



Antikörperbasierte vor-Ort-Analytik für das Monitoring der Eliminierung von Spurenstoffen in Kläranlagen

Rudolf J. Schneider (rudolf.schneider@bam.de)

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) Berlin

Zusammenfassung

Die Überwachung der Eliminierung von Spurenstoffen in Kläranlagen, wie sie die Neufassung der Kommunalabwasser-richtlinie vorschreibt, ruft einen Bedarf an vor-Ort-Analytik in den Kläranlagen hervor. Immunanalytische Methoden können vor Ort, z.B. in Form von Schnelltests, durchgeführt werden, ideal aber wären kontinuierlich arbeitende (Immuno-Bio)Sensoren. Antikörperbasierte Verfahren weisen als Flaschenhals immanent die Einschränkung auf, dass pro Analyt ein Antikörper zum Einsatz kommen muss und dass daher nur eine kleinere Anzahl von Substanzen analysiert werden kann. Die Indikatorenliste der Abwasserrichtlinie liefert hier einen Anhaltspunkt. Der Artikel weist schon bisher existierende Schnell- und Hochdurchsatzverfahren aus, ebenso wie Forschungsansätze für eine Sensorik, die online einsetzbar wäre und gibt einen Überblick über Defizite und Entwicklungen.

Spurenstoffe in Kläranlagen

Seit vielen Jahren werden im gesamten Wasserkreislauf, d.h. in Abwasser, Oberflächengewässern, Grundwasser bis hin zum Trinkwasser, organische Kontaminanten nachgewiesen^[1], die nun oft als „Spurenstoffe“ bezeichnet werden. Nachdem der Fokus der Gesetzgebung, maßgeblich in den EU-Richtlinien, in der Vergangenheit v.a. auf dem Trinkwasser („Schutz des Menschen“) und den Oberflächengewässern („Schutz der aquatischen Fauna und Flora“) lag, ist in den letzten Jahren die Einsicht gereift, dass das Vorkommen dieser Stoffe in der Nutzung der Gewässer als Vorfluter für das gereinigte Abwasser begründet liegt. Da der Eintrag vieler Stoffe ins Abwasser, insbesondere von Pharmazeutika, nur in sehr begrenztem Maße reduziert werden kann – die Forschung geht in Richtung leicht abbaubarer Wirkstoffe und die Sammlung von Alt-Medikamenten hat Fortschritte gemacht – muss nun der Fokus auf eine vollständigere Elimination organischer Kontaminanten während der Abwasseraufbereitung liegen. Diesem Umstand trägt auch die novellierte („Recast“) europäische Richtlinie, die „EU Urban Wastewater Treatment Directive“ (UWWTD) Rechnung.

Die technischen Möglichkeiten zur Spurenstoffelimination sind seit Längerem vorhanden, einzelne Länder, wie die Schweiz, treiben den Ausbau ihrer Abwasserreinigungsanlagen (**Abbildung 1**) mit einer sog. „4. Reinigungsstufe“ kräftig voran. Allerdings gibt es ein zentrales Problem. Technische Anlagen, wie diese „Viertbehandlung“, bedürfen einer Überwachung, eines Monitorings der Abbauleistung. Gerade in Deutschland, wo die Zusammensetzung des Abwassers durch den wechselnden Zutritt von Oberflächenwasser in den sog. Mischkanalisationen stark schwankt, ist eine Messtechnik wünschenswert, auch aus

wirtschaftlichen Gründen, denn, wenn saisonal geringere Belastungen auftreten, muss der Reinigungsaufwand nicht unbedingt kontinuierlich hoch gehalten werden.

Die bisher gebauten Anlagen werden „eingefahren“, indem die Zu- und Ablaufkonzentrationen vieler Spurenstoffe mit den klassischen Verfahren der Spurenanalytik, den gekoppelten Verfahren aus Chromatographie und Massenspektrometrie, vorzüglich LC-MS, bestimmt werden. Für einen laufenden Betrieb sollte es aber vor-Ort-Analytik geben, schnell, kostengünstig, matrixtolerant, im Idealfall in Form echter Sensoren.



Abb. 1: Kläranlage (Symbolbild); ©BAM

Antikörperbasierte Verfahren, auch immunanalytische Methoden genannt, bei denen Antikörper für den selektiven Analyseschritt verwendet werden, erreichen die erforderliche Selektivität und Sensitivität. Da sie aber einen Antikörper pro Spurenstoff erfordern, sind bisherige Ansätze bestenfalls auf serielles oder paralleles „Oligoplexing“, d.h. das Erfassen einiger weniger Parameter ausgerichtet. Die Stoffauswahl muss also bedarfsgerecht und konsensuell erfolgen. Daher ist es außerordentlich zu begrüßen, dass die neue Kommunalabwasserrichtlinie (KARL)^[2], eine Stoffliste („Indikatoren“, in Anlehnung an die Schweizer Stoffliste^[3] und die sog. KomS-Liste^[4]) enthält, welche die zu überprüfenden Stoffe auflistet und auch gleich einen verbindlichen Eliminierungsgrad festlegt. Die Stoffliste ist in der **Tabelle 1** wiedergegeben.

Aus den beiden Kategorien müssen minimal 4 (Kat. 1) + 2 (Kat. 2) Substanzen ausgewählt werden, anhand derer die durchschnittliche Eliminierungsleistung von mindestens 80 % der eigenen Kläranlage nachgewiesen wird.

Tab. 1: Indikatoren-Liste der Kommunalabwasserrichtlinie (KARL)

Kategorie 1	Kategorie 2
Amisulprid	Candesartan
Carbamazepin	Irbesartan
Citalopram	Benzotriazol
Clarithromycin	Gemisch aus 4-Methylbenzotriazol und 5-Methylbenzotriazol
Diclofenac	
Hydrochlorothiazid	
Metroprolol	
Venlafaxin	

Antikörperbasierte Methoden

Welche antikörperbasierten Methoden stehen nun zur Verfügung, die in der Immunanalytik „Formate“ (**Abbildung 2**) genannt werden? Als Basisformat ist der ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) zu nennen, der eine Labormethode darstellt, die auf sog. Mikrotiterplatten ausgeführt wird. Dies ist die Methode der Wahl für die Analyse einer großen Anzahl von Proben[5]. ELISAs wurden in unseren Laboren für die Überwachung anthropogener Marker wie das Antiepileptikum Carbamazepin, das Analgetikum Diclofenac, das Antihistaminikum Cetirizin, das Steroidhormon Estron, das antimikrobielle Sulfamethoxazol, die psychoaktiven Substanzen Koffein und Kokain, den prioritären Schadstoff Bisphenol A und Isolithocholsäure, eine Gallensäure, entwickelt und zur Analyse auch von Abwasserproben eingesetzt. Instrumentell einfacher durchzuführen sind Formate wie die sog. Mix-and-Read-Assays, z.B. der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA)^[6, 7]. Für sie gibt es auch tragbare Polarimeter, die vor Ort eingesetzt werden können – allerdings ist die Empfindlichkeit dieser Assays geringer und sie müssen wegen der entfallenen Waschschriffe sorgfältig bzgl. ihrer Matrixtoleranz validiert werden.

Für schnelle, orientierende Analysen vor Ort eignet sich besonders der Lateral-Flow-Immunoassay (LFIA)^[8]. Er hat während der COVID-19-Pandemie durch die verbreiteten Antigen-Schnelltests bewiesen, dass er praktisch von jedem Anwender erfolgreich durchgeführt werden kann. Es gibt ihn in Kassetten-Form, aber auch als ganz simple Dipsticks, die nur kurz in die Probe eingetaucht werden. Um nicht nur eine Ja/Nein-Aussage zu erhalten, sondern ein quantitatives Ergebnis, gibt es sehr handliche Auslesegeräte („Reader“) oder Applikationen, die die Kamera des Smartphones in ein Densitometer verwandeln.

Die Fähigkeit zur Multiparameter-Analyse lässt sich entweder durch spektrale Separation, etwa das spektral aufgelöste Auslesen verschiedener Label, die verschiedene Antikörper markieren, oder durch Ortsauflösung, etwa durch verschiedene Ausleseorte auf Bio-Chips, realisieren. Eine reizvolle Kombination ist der Einsatz von farbcodierten Mikropartikeln

(„beads“) und ihre sequenzielle Auslesung in einem Durchflusszytometer. Man spricht von „Suspensions-Arrays“. Der SAFIA (Suspension Array Fluorescence Immunoassay), basierend auf mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Beads, ist eine leistungsfähige Plattform für Multiplex-Assays^[9]. Überhaupt lassen sich mit Partikeln sehr interessante, kontinuierlich arbeitende Formate realisieren. Durch immer wieder neue Dosierung frischer Beads kann die Analyse in kurzen Abständen erneut gestartet werden. Diese Assays sind meist in mikrofluidische Set-ups integriert. Durch die Verwendung von Magnetpartikeln lassen sich z.B. antikörperbeladene Beads an einer bestimmten Stelle der Fluidik vorübergehend festhalten und dann, nach Entfernen des Magneten, wieder aus dem System herauspülen. Elektrochemische Assays bieten noch zusätzliche Vorteile, da keine Lichtquelle erforderlich ist. Sie sind besonders vielversprechend für Stand-alone-Analysatoren und Biosensoren^[10-13].



Abb. 2: Schematische Darstellung der antikörperbasierten Formate LFIA, FPIA, SAFIA und eines mikrofluidischen elektrochemischen Sensors (von links nach rechts).

Defizite

Der wichtigste Baustein aller immunanalytischen Methoden ist der Antikörper. Er muss hohe Selektivität und Affinität aufweisen, was bei den niedermolekularen Substanzen, die in den genannten Anwendungen die Targets sind, nicht leicht zu realisieren ist. Gezielte Antikörperentwicklung, mit biologischen und molekularbiologischen (rekombinanten) Methoden, auf die Konsenslisten hin und die umfassende Charakterisierung und Validierung anhand von realen Szenarien, sind eine große Aufgabe, der wir uns an der BAM für die nächsten Jahre verschrieben haben. Ein weiteres Defizit ist eine fehlende Norm. Antikörperbasierte Sensorik wird zur Erfüllung der gesetzlichen Aufgaben nur herangezogen werden, wenn eine Norm die Qualitätskriterien für Antikörper, Validierungsparameter für immunanalytische Methoden unter Matrixbedingungen und Auswertestandards für Ergebnisse aus antikörperbasierten Verfahren festlegt. Solch eine Norm wird gerade im DIN Arbeitsausschuss NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ erarbeitet, der formal ein gemeinsames Gremium der Wasserchemischen Gesellschaft (Hauptausschuss (HA) „Analyseverfahren – Entwicklung und Normung“) und des DIN Normenausschusses Wasserwesen (NAW) in Angriff genommen.

Diskussion und Ausblick

Nicht zuletzt treibt auch der Klimawandel einen bewussteren Umgang mit unserer Ressource Wasser an. Süßwasser ist Teil der Circular Economy und muss in hohem Maße wiederverwendet werden, um „Wassersicherheit“ in Deutschland zu gewährleisten. Dabei werden vor Ort in den Kläranlagen

kostensparende, schnelle und nicht zuletzt „grüne“ Methoden mit einem kleinen CO₂-Fußabdruck, gebraucht, die in gemeinsamen Anstrengungen vieler Akteure und Stakeholder entwickelt werden müssen.

Danksagung

Ich danke den zahlreichen Nachwuchsforschenden, Doktorand*innen und Postdocs für die zahlreichen Forschungsbeiträge in diesem, unserem Arbeitsgebiet und der Drittmittelförderung, ohne die diese Arbeiten nicht möglich gewesen wären; siehe hierzu die Angaben in den Veröffentlichungen.

Literatur

- [1] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy (2008): The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42, 3498-3518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>
- [2] [Richtlinie \(EU\) 2024/3019 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. November 2024 über die Behandlung von kommunalem Abwasser \(Neufassung\)](#). (ABl. L 3019 vom 12.12.2024)
- [3] C. Abegglen, H. Siegrist (2012): Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern, Umwelt-Wissen Nr. 1214: 210 S.; Anhang A1: Schweizspezifische Stoffe und Qualitätszielvorschläge.
- [4] Kompetenzzentrum Spurenstoffe Baden-Württemberg (Hrsg.) (2017): Handlungsempfehlungen für die Vergleichskontrolle und den Betrieb von Verfahrenstechniken zur gezielten Spurenstoffelimination; s. Tabelle 5; <https://www.koms-bw.de>
- [5] A. Bahlmann, J. J. Carvalho, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider (2012): Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters. *Chemosphere* 89(11) 1278-1286. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.020>
- [6] L. Oberleitner, U. Dahmen-Levison, L. A. Garbe, R. J. Schneider (2017): Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of carbamazepine in wastewater. *Journal of Environmental Management* 193, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.01.063>
- [7] A. Raysyan, R. Moerer, B. Coesfeld, S. A. Eremin, R. J. Schneider (2021): Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413, 999-1007. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03058-w>
- [8] A. Raysyan, A., R. J. Schneider (2021). Development of a lateral flow immunoassay (LFIA) to screen for the release of the endocrine disruptor bisphenol a from polymer materials and products. *Biosensors* 11(7), 231. <https://doi.org/10.3390/bios11070231>
- [9] P. Carl, D. Sarma, B. J. R. Gregório, K. Hoffmann, A. Lehmann, K. Rurack, R. J. Schneider (2019): Wash-free multiplexed mix-and-read suspension array fluorescence immunoassay for anthropogenic markers in wastewater. *Analytical Chemistry* 91(20), 12988-12996. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03040>
- [10] N. A. Abdelshafi, J. Bell, K. Rurack, R. J. Schneider (2019): Microfluidic electrochemical immunosensor for the trace analysis of cocaine in water and body fluids. *Drug Testing and Analysis* 11(3), 492-500. <https://doi.org/10.1002/dta.2515>
- [11] A. Ecke, T. Westphalen, J. Hornung, M. Voetz, R. J. Schneider (2022): A rapid magnetic bead-based immunoassay for sensitive determination of diclofenac. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414(4), 1563-1573. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03778-7>
- [12] S. Höfs, V. Jaut, R. J. Schneider (2023): Ergometrine sensing in rye flour by a magnetic bead-based immunoassay followed by flow injection analysis with amperometric detection. *Talanta* 254, 124172. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124172>
- [13] A. Ecke, J. Bell, R. J. Schneider (2023). A three-dimensional microfluidic flow cell and system integration for improved electrochemical substrate detection in HRP/TMB-based immunoassays. *Sensors & Diagnostics* 2, 887-892. <https://doi.org/10.1039/d3sd00095h>

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. Rudolf J. Schneider
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Abteilung 1 Analytische Chemie; Referenzmaterialien
Fachbereich 1.8 Umweltanalytik
Richard-Willstätter-Str. 11
12489 Berlin
E-Mail: rudolf.schneider@bam.de
Tel.: +49 15209037766