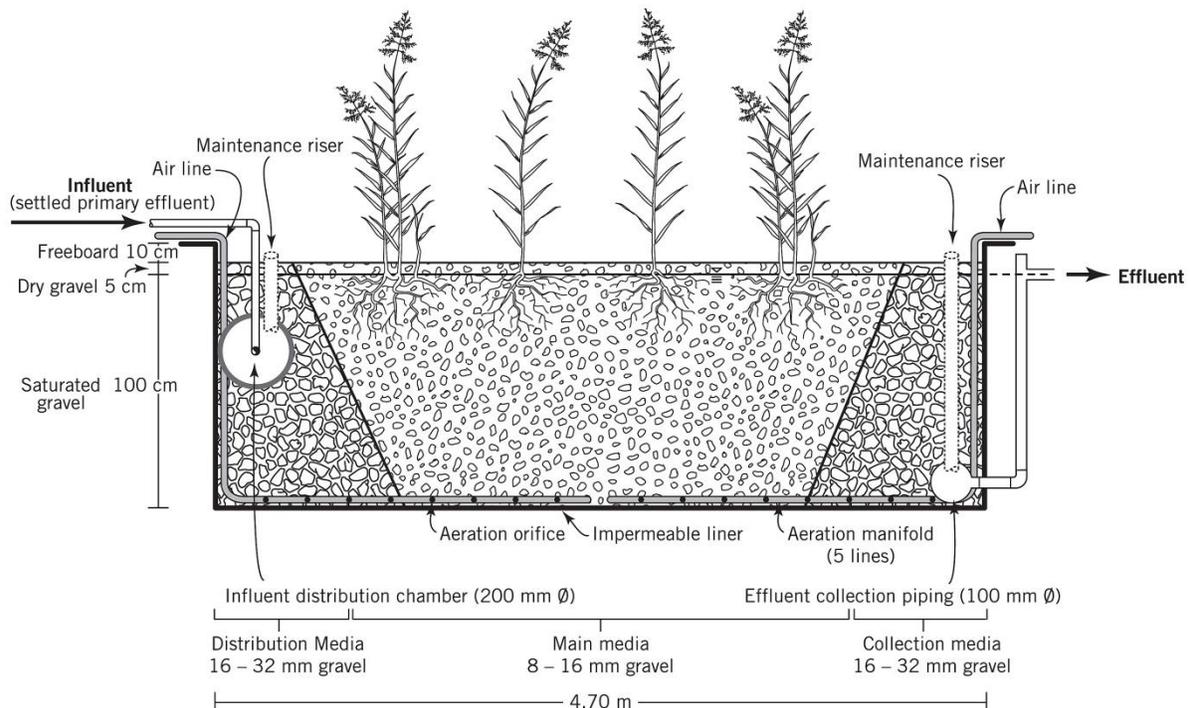
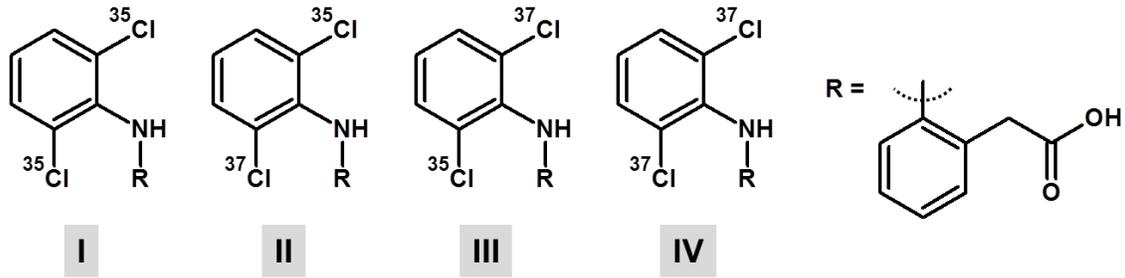


Abbildung A-6. Schematische Darstellung der Anlage HAp nach Nivala *et al.* (2013a). Die Anlagen HM und HMc weisen dieselbe Bauweise, allerdings mit einzeln ansteuerbaren Belüftungsleistungen auf. Das Design der Anlage HA entspricht dem von HAp, HA ist jedoch nicht bepflanzt.



$$p_{Cl-35} = 0,7577$$

$$p_{Cl-37} = 0,2423$$

$$P_I = (p_{Cl-35})^2 = 0,5741$$

$$P_{II} = P_{III} = p_{Cl-35} \cdot p_{Cl-37} = 0,1836$$

$$P_{IV} = (p_{Cl-37})^2 = 0,0587$$

Abbildung A-7. Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens (P) der Chlor-Isotopologe I – IV von Diclofenac (DCL) bzw. von vierfach deuteriertem DCL (DCL-d₄) unter Verwendung der relativen Häufigkeit (p) der Isotope ^{35}Cl bzw. ^{37}Cl . Formel adaptiert nach Rehm & Letzel (2016), Werte für p entnommen aus Holleman & Wiberg (2007).

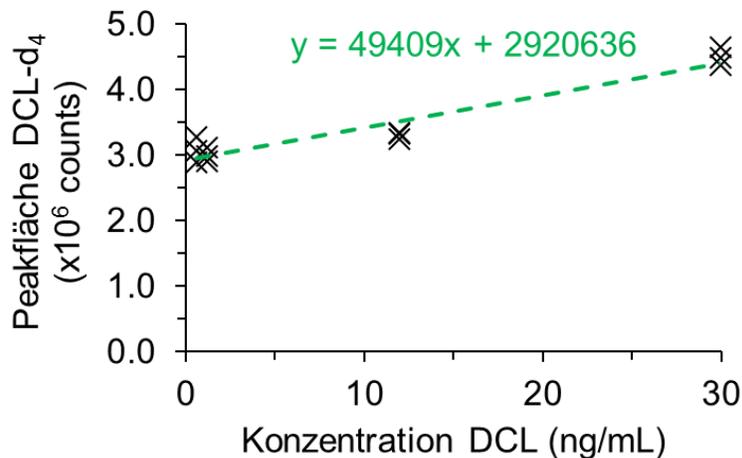


Abbildung A-8. Abhängigkeit der Peakfläche des DCL-d₄-Quantifizierübergangs von der DCL-Konzentration (Reinstwasser). Ausgleichsgerade ermittelt auf Basis von vier Messpunkten (Kalibrierstandards) zu je drei Bestimmungen.

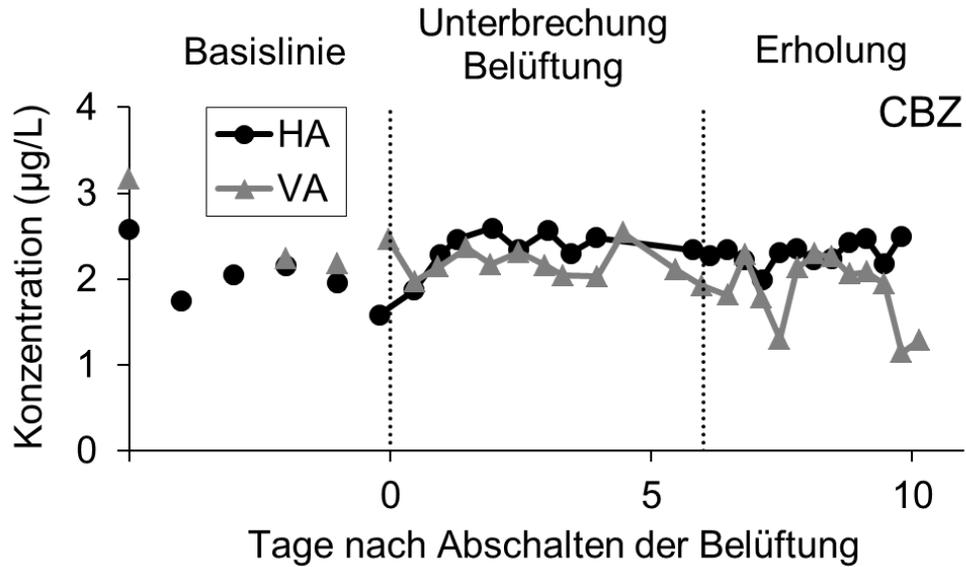


Abbildung A-9. Konzentrationen von Carbamazepin (CBZ) im Ablauf der Systeme HA und VA vor (Basislinie, bis Tag 0) und nach Abschalten der Belüftung (Tag 0 bis 6) sowie nach Wiedereinschalten der Belüftung (Erholung, ab Tag 6). Datenpunkte im Intervall „Basislinie“ wurden jeweils 35 Tage vor Abschalten der Belüftung bis zum Abschalten wöchentlich ermittelt; sie entsprechen damit nicht der Skalierung der Punkte ab dem Abschalten der Belüftung (Tag 0).

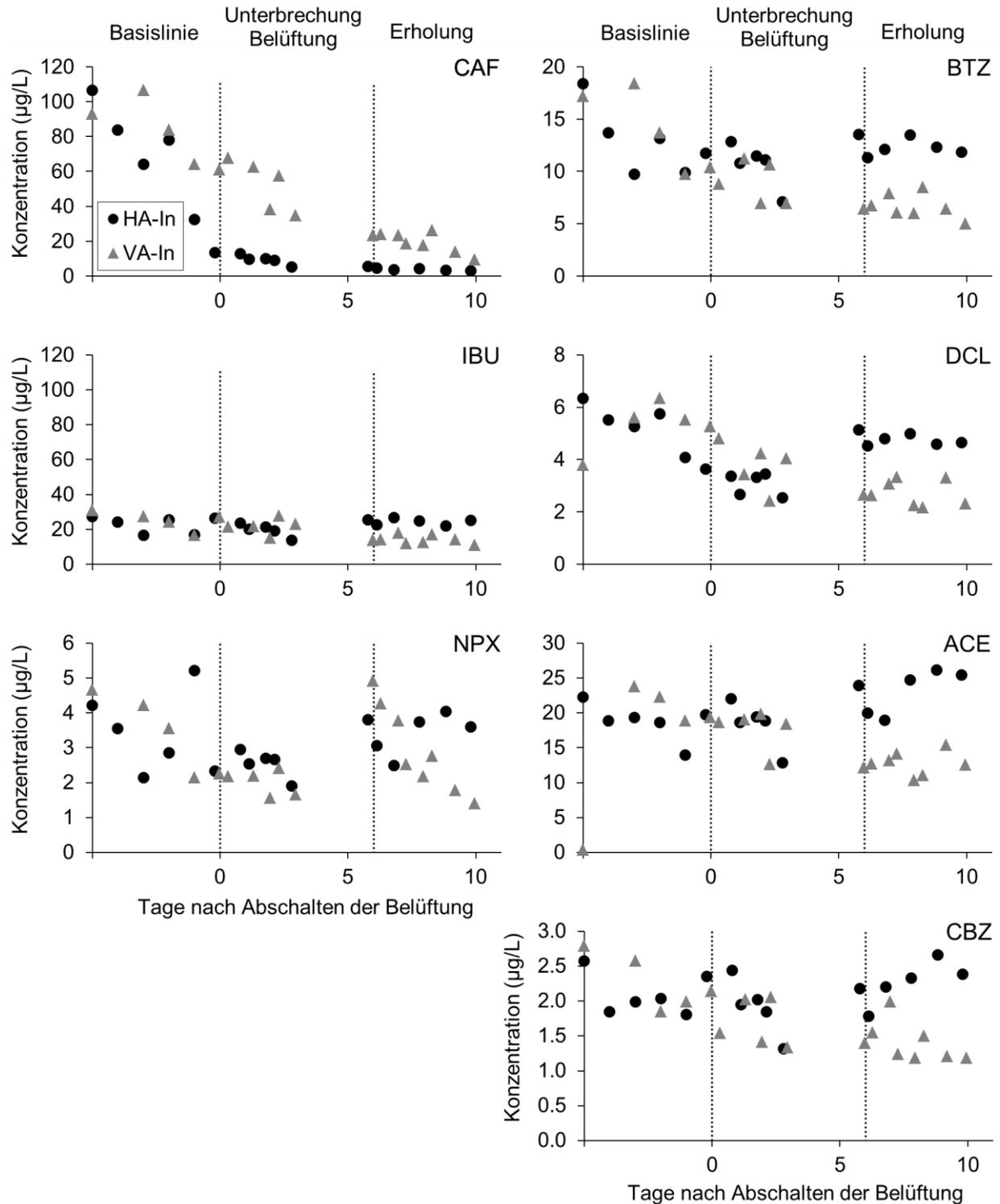


Abbildung A-10. Konzentrationen der Indikatoren im Zulauf zu den Pflanzenkläranlagen HA und VA. Die Reihe „HA-In“ beschreibt die Zulaufgehalte zu den Zeitpunkten, in denen Zulauf und Ablauf des Systems HA beprobt wurden. Entsprechend kennzeichnen Punkte „VA-In“ die Zulaufgehalte im Zeitraum der Beprobung von VA. Punkte im Intervall „Basislinie“ wurden jeweils 35 Tage vor Abschalten der Belüftung bis zum Abschalten wöchentlich ermittelt und entsprechen somit nicht der Skalierung der Punkte ab dem Abschalten der Belüftung (Tag 0).

Tabelle A-1. Zum Ablauf der Pflanzenkläranlage R zugesetzte Konzentrationen (c) der internen Standards (IS) und ermittelte Peakhöhen (H) in den Proben a bis k sowie Anstieg (m) der linearen Ausgleichsfunktion durch die inkludierten Punkte (grün hinterlegt). Die Ausgleichsgeraden wurden durch den Koordinatenursprung gezwungen, da die in ungespikter Probe ermittelten Peakhöhen der IS vernachlässigbar waren; einzig bei DCL-d₄ wurde die Gerade nicht durch den Ursprung gelegt und es musste die Peakhöhe in ungespikter Probe (3,04E+04 cps) einbezogen werden.

IS	Probe										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
ACE-d4 ^a	c (ng/mL)	0,00263	0,00875	0,0175	0,035	0,105	0,14	0,175	0,35	0,438	0,525
	H (cps)	3,52E+02	9,07E+02	1,39E+03	3,41E+03	5,14E+03	7,85E+03	1,01E+04	1,20E+04	3,10E+04	3,43E+04
BTZ-d4	m (mL/ng)	<u>76353</u>									
	c (ng/mL)	0,00112	0,00375	0,0075	0,015	0,03	0,045	0,06	0,075	0,15	0,188
	H (cps)	-	6,35E+02	1,09E+03	2,45E+03	3,95E+03	6,00E+03	8,04E+03	1,11E+04	2,66E+04	3,19E+04
CAF-d9	m (mL/ng)	<u>141216</u>									
	c (ng/mL)	0,00112	0,00375	0,0075	0,015	0,03	0,045	0,06	0,075	0,15	0,188
	H (cps)	-	1,53E+03	2,84E+03	6,04E+03	8,15E+03	1,01E+04	1,39E+04	3,13E+04	3,84E+04	4,28E+04
CBZ-d10	m (mL/ng)	<u>196916</u>									
	c (ng/mL)	0,00075	0,0025	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,125
	H (cps)	5,63E+02	8,23E+02	2,00E+03	4,89E+03	8,17E+03	1,26E+04	1,40E+04	1,69E+04	4,39E+04	5,28E+04
DCL-d4	m (mL/ng)	<u>402130</u>									
	c (ng/mL)	0,00075	0,0025	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,125
	H (cps)	3,40E+04	3,21E+04	3,47E+04	3,57E+04	3,62E+04	3,73E+04	3,56E+04	3,88E+04	4,73E+04	4,86E+04
IBU-d3	m (mL/ng)	<u>105623</u>									
	c (ng/mL)	0,006	0,02	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,8	1,2
	H (cps)	-	-	-	-	-	-	-	1,67E+03	4,40E+03	4,69E+03
NPX-d3	m (mL/ng)	<u>5139</u>									
	c (ng/mL)	0,00112	0,00375	0,0075	0,015	0,03	0,045	0,06	0,075	0,15	0,188
	H (cps)	-	2,47E+03	4,16E+03	7,24E+03	8,98E+03	1,14E+04	1,35E+04	3,58E+04	3,95E+04	5,02E+04
	m (mL/ng)	<u>219085</u>									

^a Konzentration der freien Säure

Tabelle A-2. Konzentrationen (c) der Indikatoren (Ind) und internen Standards (IS) in den Testlösungen zur Bestimmung des Filtrationsverlusts sowie relative Abweichung (%) der Peakfläche (A) der Quantifizier-Übergänge von Indikatoren und IS zwischen filtrierten und unfiltrierten Proben (bezogen auf die unfiltrierten Proben).

Die relative Abweichung wurde berechnet nach: $\Delta A(\%) = \frac{A_{unfiltriert} - A_{filtriert}}{A_{unfiltriert}} \times 100$

Analyt	C _{IS} (µg/L)	Niedrige Indikatorkonzentration			Hohe Indikatorkonzentration		
		C _{Ind} (µg/L)	ΔA _{Ind} (%)	ΔA _{IS} (%)	C _{Ind} (µg/L)	ΔA _{Ind} (%)	ΔA _{IS} (%)
Acesulfam	17,5 ^a	2,25 ^a	1,3	4,7	11,25 ^a	-0,35	-0,97
Benzotriazol	7,5	1,2	11	7,8	6	1,9	2,3
Coffein	7,5	0,75	17	11	3,75	6,4	4,5
Carbamazepin	5	0,5	9,1	14	2,5	2,1	0,67
Diclofenac	5	6 ^a	10	9,1	30 ^a	-1,6	-0,64
Ibuprofen	40	10	2,0	8,3	50	-1,0	-1,8
Naproxen	7,5	2	12	12	10	-5,3	1,2

^a Konzentration der freien Säure

Tabelle A-3. Monatsmediane der Entfernung der Indikatoren (n = 1 – 5) und klassischen Schmutzstoffe (n = 2 – 5) in HM, HMc und HAp sowie Monatsmediane üblicher Abwasserparameter im gemeinsamen Zulauf (SEP) und dem Ablauf von HM, HMc und HAp (n = 2 – 5) von September 2014 bis August 2015. - : keine Daten.

	Sep. 14	Okt. 14	Nov. 14	Dez. 14	Jan. 15	Feb. 15	Mrz. 15	Apr. 15	Mai. 15	Jun. 15	Jul. 15	Aug. 15
<i>Coffein, Entfernung (%)</i>												
HM	100	98	95	99	99	100	100	100	100	100	100	95
HMc	100	98	97	99	100	100	100	100	100	100	99	95
HAp	100	98	98	99	100	100	100	100	100	100	-	95
<i>Ibuprofen, Entfernung (%)</i>												
HM	98	98	99	99	98	100	97	99	98	99	98	98
HMc	98	98	99	99	98	100	98	98	98	98	98	98
HAp	98	99	99	99	97	100	99	99	98	99	-	98
<i>Naproxen, Entfernung (%)</i>												
HM	97	97	95	93	96	95	97	97	99	100	99	99
HMc	99	97	95	97	98	98	98	98	99	99	99	100
HAp	100	98	99	98	98	96	97	98	99	99	-	99
<i>Benzotriazol, Entfernung (%)</i>												
HM	57	67	53	60	52	49	49	48	43	59	61	71
HMc	54	53	51	64	57	45	46	49	39	56	63	63
HAp	92	90	90	85	71	74	74	82	90	95	-	87
<i>Diclofenac, Entfernung (%)</i>												
HM	28	36	24	28	22	14	24	34	54	59	72	70
HMc	25	37	32	32	30	13	26	31	59	55	61	60
HAp	83	82	78	76	54	38	57	50	81	81	-	73
<i>Acesulfam, Entfernung (%)</i>												
HM	10	6	-14	8	-12	-1	-1	7	13	18	32	95
HMc	9	9	-1	8	-3	-3	-8	11	17	11	54	98
HAp	100	97	96	78	13	-3	-9	-5	28	97	-	97
<i>Carbamazepin, Entfernung (%)</i>												
HM	0	-22	-44	4	-11	0	4	-2	5	4	10	15
HMc	1	-9	-20	7	4	-3	8	2	2	1	1	6
HAp	-3	-15	-23	-1	-13	-10	2	-20	-1	0	-	-24
<i>Biologischer Sauerstoffbedarf (CBOD₅), Entfernung (%)</i>												
HM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99
HMc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99
HAp	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	98
<i>Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs (TOC), Entfernung (%)</i>												
HM	91	93	94	94	94	94	93	93	93	94	95	94
HMc	93	94	94	94	94	93	93	93	93	92	95	94
HAp	93	91	88	92	91	91	90	88	88	87	94	93

Tabelle A-3. (Fortsetzung)

	Sep. 14	Okt. 14	Nov. 14	Dez. 14	Jan. 15	Feb. 15	Mrz. 15	Apr. 15	Mai. 15	Jun. 15	Jul. 15	Aug. 15
<i>Gesamtstickstoffgehalt (TN), Entfernung (%)</i>												
HM	43	53	67	67	61	61	57	54	58	57	58	58
HMc	64	74	69	63	57	54	50	50	46	52	54	51
HAp	60	51	39	37	40	39	32	39	47	51	62	56
<i>Ammoniumstickstoff (NH₄-N), Entfernung (%)</i>												
HM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HMc	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HAp	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100
<i>Nitrat- und Nitritstickstoffgehalt (NO_x-N; mg/L)</i>												
SEP	< LOQ ^a											
HM	46	35	29	30	34	31	32	41	38	39	35	40
HMc	35	23	29	36	38	39	40	45	48	40	38	46
HAp	38	42	54	59	52	50	52	54	51	45	39	41
<i>gelöster Sauerstoff (DO; mg/L)</i>												
SEP	1,0	0,9	1,1	0,8	1,0	2,0	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7
HM	7,5	9,5	11,3	11,5	12,0	11,9	11,6	10,8	10,4	9,6	8,9	8,4
HMc	7,3	9,4	11,2	11,6	12,0	12,1	11,9	10,8	10,3	9,6	9,0	8,5
HAp	7,0	9,3	10,7	10,7	11,5	11,7	11,5	10,5	9,9	9,2	8,8	8,1
<i>Redoxpotential (E_H; mV)</i>												
SEP	-277	-297	-284	-279	-273	-254	-254	-242	-219	-249	-241	-257
HM	125	182	167	166	197	157	196	169	141	185	179	166
HMc	152	157	109	195	160	202	184	166	170	182	202	200
HAp	192	168	153	163	252	236	229	230	197	156	191	177
<i>Temperatur (T; °C)</i>												
SEP	17,8	15,9	12,6	11,5	9,4	8,5	9,1	11,1	14,8	16,0	19,4	21,6
HM	16,6	14,7	10,7	7,3	6,2	5,4	7,5	10,4	14,8	16,0	19,7	21,6
HMc	16,4	14,6	10,4	7,0	6,0	5,2	7,3	10,4	14,8	16,1	19,6	21,6
HAp	17,2	15,4	11,6	8,2	7,3	6,2	7,7	10,8	14,8	16,2	19,7	21,8
<i>pH-Wert</i>												
SEP	7,0	7,1	7,2	7,2	7,1	7,1	7,1	7,2	7,6	7,1	6,8	7,1
HM	7,3	7,3	8,1	8,0	7,9	7,9	7,8	7,7	7,5	7,7	7,9	7,8
HMc	7,8	8,1	8,1	7,9	7,8	7,7	7,5	7,5	6,8	7,5	7,6	7,7
HAp	7,6	7,5	7,3	6,3	5,8	6,6	5,9	6,5	6,6	7,2	7,4	7,6
<i>Elektrische Leitfähigkeit (EC; µS/cm)</i>												
SEP	1758	1921	1951	2000	1871	1901	1897	1693	1747	1820	1477	1867
HM	1343	1377	1427	1498	1280	1352	1385	1366	1339	1273	1257	1350
HMc	1349	1348	1449	1528	1294	1357	1416	1381	1383	1343	1373	1353
HAp	1392	1379	1444	1508	1207	1288	1362	1328	1377	1442	1431	1340

^a gilt für alle Monate; LOQ für Nitrat bzw. Nitrit: 0,3 mg/L bzw. 0,02 mg/L

Tabelle A-4. Konzentrationen ($\mu\text{g/L}$) der Indikatoren im gemeinsamen Zulauf (SEP) sowie im Ablauf der Systeme HAp, HA und VA in Proben entnommen im Juni und Juli 2015 sowie mittleres Volumen des Zu- und Abflusses (L/d) von HA und VA während dieser Monate.

- : keine Probe; LOQ: Nachweisgrenze (*engl. limit of quantification*).

	9.6.2015	23.6.2015	30.6.2015	7.7.2015	14.7.2015	21.7.2015	28.7.2015
<i>Coffein</i>							
SEP	92	106	83	63	77	32	19
HAp	0,25	0,45	0,22	-	-	-	-
HA	-	0,35	0,19	0,31	0,22	0,18	0,12
VA	0,93	-	1,8	1,1	0,80	-	-
<i>Ibuprofen</i>							
SEP	30	27	24	16	25	17	24
HAp	0,08	< LOQ	< LOQ	-	-	-	-
HA	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
VA	1,8	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-	-
<i>Naproxen</i>							
SEP	4,6	4,2	3,5	2,1	2,8	5,2	2,9
HAp	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-	-	-	-
HA	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
VA	0,40	-	0,48	0,27	0,22	-	-
<i>Benzotriazol</i>							
SEP	17	18	14	10	13	10	14
HAp	0,92	0,76	0,56	-	-	-	-
HA	-	11	8,5	8,9	8,1	6,7	4,3
VA	4,9	-	4,7	4,4	3,6	-	-
<i>Diclofenac^a</i>							
SEP	5,6	6,3	5,5	5,2	5,7	4,1	4,4
HAp	1,4	1,4	1,0	-	-	-	-
HA	-	4,5	3,7	5,0	4,2	3,6	2,3
VA	3,1	-	2,3	3,3	3,2	-	-
<i>Acesulfam^a</i>							
SEP	24	22	19	19	18	14	19
HAp	0,68	0,56	0,23	-	-	-	-
HA	-	19	15	18	8,0	0,31	0,27
VA	21	-	10	6,6	2,4	-	-
<i>Carbamazepin</i>							
SEP	2,8	2,6	1,8	2,0	2,0	1,8	2,1
HAp	3,7	3,0	2,1	-	-	-	-
HA	-	2,6	1,7	2,0	2,1	1,9	1,5
VA	3,1	-	2,2	2,2	2,3	-	-
		06/2015	07/2015				
<i>Abwasservolumen</i>							
HA, Zulauf		578	578				
HA, Ablauf		561	563				
VA, Zulauf		578	578				
VA, Ablauf		565	569				

^a Konzentration der freien Säure

LOQ für Ibuprofen: 1,28 $\mu\text{g/L}$

LOQ für Naproxen: 0,09 $\mu\text{g/L}$

Tabelle A-5. Literatur zum Abbau von Acesulfam (ACE) in Laborstudien, sortiert nach Jahr der Veröffentlichung. In Publikation 2 inkludierte Literaturstellen sind fett, nicht explizit angegebene und daher vermutete Bedingungen sind kursiv gekennzeichnet. RT: Raumtemperatur; HRT: hydraulische Verweilzeit (*engl. hydraulic residence time*); nitratred.: nitratreduzierende Bedingungen; manganred.: manganreduzierende Bedingungen; TOC: gesamter organischer Kohlenstoff; DT₅₀: Halbwertszeit.

Referenz	System	Matrix	Konzentration ACE	Temperatur (°C)	Redoxmilieu	Startgehalt organischer Kohlenstoff	Laufzeit	Entfernung ACE
Buerge et al. (2009)	Batch	Rücklaufschlamm, Rohabwasser (1:1)	abwasserbürtig	15	aerob	hoch	7 h	-
Buerge et al. (2011)	Batch	Böden	1 µg/g	20	aerob	gering	63 – 107 d	≥ 60%
	Säule	Boden, Rohabwasser	abwasserbürtig	20	nur anfänglich aerob	hoch	57 d	-
Burke et al. (2014)	Säule	Sedimentkern und Oberflächenwasser von Uferfiltrationsgebiet	0,72 µg/L 0,44 µg/L	6,5 19,7	aerob aerobe Zone nitratred. + manganred. Zonen	gering gering gering	HRT: 21 h	- DT ₅₀ = 5 h -
Tran et al. (2014)	Batch	angereicherter (nitifizierender) Belebtschlamm, Mineralmedium, 100 mg/L Acetat, 50 – 200 mg/L NH ₄ -N + 20 mg/L Allylthiohamstoff	100 µg/L	RT	aerob	75 mg/L TOC	7 d	≤ 25%
Tran et al. (2015)	Batch	Rücklaufschlamm, Mineralmedium	70 µg/L	RT	aerob	gering	7 d	60%
		angereicherter (nitifizierender) Belebtschlamm, Mineralmedium, 100 mg/L Acetat, 50 mg/L NH ₄ -N	100 µg/L				7 d	10%
Regnery et al. (2015)	Säule	Natürliches alluviales Material (NAM), 30:70 sekundär behandeltes Abwasser: Nanofiltrationspermeat (aus Leitungswasser)	ng/L-Bereich	20	aerob	gering	HRT: 7 d	DT ₅₀ = 4,2 d
		NAM, Leitungswasser (N ₂ durchspült)			suboxisch	gering	HRT: 9 d	-
		NAM, sekundär behandeltes Abwasser (N ₂ durchspült)			anoxisch	hoch	HRT: 14 d	-
Storck et al. (2016)	Festbettreaktor	Leitungswasser (LW) + Bodenextrakt (1/20) LW + Kompostextrakt (1/20) LW + WWTP Ablauf (1/24)	9 µg/L	20	aerob	> 5 mg/L	56 d	-
						20 mg/L	56 d	-
						< 1,2 mg/L	28 d	quantitativ

Tabelle A-5. (Fortsetzung)

Referenz	System	Matrix	Konzentration ACE	Temperatur (°C)	Redoxmilieu	Startgehalt organischer Kohlenstoff	Laufzeit	Entfernung ACE
Krah <i>et al.</i> (2016)	Batch	Belebtschlamm, HN-Puffer ^a Belebtschlamm-Lysat (zellfrei), HN-Puffer ^a	16,7 µg/L	30	aerob	gering – mäßig	3 d	quantitativ
Burke <i>et al.</i> (2017)	Säule	Aquifersediment, Oberflächenwasser	1,41 µg/L 0,90 µg/L	6 21	aerob aerob	gering gering	HRT: 44 h	- 80%
		+ Calciumlactat: 0,01 g/L 0,25 g/L 2 g/L	0,55 µg/L 1,33 µg/L 1,05 µg/L	21	nitratred. manganred. sulfidisch	≤ 3 mg/L ≤ 75 mg/L ≤ 600 mg/L		- - -
Castronovo <i>et al.</i> (2017)	Batch	Belebtschlamm aus Nitrifikationsbecken, Klaranlagenablauf	30 µg/L	25 ± 2	aerob anoxisch anaerob	gering – mittel	< 20 h < 25 h 96 h	quantitativ quantitativ -
Men <i>et al.</i> (2017)		Belebtschlamm aus Belüftungsbecken	8 µg/L	RT	aerob	gering – mäßig	10 h	80%
		Belebtschlamm, 20mg/L Allylthioharnstoff						70%
		Belebtschlamm, 4,2 mg/L 1-Oktin						70%
Müller <i>et al.</i> (2017)	Säule	Anthraxit, tertiär behandeltes Abwasser	2,44 µg/L	RT	aerob (bis suboxisch)	7,1 ± 1,0 mg/L DOC	HRT: 90 bzw. 290 min	>90%
Hellauer <i>et al.</i> (2017b)	Säule	Erste von zwei Säulen gefüllt mit Sand (<i>managed aquifer recharge</i> -Standort ^b), Oberflächennwasser + WWTP-Ablauf (3:1)	0,56 µg/L	RT	zu Beginn aerob, am Ende anoxisch	8 mg/L DOC	HRT: 6 d	> 50% (Anm.: LOQ = 0,25 µg/L)

^a 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 50 mM NaCl, Reinstwasser

^b MAR: Grundwasseranreicherung (engl. *managed aquifer recharge*)

Tabelle A-6. Literatur zur Entfernung von Acesulfam (ACE) in deutschen Studien zur Grundwasseranreicherung und Uferfiltration sowie Abwasserreinigung in Pilotanlagen. In Publikation 2 inkludierte Literaturstellen sind fett, nicht explizit angegebene und daher vermutete Bedingungen sind kursiv gekennzeichnet.

MAR: Grundwasseranreicherung (*engl. managed aquifer recharge*); SMART: *sequential managed aquifer recharge technology*; SBR: *engl. sequencing batch reactor*; DOC_{in}: Gehalt gelöster organischer Kohlenstoff im Zulauf zum System, DOC_{out}: Gehalt gelöster organischer Kohlenstoff im Ablauf des Systems; HRT: hydraulische Verweilzeit (*engl. hydraulic residence time*).

Referenz	Beprobung	System	ACE-K in Zulauf (µg/L)	Redoxmilieu	organischer Kohlenstoffgehalt	Entfernung ACE (%)	Aufenthaltszeit
Hellauer <i>et al.</i> (2017a) ^a	04 – 10/2016	MAR (Oberflächenwasser, Infiltrationsbecken)	\bar{x} : 0,3	zunächst aerob, dann schnell suboxisch	4 – 9 mg/L	-	0,49 d
		SMART (Uferfiltrat von Oberflächenwasser, inkl. Belüftung)	\bar{x} : 0,8	nahezu durchgängig aerob	5 mg/L	93	0,17 d
Völker <i>et al.</i> (2017)	06 – 07/2014	SBR, WWTP-Ablauf	\bar{x} : 4,5	2/3 aerob, 1/3 anoxisch	DOC _{in} : 37 mg/L DOC _{out} : 12 mg/L	91	HRT: 12 h
		3 sequentielle SBR (in 2. SBR: Zugabe Acetat), WWTP-Ablauf	\bar{x} : 4,0	<u>1. SBR:</u> 2/3 aerob, 1/3 anoxisch <u>2. SBR:</u> anoxisch, anaerob <u>3. SBR:</u> anaerob	DOC _{in} : 37 mg/L DOC _{out} : 9 mg/L	92	HRT: 12 h + 2 x 2,5 d
		2 sequentielle SBR + nachfolgender Rührreaktor (Zugabe Acetat), WWTP-Ablauf	\bar{x} : 3,1	<u>1. SBR:</u> anaerob <u>2. SBR:</u> aerob/anoxisch <u>Rührreaktor:</u> Anoxisch, anaerob	DOC _{in} : 37 mg/L DOC _{out} : 8 mg/L	94	HRT: 2 x 2,7 d + 2 d
Castronovo <i>et al.</i> (2017)	unbekannt	Langsamsandfilter, Oberflächenwasser (Ruhr)	\bar{x} : 0,37	<i>aerob – suboxisch</i>	<i>gering</i>	70	HRT: 2 – 4 d

^a Entfernung ACE, beschriebenes Redoxmilieu sowie Aufenthaltszeit beziehen sich auf 2 m Infiltrationsstrecke

Tabelle A-7. Literatur zur Entfernung von Acesulfam-K (ACE-K) in Kläranlagen, sortiert nach untersuchter Region (Länderkürzel nach ISO 3166) und Datum der Probenahme. In Publikation 2 inkludierte Literaturstellen sind fett gekennzeichnet. HRT: hydraulische Verweilzeit (*engl. hydraulic residence time*); DOC: gelöster organischer Kohlenstoff.

Region	Referenz	Anzahl Kläranlagen	Beprobung	ACE-K in Zulauf ($\mu\text{g/L}$)	Entfernung ACE (%)
DE, CH	Buerge et al. (2009)	10	- 05 – 09/2008 - 24h Mischproben (HRT-bezogen)	12 – 43 (\bar{x} : 10)	nur in 1/10 Anlagen (60%)
	Scheurer et al. (2009)	2	- 02 – 03/2009 - 24 h Mischproben	34 – 50	Anlage 1: 41 Anlage 2: 27
	Scheurer et al. (2011)	5	- 05 – 07/2010 - 24h Mischproben	8 – 37	nur in 1/5 Anlagen (25%)
	Nödler et al. (2013)	1	- 10/2012 - 24 h Mischproben (HRT-bezogen)	25	40%
	LUBW (2014)	6	- je 12 Messtermine zwischen 06/2012 – 04/2013	0.9 – 60 (\bar{x} : 18; \bar{x} : 21)	\bar{x} : 15 – 57 ^a
	Funke et al. (2015)	12	- 29.10.2013 (4 Anlagen) - 14.2.2014 (1 Anlage) - 14.07.2014 (7 Anlagen) - 24h Mischproben (außer 1 Anlage)	≤ 75 (in 1 Anlage nicht detektiert)	≤ 1 (n=2), 38 (n=1), 69 – 98 (n=8)
	Castronovo et al. (2017)	13	- unklar, wahrscheinlich 2012/13 - eine Anlage: 5/2012 – 6/2014 (n=12)	20 – 80 (\bar{x} : 38)	\bar{x} : 57 – 97 ^b
	Völker et al. (2017)	1	- 06 – 07/2014 - 7d-Mischproben	\bar{x} : 14	71
	Bourgoin et al. (2018)	1	- 09/2014 – 06/2015 - 37 24h Mischproben (HRT-bezogen)	15 – 80	88 – 95 (nur biologische Stufe) ^c
	Hermes et al. (2018)	3	- Zeitraum unklar - je 4 24 h Mischproben	27 – 43	82 – 96
CN	Gan et al. (2013)	2	- 2011 - Stichproben	16 – 17	-
	Yang et al. (2017)	9	- 05 – 10/2015 - 24h Mischproben (HRT-bezogen)	\bar{x} : 9.5	(0 –) 90 (\bar{x} : 85)
IN	Subedi et al. (2015)	5	- 07 – 08/2012 - Stichproben	0.06 – 0.09	- ^d
	Anumol et al. (2016)	3	- Spätsommer + Winter 2013, Frühsommer 2014 - Stichproben	0.56 – 0.86	nur in 1/3 Anlagen (30%) ^e
US	Subedi & Kannan (2014)	2	- 07/2013 - 24h Mischproben	\bar{x} : 1,08	-
	Jones et al. (2017)	3	- 08 – 09/2014 - Stichproben von Primär- und Sekundärablauf	\bar{x} : 20	\bar{x} : 88

Tabelle A-7. (Fortsetzung)

Region	Referenz	Anzahl Klär-anlagen	Beprobung	ACE-K in Zulauf ($\mu\text{g/L}$)	Entfernung ACE (%)
AU	Cardenas et al. (2016)	1	- 09/2012 - Stichproben (n=2)	43	92
ES	Ordóñez et al. (2012)	1	- 09/2011 - Stichproben (3 d)	25 – 27	-
KR	Ryu et al. (2014)	1	- 05/2013, - Stichproben	4	-
SG	Tran et al. (2015)	1	- 02 – 07/2013 - Stichproben	6.3 – 10.5 (\bar{x} : 8)	-

^a Kein Zusammenhang von Temperatur und ACE-Entfernung zu erkennen.

^b In einer Anlage deutete sich Saisonalität an, also scheinbar Zeitraum beprobt, in dem ACE-Abbaupotential sich dort in Entwicklung befand.

^c DOC nach konventioneller Behandlung: 3,5 – 6 mg/L

^d In einer Anlage 389 ng/L ACE in Ablauf, bei 73 ng/L in Zulauf, Ursache aber nicht diskutiert.

^e Anlage, in der ACE teils entfernt hatte deutlich höhere HRT (3 d vs. 6 h).

Tabelle A-8. Befunde von Acesulfam-K (ACE-K) in verschiedenen wässrigen Umweltproben, sortiert nach untersuchter Region (Länderkürzel nach ISO 3166) und Erscheinungsjahr der Publikation.

Region	Studie	Jahr (Beprobung)	Probenmatrix	Konzentration ACE-K ($\mu\text{g/L}$)
DE	Scheurer <i>et al.</i> (2009)	06 + 12/2008, 02/2009	<i>Soil aquifer treatment</i>	bis 53
		vermutlich 2008/2009	Oberflächenwasser	0,27 – 2,7
	Scheurer <i>et al.</i> (2011)	01 – 07/2010	Oberflächenwasser	0,61 – 3,2
			Uferfiltrat	0,25 – 2,5
	Li <i>et al.</i> (2016)	06/2014	Oberflächenwasser	4,8 – 6,4
Hermes <i>et al.</i> (2018)	unklar	Oberflächenwasser	0,33 – 0,42	
		Uferfiltrat	0,5 – 2,35	
CA	Van Stempvoort <i>et al.</i> (2011)	2009/2010	Grundwasser (Brunnen)	bis 10
	Spoelstra <i>et al.</i> (2017)	09/2010, 05/2011	Grundwasser (Sickerquelle)	bis 1
		06 – 07/2011	Grundwasser (Brunnen)	bis 12
	06/2013	Grundwasser (Sickerquelle)	bis 1,7	
CN, HK	Gan <i>et al.</i> (2013)	2011	Oberflächenwasser	1,6 – 17
			Meerwasser	0,57 – 9,9
			Grundwasser	0,012 – 0,022
			Leitungswasser	0,59 – 0,68
	Sang <i>et al.</i> (2014)	07/2011, 01/2012	Meerwasser	0,03 – 0,375
Yang <i>et al.</i> (2017)	12/2015, 04/2016	Oberflächenwasser	0,12 – 10 (\bar{x} : 1,4)	
ES	Ordonez <i>et al.</i> (2012)	09/2011	Oberflächenwasser	0,4 – 54
			Abwasser	25 – 27
	Salas <i>et al.</i> (2015)	unklar	Abwasser	24 – 39
			Oberflächenwasser	bis 0,03
	Arbeláez <i>et al.</i> (2015)	unklar	Abwasser	49 – 149
		Oberflächenwasser	0,12 – 1,62	
US	Schaider <i>et al.</i> (2016)	02/2011	Trinkwasser (Brunnen)	bis 5,3
	Roehrdanz <i>et al.</i> (2017)	09 – 10/2014	Grundwasser (Brunnen)	0,02 – 0,31
			Trinkwasser	0,03
			Abwasser	28 – 31
Barbados	Edwards <i>et al.</i> (2017)	06/2013	Oberflächenwasser	bis 0,57
CH	Buerge <i>et al.</i> (2009)	02 – 10/2008	Oberflächenwasser	bis 6,9
		08 – 11/2008	Grundwasser	bis 4,7
		vermutlich 2008	Leitungswasser	bis 2,6
FI	Perkola & Sainio (2014)	06/2011 – 06/2012	Oberflächenwasser	0,028 – 9,6
IL	Scheurer <i>et al.</i> (2011)	2009, 2010	<i>Soil aquifer treatment</i>	10 ¹
			WWTP-Ablauf	55
JO	Riemenschneider <i>et al.</i> (2016)	10/2014 – 05/2015	Oberflächenwasser	0,7 – 13,9
MM	Watanabe <i>et al.</i> (2016)	12/2014	Oberflächenwasser	0,0007 – 0,024
PH	Watanabe <i>et al.</i> (2016)	06/2014	Oberflächenwasser	0,22 – 7,8
SE	Li <i>et al.</i> (2016)	06 – 08/2014	Oberflächenwasser	0,17 – 0,9
SG	Tran <i>et al.</i> (2013)	unbekannt	Grundwasser	bis 0,1
			Oberflächenwasser	0,005 – 0,35
			Abwasser	0,19 – 75
VN	Watanabe <i>et al.</i> (2016)	10 – 12/2013	Abwasser	0,055 – 0,58
			Oberflächenwasser	0,001 – 1,1
			Grundwasser	bis 0,13

Wissenschaftlicher Werdegang

Name Stefanie Kahl
Geburtsdatum und –ort 04.08.1988, Dresden

Promotion

seit 07/2013 Promotion, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, Leipzig, Department Analytik

Thema der Dissertation: Beurteilung der Spurenstoffelimination in Pflanzenkläranlagen mittels Indikatorsubstanzen und Neubewertung der Bioabbaubarkeit von Acesulfam

Studium

10/2010 – 10/2012 Master of Science (Chemie), Technische Universität Dresden

Thema der Abschlussarbeit: Entwicklung einer GC-C-IRMS-Methode zur Bestimmung von γ -Hydroxybuttersäure in biologischen Matrices
(Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden, Kreischa)

10/2007 – 09/2010 Bachelor of Science (Chemie), Technische Universität Dresden

Thema der Abschlussarbeit: Festkörper-MAS-NMR-Untersuchungen am Metal Organic Framework UMCM-1

Praktische Erfahrungen

seit 07/2018 Referentin beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Braunschweig, Abteilung Pflanzenschutzmittel, Referat Produktchemie und Analytik

08/2017 – 04/2018 Wissenschaftliche Hilfskraft am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, Leipzig, Department Umweltmikrobiologie

11/2016 – 07/2017 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ, Leipzig, Departments Analytik sowie Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum

09/2012 – 03/2013 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden, Kreischa

07/2011 – 01/2012 Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik, Dresden

Schulische Ausbildung

1999 – 2007 Abitur, Julius-Ambrosius-Hülße-Gymnasium, Dresden

Kurzfassung der wissenschaftlichen Ergebnisse
zur Dissertation

Beurteilung der Spurenstoffelimination in Pflanzenkläranlagen mittels Indikatorsubstanzen und Neubewertung der Bioabbaubarkeit von Acesulfam

Der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig
vorgelegt von

Stefanie Kahl, M. Sc.

im September 2018

Angefertigt am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ,
Department Analytik

1. Einleitung, Motivation und Zielsetzung

Die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (Richtlinie 2000/60/EG) sieht eine Reduzierung der Umweltbelastung mit risikobehafteten Stoffen vor. Hierzu zählen unter anderem anthropogene Substanzen wie Dioxine oder Chlorbenzole. Doch auch bisher nicht berücksichtigte anthropogene Spurenstoffe, z. B. Pharmaka, können bereits in geringer Konzentration (ng/L – µg/L) ein Risiko darstellen. Der kontinuierliche Eintrag in die Umwelt kann zur Akkumulation und dem Erreichen toxikologisch relevanter Konzentrationen führen.

Abwasser enthält zahlreiche anthropogene Spurenstoffe, sodass der Abwasserbehandlung zur Verringerung deren Freisetzung große Bedeutung zukommt. Dies gilt auch für dezentrale Abwasserbehandlungsmethoden, welche in manchen Regionen oft die einzige wirtschaftliche Lösung zur Abwasserbehandlung darstellen.

Pflanzenkläranlagen und Bodenfilter gelten als zuverlässige dezentrale Kläranlagen zur Reinigung bspw. häuslichen Abwassers (< 2000 Einwohnerwerte). Die Entfernung einzelner anthropogener Spurenstoffe, hauptsächlich Pharmaka, wurde bereits in diversen solcher Anlagen untersucht. Ob die ausgewählten Substanzen aussagekräftige Vertreter darstellen, um das Potential einer Anlage zur Entfernung anthropogener Spurenstoffe zu charakterisieren, wurde bei der Analytauswahl allerdings nicht berücksichtigt. Das Studiendesign unterschied sich zudem oft gravierend, was die Vergleichbarkeit bzw. Verallgemeinerung der Erkenntnisse limitiert. Außerdem wurde die Entfernung anthropogener Spurenstoffe über den Jahresverlauf zumeist anhand einzelner Stichproben anstelle regelmäßiger Beprobung beurteilt. Die Robustheit (bepflanzter) Bodenfilter bei der Elimination anthropogener Spurenstoffe ist somit nur unzureichend geklärt.

Ziele der Dissertation waren daher:

- Auswahl geeigneter, repräsentativer Spurenstoffe (Indikatoren) und Entwicklung einer analytischen Methode zur Quantifizierung in Zulauf und Ablauf von (Klein-) Kläranlagen,
- Beurteilung von Reinigungsleistung und Robustheit verschiedener, parallel betriebener Pflanzenkläranlagen und Bodenfilter durch regelmäßige Untersuchungen über ein Jahr,
- Identifizierung vorteilhafter (Betriebs-) Bedingungen für die Elimination der repräsentierten anthropogenen Spurenstoffe,
- Untersuchungen zur Bioabbaubarkeit des oft als persistent charakterisierten Süßstoffs Acesulfam hinsichtlich der Verbreitung effektiver Elimination in Kläranlagen, vorteilhaften Bedingungen, des Abbauwegs und der beteiligten Mikroorganismen.

2. Material und Methoden

2.1. Substanzauswahl

Zur Einschätzung der Reinigungsleistung biologischer (Klein-) Kläranlagen hinsichtlich anthropogener Spurenstoffe wurden sieben Substanzen ausgewählt (Coffein, Ibuprofen, Naproxen, Benzotriazol, Diclofenac, Acesulfam, Carbamazepin). Diese fungierten als Prozessindikatoren für die Effektivität des Bioabbaus. Jeder Indikator repräsentiert Substanzen identischen (Abbau-) Verhaltens. Die Indikatoren wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) quantifiziert.

2.2. Pflanzenkläranlagen

Die untersuchten Untergrundpflanzenkläranlagen und Bodenfilter (Pilot-Maßstab) waren Teil einer Pilotanlage, wurden mit kommunalem Abwasser beschickt und parallel betrieben. In Zu- und Ablauf sechs etablierter und zwei neu in Betrieb genommener Anlagen verschiedener Bauart wurden über ein Jahr klassische Abwasserparameter sowie Indikatoren analysiert. In zwei weiteren, belüfteten Bodenfiltern wurde während einer simulierten Havarie (Ausfall der Belüftung) die Veränderung der Ablaufkonzentration der Indikatorsubstanzen verfolgt. Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Department Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum.

2.3. Anreicherungskulturen

Biomasse aus einer Pflanzenkläranlage wurde in einem Selektivmedium mit Acesulfam (ACE) als einziger Kohlenstoffquelle inkubiert und die am Abbau von ACE beteiligten Mikroorganismen sukzessive angereichert (Überimpfen, Passage über Agar-Medien, Erhöhen des ACE-Gehalts bis 7 g/L). Begleitend wurde die Abbauleistung der Kulturen bzgl. ACE verfolgt. Die Veränderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde durch molekularbiologische Methoden (DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung von 16S rRNA-Genen) untersucht. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Department Umweltmikrobiologie durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Reinigungsleistung der ausgewählten Pflanzenkläranlagen und Bodenfilter

Die Effizienz der Entfernung mobiler, organischer anthropogener Spurenstoffe in biologischen Kleinkläranlagen sollte mittels Indikatorsubstanzen eingeschätzt werden, welche zusammen ein breites Spektrum an Bioabbaubarkeit in verschiedenen Redoxmilieus abdecken. Anhand verschiedener Kriterien, bspw. hohe Polarität, gleichmäßige Freisetzung, bekanntes Abbauverhalten, wurden sieben Indikatoren ausgewählt: Coffein und Ibuprofen als Vertreter leicht aerob bioabbaubarer, Naproxen und 1*H*-Benzotriazol als mäßig aerob bioabbaubare Substanzen sowie Carbamazepin und Acesulfam als nicht aerob bioabbaubare anthropogene Spurenstoffe. Coffein ist zudem im Anoxischen und Anaeroben leicht, Naproxen mäßig bioabbaubar. Ibuprofen, Benzotriazol, Diclofenac und Acesulfam wurden als im Anaeroben und Anoxischen nicht bioabbaubar beschrieben und Carbamazepin kann nur im Anaeroben mäßig entfernt werden.

Die Daten bzgl. klassischer Abwasserparameter und Indikatoren von fünf etablierten Kleinkläranlagen (vier Pflanzenkläranlagen, ein Bodenfilter) offenbarten einen starken Zusammenhang zwischen dem Grad der Intensivierung, welcher die Sauerstoffverfügbarkeit bedingt, und der Reinigungsleistung: In intensivierten Anlagen wurde eine höhere, über das Jahr stabilere (robustere) Elimination aerob bioabbaubarer Substanzen beobachtet. Dies betraf konventionelle Abwasserinhaltsstoffe wie Ammonium, aber auch die Indikatoren Ibuprofen, Naproxen, Benzotriazol, Diclofenac (**Abbildung 1**) und Acesulfam. Sofern überhaupt saisonale Unterschiede in der Entfernung auftraten, war die höchste Reinigungsleistung in Monaten hoher Wasser- und Umgebungstemperaturen (Juni – September 2014) zu beobachten. Im Anoxischen oder Anaeroben abbaubare Substanzen wurden in den intensivierten Anlagen unzureichend (Nitrat) bis gar nicht (Carbamazepin) entfernt.

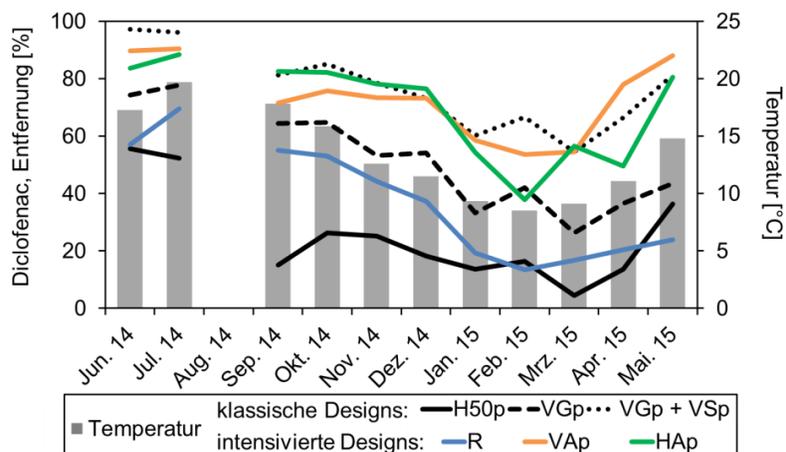


Abbildung 1: Temperatur des gemeinsamen Zulaufs sowie Entfernung von Diclofenac (frachtbasiert, %) in den klassischen Pflanzenkläranlagen H50p (horizontaler Fluss, Kiesbett), VGp (vertikaler Fluss, Kiesbett), VGp + VSp (zweistufig: vertikaler Fluss, Kies-, dann Sandbett), den intensivierten Pflanzenkläranlagen mit Belüftung HAp (horizontaler Fluss) und VAp (vertikaler Fluss) bzw. dem Zweikammer-Bodenfilter mit Rezirkulation R.

Die einfachste, klassische Pflanzenkläranlage (H50p) war durch anaerobe Bedingungen charakterisiert: Es traten bspw. im Ablauf stets negative Redoxpotentiale und kein Nitrat auf. Darüber hinaus war dies die einzige Anlage, in der zumindest zeitweise Carbamazepin entfernt wurde. Gleichzeitig deutete die mäßige Entfernung (bis 60%) von Ammonium im Sommer an, dass aerobe (Mikro-) Zonen im System vorhanden sein könnten. Bestätigt wurde dies durch ebenfalls mäßige Entfernung (bis 60%) von Ibuprofen.

Interne Beprobungen der bzgl. der vorherrschenden Bedingungen stark zonierten Pflanzenkläranlage HAp sollten weitere vorteilhafte Bedingungen zur Elimination der Spurenstoffe (Indikatoren) aufdecken. Es zeigte sich, dass einige Substanzen, wie Diclofenac, nur in Anlagenabschnitten entfernt wurden, in denen ein aerobes Milieu sowie Kohlenstoffmangelbedingungen vorlagen. Dies deutet auf einen metabolischen Abbau dieser Substanzen hin: Unter kohlenstoffarmen Bedingungen müssten zum Erhalt der Vitalfunktionen der mikrobiellen Gemeinschaft auch Substrate umgesetzt werden, die zuvor keinen Vorteil brachten, bspw. weil sie nicht leicht abbaubar und/oder gering konzentriert sind.

Die belüfteten Systeme (HAp, VAp) boten bezogen auf den Flächenbedarf die höchste und robusteste Reinigungsleistung, auch für die Indikatoren. Aufgrund dieser guten Performance wurden Folgeexperimente an Anlagen dieses Typs durchgeführt. Ein Belüftungsausfall wurde an zwei etablierten Bodenfiltern (HA, VA) simuliert und die Veränderung der Indikatorkonzentrationen im Ablauf verfolgt. Zunächst blieb hohe Reinigungsleistung für einige Stunden ohne aktive Belüftung erhalten. Dies deutet auf einen Sauerstoffüberschuss in den Systemen hin. Nach einem Tag war jedoch bereits eine deutlich verschlechterte Ablaufqualität zu verzeichnen (HA, VA) (**Abbildung 2**). Diese war nach mehreren weiteren Tagen ohne Belüftung vergleichbar mit der der weniger effektiven, klassischen Systeme (wie H50p). Die ursprüngliche Reinigungsleistung bzw. Ablaufqualität der belüfteten Bodenfilter konnte allerdings selbst nach sechs-tägigem Ausfall der Belüftung innerhalb weniger Tage wiederhergestellt werden.

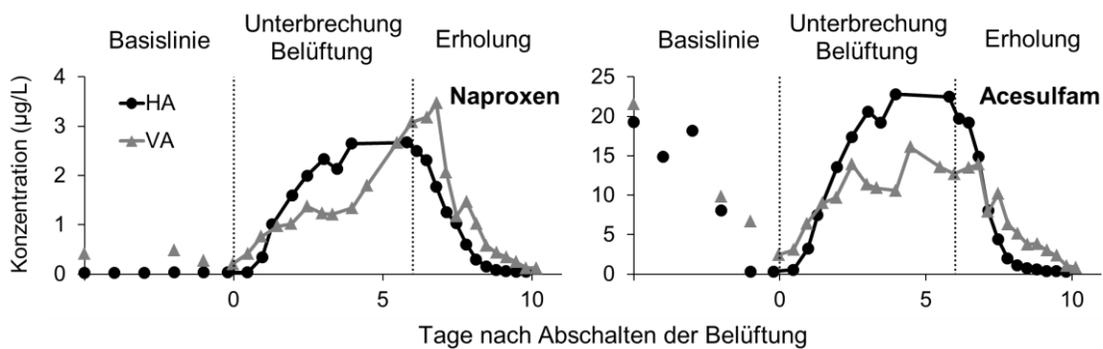


Abbildung 2: Konzentration von Naproxen (links) und Acesulfam (rechts) im Ablauf der belüfteten Bodenfilter HA und VA während ungestörten Betriebs (Basislinie, bestimmt einmal wöchentlich von 35 Tage vor bis Tag 0), nach Unterbrechung der Belüftung (Tag 0 – 6) sowie nach Wiederherstellung der Belüftung (Erholung, ab Tag 6).

Mittels neu in Betrieb genommener belüfteter Systeme (HM, HMc) wurde untersucht, wie schnell sich die hohe Reinigungsleistung dieses Anlagentyps etabliert. Bereits nach ein bis zwei Monaten waren die Ablaufqualitäten hinsichtlich leicht oxidativ entfernbarer Substanzen wie Ammonium, Gesamtkohlenstoff oder Ibuprofen mit der eines etablierten Pendants (HAp) vergleichbar. Für mäßig aerob bioabbaubare Substanzen war eine deutlich längere Einlaufzeit erforderlich, bspw. für Diclofenac und Acesulfam 11 – 12 Monate. HM (Belüftung nur am Systemanfang und -ende) und HMc (komplett belüftet) zeigten dabei eine identische Performance. Das Ziel, mit der zonierten Belüftung in HM anoxische Zonen zur verbesserten Denitrifikation zu schaffen, konnte mit gewählten Setup offenbar nicht erreicht werden.

Generell erwiesen sich belüftete Systeme robust, resilient und effizient in der Schmutz- sowie Spurenstoffelimination. Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse von Systemen im Pilotmaßstab auf Anlagen im Originalmaßstab (Grundfläche über 100 m²) muss noch geprüft werden. Ebenso sollte eine Einschätzung der Elimination von Substanzgruppen, die nicht durch die gewählten Indikatoren vertreten werden sowie der prioritären Substanzen erfolgen. Zukünftige Studien könnten zum Beispiel auch Indikatoren für sorptive Prozesse oder Aufnahme durch Pflanzen inkludieren, um die Bedeutung und den Beitrag dieser Entfernungsprozesse zu beurteilen.

Da Acesulfam unter bestimmten Bedingungen entfernt werden konnte, sollte das Indikatorset für (aeroben) Bioabbau außerdem um einen unter allen Redoxbedingungen persistenten anthropogenen Spurenstoff ergänzt werden. Acesulfam könnte im Indikatorset verbleiben, um auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit aerober, oligotropher Zonen hinzuweisen. Hierzu müssten die genannten Bedingungen allerdings die einzigen oder vorteilhaftesten Bedingungen für den Bioabbau sein, was in zukünftigen Untersuchungen zu prüfen ist.

3.2. Bioabbau von Acesulfam

Acesulfam (ACE) galt seit 2009 aufgrund seiner hohen Mobilität und Persistenz als idealer Marker, um Einflüsse behandelten und unbehandelten Abwassers auf die aquatische Umwelt anzuzeigen. Seit 2014 stellen jedoch immer mehr Ergebnisse aus Labor- und Feldstudien, bspw. aus Deutschland, Australien und China, die Persistenz von ACE infrage und 2017 wurde nachgewiesen, dass biologischer Abbau stattfinden kann. Daher sollte geklärt werden, wie verbreitet der Bioabbau von ACE ist, ob es sich dabei um eine neu entwickelte Fähigkeit mikrobieller Gemeinschaften handelt, welche Bedingungen förderlich und welche Mikroorganismen beteiligt sind.

ACE wurde in allen betrachteten kommunalen Kläranlagen (Daten von 2015 – 2017) eliminiert. Dabei wurden zum Teil deutliche saisonale Unterschiede in der Eliminationsleistung beobachtet

(**Abbildung 3**). Diese traten auf, wenn die Wassertemperatur längere Zeit 10 °C unterschritt. Die Anpassung der Entfernungsleistung nach Unter- bzw. Überschreiten von 10 °C dauerte mehrere Wochen. Ein Säulenexperiment mit Biomasse aus der Pflanzenkläranlage HAp, die ACE nur in warmen Monaten entfernte, zeigte, dass das Anheben der Temperatur die Aktivität der ACE-abbauenden Mikroorganismen wiederherstellt. Sie sind demnach ganzjährig im System vorhanden.

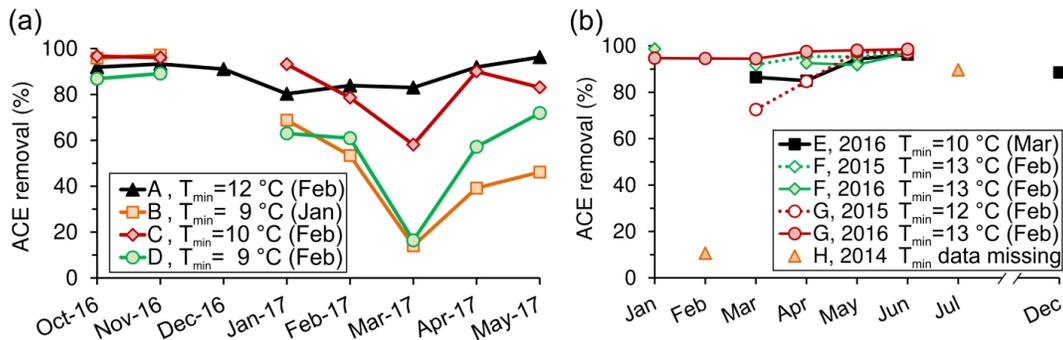


Abbildung 3: Acesulfam (ACE) Entfernung (konzentrationsbasiert, %) und Mindestwassertemperatur (T_{\min} , Monatsmittel) in den Kläranlagen (a) A–D (Kapazität: 18.000 – 550.00 Einwohnerwerte) zwischen Oktober 2016 und Mai 2017 bzw. (b) E–H (Kapazität: 160.000 – 400.000 Einwohnerwerte) während verschiedener Zeiträume.

Aufgrund der ausgeprägten Zonierung innerhalb der Pflanzenkläranlage HAp sollten durch interne Beprobungen weitere Bedingungen für effizienten ACE-Abbau aufgeklärt werden. Es zeigte sich, dass selbst bei adäquaten Temperaturen ACE erst in (späten) Abschnitten mit hoher Sauerstoffverfügbarkeit und einem Mangel an biologisch abbaubarem Kohlenstoff entfernt wurde. Das Fehlen solcher Bedingungen als Ursache für die früher berichtete Persistenz von ACE ist höchst unwahrscheinlich: Die Technologie der konventionellen Abwasserbehandlung hat sich während der letzten Jahre nicht grundlegend geändert und viele Anlagen mit berichteter ACE-Persistenz wurden in warmen Monaten beprobt. Literatur- und eigene Daten deuten vielmehr an, dass sich erst kürzlich mikrobielle Abbauewege für ACE entwickelt bzw. verbreitet haben und daher vermehrt ACE-Elimination in Kläranlagen beobachtet wird. Die Entwicklung mikrobieller Abbauewege für Xenobiotika trat bereits mehrfach auf, ACE scheint jedoch die erste Substanz zu sein, bei der die Entwicklung eines Abbaueweges in Kläranlagen beobachtet wurde.

Der genaue Zeitpunkt der Etablierung eines funktionierenden ACE-Abbaueweges ist nicht bekannt, da keine Langzeitmonitoringdaten zum ACE-Gehalt in Zu- und Abläufen von Kläranlagen vorliegen. Die Literatur zur ACE-Entfernung in der Abwasserbehandlung erlaubte jedoch eine Eingrenzung des Zeitraumes der Entwicklung in deutschen Kläranlagen auf 2008 bis 2012/13. In Elbe und Mulde ermittelte ACE-Konzentrationen deuten an, dass diese Entwicklung noch nicht abgeschlossen ist: Die berechnete ACE-Fracht beider Flüsse sank zwischen 2013 und 2016 kontinuierlich (**Abbildung 4**). Ein Rückgang des ACE-Konsums als Ursache ist dabei unwahr-

scheinlich. Genaue Verbrauchszahlen waren nicht zugänglich, doch deuten Literaturdaten z. B. zur ACE-Konzentration in Kläranlagenzuläufen, keine wesentliche Veränderung des ACE-Konsums an. Der Rückgang der Fracht in den Flüssen weist daher darauf hin, dass sich in immer mehr der einleitenden Kläranlagen effektive ACE-Abbauwege etablieren.

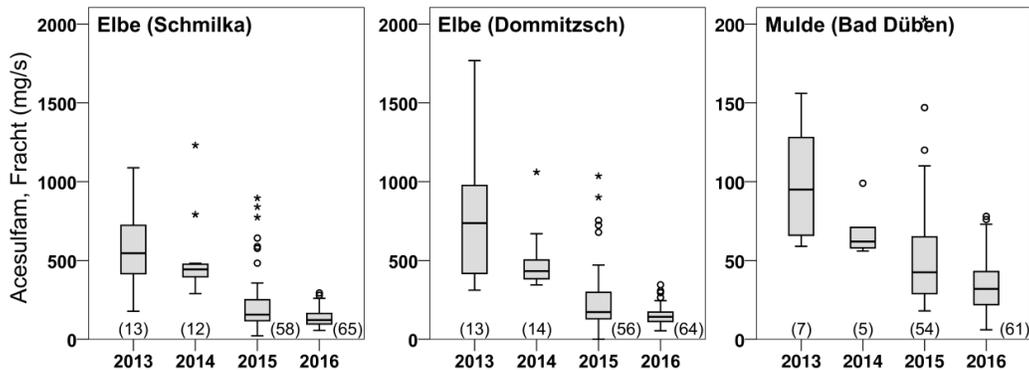


Abbildung 4: Acesulfam-Fracht in Elbe und Mulde an den Messstationen Schmilka (links) und Dommitzsch (mittig) bzw. Bad Dübén (rechts), berechnet aus der Acesulfam-Konzentration in der Stichprobe und dem Tagesmittel des Durchflusses am Beprobungstag. Die Anzahl der Stichproben in jedem Jahr ist in Klammern angegeben.

Zur Identifizierung ACE-abbauender Mikroorganismen wurden Anreicherungskulturen ausgehend von Biomasse aus der Pflanzenkläranlage HAp hergestellt. Diese Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen, bei ≥ 14 °C, in Mineralmedium mit ACE als einziger (zuge-setzter) Kohlenstoffquelle inkubiert und mehrfach überimpft (in frisches Flüssigmedium bzw. Agar-Medium). ACE wurde wiederholt und quantitativ umgesetzt. Eine der Anreicherungskulturen entfernte bspw. innerhalb von 28 d 99% von ACE (5 g/L) und des Gesamtkohlenstoffs. Amidosulfonsäure (SA) war dabei das finale, in stöchiometrischen Anteilen gebildete Transformationsprodukt. Ebenso wurde Kulturwachstum beobachtet, auch wenn nur ACE als initiale Kohlenstoffquelle vorhanden war. Dass ACE als Wachstumssubstrat (katabole Transformation) verwendet wird, war bisher nicht bekannt.

Um am Abbau beteiligte Mikroorganismen identifizieren und beschreiben zu können, eignen sich Reinkulturen. Die Gewinnung solcher gelang jedoch nicht. Daher wurde alternativ die Veränderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Anreicherungskulturen durch Sequenzierung von 16S rRNA-Genen verfolgt. *Phyllobacteriaceae* reicherten sich über alle Schritte merklich an, was eine Schlüsselrolle von Organismen dieser Familie andeutet (**Abbildung 5**). Weiterhin beteiligt sein könnten zudem Spezies von *Methylophilaceae* (vor Agar-Passage angereichert), *Bradyrhizobiaceae* und eventuell *Pseudomonas* (beide: nach Agar-Passage angereichert). Da auch in den letzten Mischkulturen vollständiger ACE-Umsatz zu SA stattfand, scheinen trotz verringerter Diversität der mikrobiellen keine Schlüsselspezies bzw.

Schüsselenzyme gefehlt zu haben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass mehrere Organismen zum vollständigen Abbau von ACE befähigt sind.

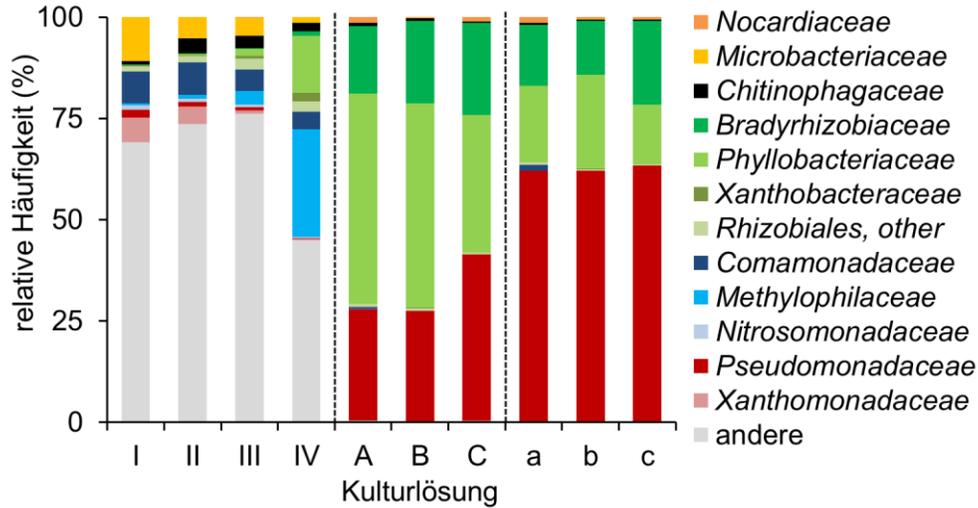


Abbildung 5: Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Anreicherungskulturen ausgehend von frischer Biomasse der Pflanzenkläranlage HAp (I) gemäß Sequenzierung der 16S rRNA-Gene auf Familienebene. Taxa mit relativer Häufigkeit < 1% und Taxa, die nur in Kulturen I–IV auftraten, sind unter „andere“ zusammengefasst. Aus sukzessivem Transfer von Kultur I entstanden Kulturen II – IV. Kulturen A – C entstanden durch Agar-Passage (Mineralmedium mit ACE, einmaliges Ausstreichen) von Kultur IV. Kulturen a – c gingen jeweils aus A – C nach Agar-Passage (Komplexmedium, einmaliges Ausstreichen) hervor.

Zur weiteren Verringerung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft wurden Mischkulturen definierter Zusammensetzung durch Kombinieren verschiedener Isolate (vereinzelte Klone nach mehrmaliger Agar-Passage, Identifizierung via 16S rRNA-Gen-Sequenzierung) von Agar-Kulturen zweier Anreicherungskulturen hergestellt. Kein Isolat konnte *Pseudomonas* zugeordnet werden, vielleicht aufgrund langsamen Wachstums oder Übersehen entsprechender Kolonien beim Überimpfen der Agar-Platten. Die Abbau-Aktivität der hergestellten Mischkulturen unterschied sich teils deutlich: Isolate von *Phyllobacteriaceae*, welches als einzige in Reinkultur auf ACE-Abbau untersucht wurden, zeigten bspw. keinen ACE-Umsatz. Hingegen setzte die Kombination der Isolate von *Bosea*, *Microbacterium*, *Bradyrhizobiaceae* und *Phyllobacteriaceae* ACE quantitativ und schnell zu SA um. Die Ergebnisse der Mischkultur-Versuche legen nahe, dass die vermutete Schlüsselrolle von *Phyllobacteriaceae* nicht darin besteht, ACE vollständig umzusetzen. Definitiv sind sie für den Abbau nicht essentiell, da auch Kulturen ohne *Phyllobacteriaceae* effektiven Abbau zeigten. Die Versuche rücken eher *Bradyrhizobiaceae*, speziell *Bosea*, größer, in den Vordergrund. Dies stimmt mit der Vermutung des vorhergehenden Experimentes betreffs der großen Bedeutung von *Bradyrhizobiaceae* für den ACE-Abbau überein.

Vor allem aufgrund der Möglichkeit horizontalen Gentransfers müssen die in der vorliegenden Arbeit über mehrere Jahre angereicherten, letztlich identifizierten bzw. daneben vorhandenen Organismen nicht zwangsläufig dieselben sein, welche ursprünglich (in der Pflanzenkläranlage)

für den ACE-Abbau verantwortlich waren. Die Identifikation sowie physiologische Beschreibung der angereicherten, für den ACE-Abbau essentiellen Mikroorganismen stellen daher nur erste Arbeiten auf dem Weg zur Aufklärung des Metabolismus dar.

4. Fazit

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst sieben repräsentative Vertretersubstanzen als Prozessindikatoren für biologischen Abbau ausgewählt und ein spurenanalytisches Verfahren zur Quantifizierung in Abwasser entwickelt (Kahl *et al.* 2017). Dies erlaubte, bei den üblichen Zulaufgehalten, Eliminationen der Indikatoren (konzentrationsbasiert) von mindestens 90% sicher zu erfassen.

Mittels dieser Methode wurde die Entfernung anthropogener Spurenstoffe erstmals regelmäßig über ein komplettes Jahr, in parallel betriebenen Pflanzenkläranlagen bzw. Bodenfiltern (Pilot-Maßstab) verschiedenen Intensivierungsgrades, beschickt mit realem Abwasser, verfolgt. Begleitend wurden konventionelle Abwasserparameter analysiert. Die Indikator-Daten erwiesen sich als gute Ergänzung zu konventionellen Abwasserparametern, z. B. um Bedingungen innerhalb eines Systems anzuzeigen, auch wenn nur der Ablauf beprobt wird. Beispielsweise könnte der Grad der Entfernung von Acesulfam bzw. Diclofenac anzeigen, ob in einem System ausreichend breite Zonen aerober, kohlenstoffarmer Bedingungen vorliegen. Mittels klassischer Abwasserparameter im Ablauf lässt sich dies schwer einschätzen. Neben der Einschätzung der generellen Reinigungsleistung konnten für den Abbau der ausgewählten Substanzen förderliche (Betriebs-) Bedingungen aufgeklärt werden (Kahl *et al.* 2017). Die untersuchten Anlagen höchster Intensivierung, die aktiv belüfteten Systeme, erwiesen sich über den Jahresverlauf als robust, resilient und in der Entfernung aerob leicht bis mäßig bioabbaubarer Spurenstoffe als konventionellen Kläranlagen ebenbürtig. Wie groß das (öko-) toxikologische Risiko ausgehend vom Ablauf durch verbleibende Muttersubstanzen sowie gebildete Transformationsprodukte ist, wäre in einem nächsten Schritt zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bioabbaubarkeit des Süßstoffs Acesulfam näher untersucht. Vor Beginn der Arbeit wurde dieser als persistent beschrieben. Die Ergebnisse zur Acesulfam-Entfernung in neun deutschen Kläranlagen sowie zum zeitlichen Verlauf der Acesulfam-Fracht in zwei deutschen Flüssen (2013 – 2016) zeigten jedoch, dass die Entfernung von Acesulfam während der Abwasserbehandlung inzwischen verbreitet ist. Mittels Literaturdaten und eigenen Ergebnissen gelang zum ersten Mal eine Eingrenzung des Zeitraums der Entwicklung dieser Abbaufähigkeit. Durch Laborversuche konnte erstmalig gezeigt werden, dass Acesulfam von Mikroorganismen katabolisch abgebaut wird, also als Kohlenstoffquelle dient. Erstmals konnten auch Mikroorganismen isoliert und identifiziert werden, welche in den Abbau von

Acesulfam involviert sind (Kahl *et al.* 2018). Dass keine Reinkulturen Acesulfam-abbauender Mikroorganismen gewonnen werden konnten, könnte bedeuten, dass Acesulfam nur durch Zusammenwirken mehrerer Spezies abgebaut wird: Verschiedene Spezies könnten verschiedene Abbauschritte durchführen oder einige Spezies könnten andere mit notwendigen Kofaktoren versorgen ohne selbst direkt am Abbau beteiligt zu sein. Nachfolgende Untersuchungen deuten an, dass besonders Spezies der Gattung *Bosea* bzw. andere Spezies der Familie *Bradyrhizobiaceae* relevant sind. Auf welchem Weg Acesulfam transformiert wird, welche genetische Ausstattung für den Abbau erforderlich ist und welche Spezies diese bereits besitzen, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Außerdem könnte die Beobachtung des weiteren Verhaltens von Acesulfam in der Umwelt einen Einblick in die Verbreitung neu entwickelter Abbaufähigkeiten unter Mikroorganismen erlauben.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass sich in mit Abwasser beschickten (bepflanzten) Bodenfiltern unter geeigneten Betriebsbedingungen mikrobielle Gemeinschaften etablieren, die eine Vielzahl aerob bioabbaubarer Substanzen, inkl. anthropogener Spurenstoffe, entfernen können. Zudem deutet sich an, dass durch Adaptationsprozesse die Anzahl entfernbarer Substanzen perspektivisch weiter steigen und die Spurenstofffracht in Kläranlagenabläufen so weiter reduziert werden könnte.

5. Eigene Publikationen

Kahl, S., Kleinsteuber, S., Nivala, J., van Afferden, M., Reemtsma, T. The artificial sweetener acesulfame: Emerging biodegradation of a compound previously reported as persistent in biological wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, **2018**, 52 (5), 2717-2725.

Kahl, S., Nivala, J., van Afferden, M., Müller, R.A., Reemtsma, T. Effect of design and operational conditions on the performance of subsurface flow treatment wetlands: Emerging organic contaminants as indicators, *Water Research*, **2017**, 125, 490-500.

Weitere Publikationen

Nivala, J., **Kahl, S.**, Boog, J., van Afferden, M., Reemtsma, T., Müller, R. A. Dynamics of emerging organic contaminant removal by conventional and intensified subsurface flow treatment wetland designs. *Science of the Total Environment*, **2019**, 649, 1144-1156.

Nivala, J., Neale, P.A., Haasis, T., **Kahl, S.**, König, M., Müller, R.A., Reemtsma, T., Schlichting, R., Escher, B.I. Application of cell-based bioassays to evaluate treatment efficacy of conventional and intensified treatment wetlands, *Environmental Science: Water Research & Technology*, **2018**, 4, 206-217.

Helmholtz Zentrum für
Umweltforschung – UFZ
Permoserstraße 15
04318 Leipzig
www.ufz.de

NICHT ZUM VERKAUF BESTIMMT.