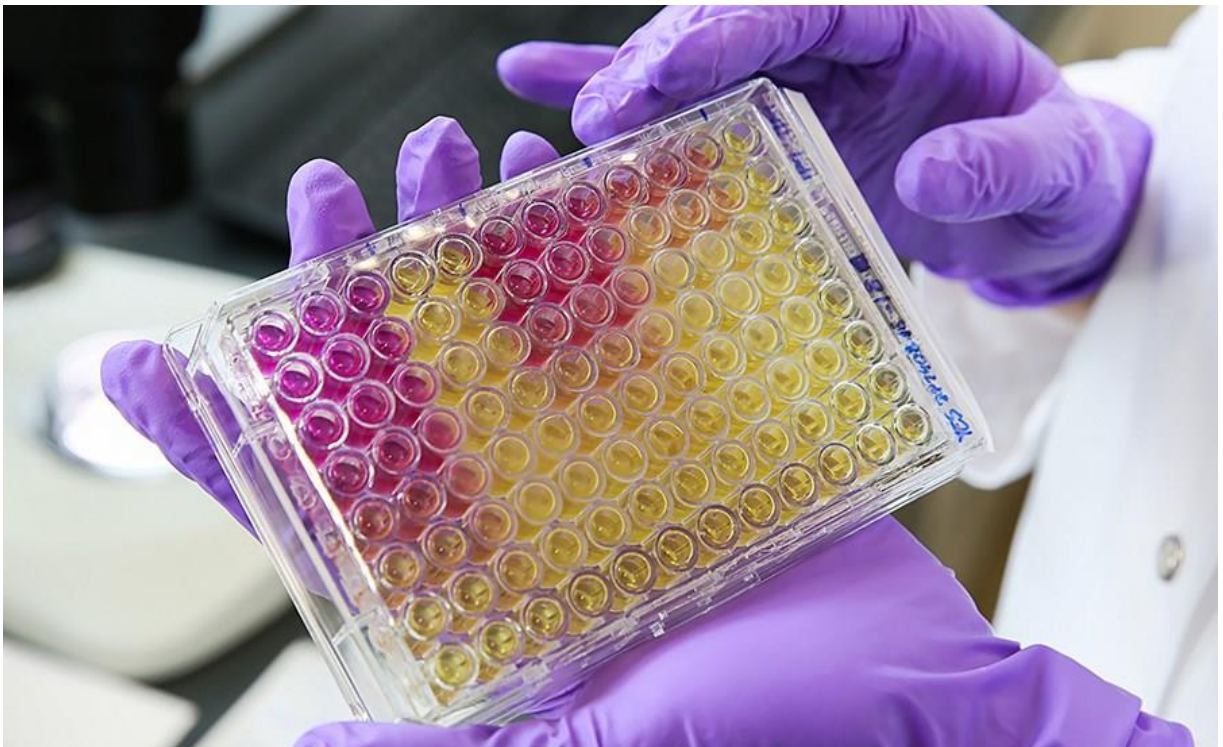


## ARA mit Ozonung

### Bestimmung der Mutagenität mittels Ames-Test



Zofingen, im Januar 2024

Im Auftrag des VSA, Verband Schweizer Abwasser- und  
Gewässerschutzfachleute



## **ENVILAB AG**

Mühlethalstrasse 25, CH-4800 Zofingen

Telefon +41 (0)62 745 70 50

[www.envilab.ch](http://www.envilab.ch), [info@envilab.ch](mailto:info@envilab.ch)

<b>Version</b>	<b>Datum</b>	<b>Dateiname</b>	<b>Sachbearbeitung</b>	<b>Freigabe</b>
4.0	18.01.2024	240118_Z3459.007 Mütagenität auf ARA mit Ozonung 2022-23 v4.0.docx	Alessandro Piazzoli Samuel Christe Philipp Nasemann	Alessandro Piazzoli

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Ausgangslage	4
1.2	Projektbeschreibung	5
2	METHODEN	7
2.1	Probenahme	7
2.2	Analytik	8
2.3	Festphasenextraktion	9
2.4	Biotests	10
3	RESULTATE	11
3.1	Betriebsdaten und ergänzende Analytik	11
3.2	Ames-Tests	13
4	DISKUSSION	15
4.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	15
5	SCHLUSSFOLGERUNG	17
5.1	Empfehlung	18
5.2	Einschränkung der Interpretationsgültigkeit	18
6	LITERATURVERZEICHNIS	19

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ausgangslage

Die allgemeine Strategie des Bundes zur Reduktion von Mikroverunreinigungen (MV) in den Gewässern beinhaltet den zielgerichteten Ausbau von Abwasserreinigungsanlagen (ARA). Zentrales Element ist dabei eine zusätzliche Reinigungsstufe zur Entfernung von Mikroverunreinigungen (EMV-Stufe) aus dem bereits biologisch gereinigten Abwasser, wofür sich vor Allem der Einsatz von Ozon oder Aktivkohle bewährt hat (Lee, et al., 2013; Abegglen, et al., 2009; Abegglen, et al., 2012; Margot J., 2013).

Der VSA hat eine Empfehlung zur stufenweisen Abklärung der Eignung des Ozon-Verfahrens für jedes spezifische Abwasser herausgegeben. Die Abklärungen werden für die Erstinvestitionen beim Ausbau von ARA mit einer Ozonung verlangt. Sie werden zu 75% abgegolten (Wunderlin, 2021).

Die Abklärungen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

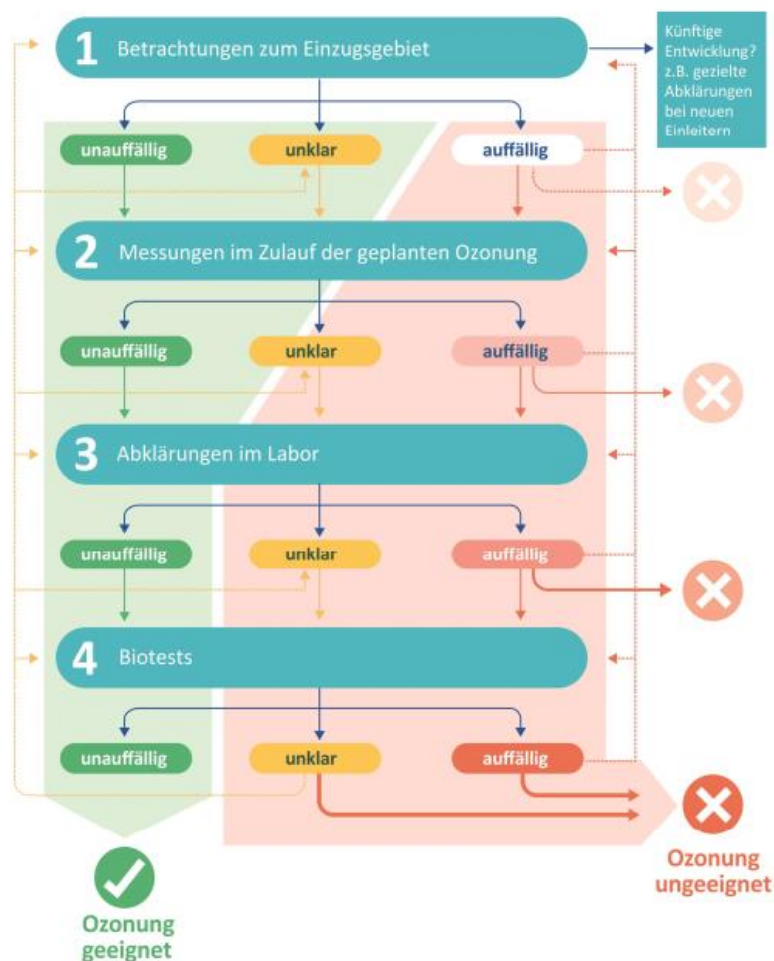


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Abklärungen. Die gestrichelten Linien deuten an, dass bei unklaren/auffälligen Resultaten gewisse Abklärungen wiederholt werden sollten. Die Mutagenität wird in Stufe 4 mit dem Ames Test untersucht. Quelle: Wunderlin, 2021.

Im Modul 4 werden Biotests eingesetzt, um die Bildung von toxischen Transformationsprodukte durch die Ozonung zu erfassen. Der Ames-Test erfasst dabei die mutagene Wirkung. Die Eawag führte eine Studie zum Vergleich der Mutagenität von grosstechnisch/halbtechnisch sowie im Labormassstab ozoniertem Abwasser durch. Sie kam zum Ergebnis, dass die Mutagenität mit den Labortests tendenziell unterschätzt werden könnte. Die Gründe für diese Diskrepanz sind bisher unklar (Manasfi, et al.).

Zudem wurde einen Zusammenhang zwischen Nitrit im biologisch gereinigten Abwasser und erhöhter mutagener Potenz nach dessen Ozonung, die ab einer Nitrit-Konzentration von zirka 0.2 mgN/L zuzunehmen scheint, gefunden (Manasfi, et al.).

Der VSA beauftragte daraufhin ENVILAB mit einer Zustandsabklärung auf ausgewählten ARA. Dabei sollten mögliche mutagene Effekte durch Abwasserbehandlung mit Ozon und bei Konzentrationen von Nitrit unter und über 0.3 mgN/L untersucht werden. 0.3 mgN/L anstatt 0.2 mgN/L wurde zur Sicherheit als Richtwert gewählt.

Die Mutagenität wird in dieser Studie mit dem Ames-Test unter Verwendung der Bakterienstämme TA98 und TA100 bestimmt. Parallel wurden zusätzlich Proben mit den empfindlicheren Stämmen YG1041/1042 und YG7108 inkubiert, um diese alternativen Teststämme auf ihre Eignung für das Ozontestverfahren zu überprüfen (siehe Kapitel 2.4 für Details). Da die eingesetzten Teststämme mit unterschiedlicher Spezifität gegenüber Mutagenen reagieren, können verschiedene Substanzklassen beurteilt werden. Somit erweitert sich der Kenntnisstand über potenzielle Umweltgefahren im Abstrom von Kläranlagen.

## 1.2 Projektbeschreibung

Zum Zeitpunkt der Projektausschreibung waren sieben ARA mit einer ausgebauten und laufenden Ozonung als EMV-Stufe in Betrieb. Das Konzept der Studie sah vor, diese sieben ARA jeweils bei optimaler (nitritarmer) Betriebslage zu beproben, aber auch bei suboptimalen, mit Nitrit  $>0.3 \text{ mgNO}_2\text{-N/L}$  im Zulauf Ozonung. Geplant waren insgesamt fünf Beprobungen bei erhöhten Nitritgehalten, da nur bei einigen Kläranlagen in den vergangenen Jahren Konzentrationen von mehr als  $0.3 \text{ mgNO}_2\text{-N/L}$  im Auslauf des Nachklärbeckens nachgewiesen werden konnten. Der milde Winter 2022-2023 begünstigte jedoch den Wirkungsgrad der Nitrifikation auf den ARA, so dass schlussendlich nur drei Probenahmen bei nitritreichen Bedingungen durchgeführt werden konnten. Dafür ermöglichte die Inbetriebnahme von zusätzlichen Ozon-Anlagen auf zwei weiteren ARA im Verlauf des Projekts die Realisierung von mehr Probenahmen als zuerst geplant. Tabelle 1 gibt einen Überblick über geplante und realisierte Untersuchungen .

**Tabelle 1: Geplante und realisierte Untersuchungen**

	Geplant	Realisiert
Anzahl ARA	7	9
Probenahme mit Nitrit < 0.3 mgNO <sub>2</sub> -N/L	7	12
Probenahme mit Nitrit > 0.3 mgNO <sub>2</sub> -N/L	5	3
Untersuchungen mit neuen YG-Stämmen	3 ARA	8 ARA

Die erste Messkampagne fand im Herbst 2022 statt, gefolgt von einer weiteren im Frühling 2023. Dabei wurden einige ARA zweifach, andere nur einmalig beprobt und mit unterschiedlichen Zielsetzungen bezüglich variablen Nitritgehalten oder umfangreicheren Ames-Tests. Details zu den untersuchten Kläranlagen sowie deren Betriebsdaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die zeitliche Verteilung und Häufigkeit der einzelnen Probenahmen.

Die drei realisierten Proben zum Vergleich zwischen nitritarmen und -reichen Bedingungen stammen von den ARA 2, 3 und 6. Die ARA 1, 4, und 7 wurden trotz tiefer Nitritkonzentrationen doppelt beprobt, um sie zusätzlich mit den YG-Stämmen zu untersuchen. Ausser bei ARA 8 wurden diese auf allen ARA angewendet.

**Tabelle 2: Betriebsdaten der ARA zur Zeit der Probenahmen**

(Quelle: [www.micropoll.ch](http://www.micropoll.ch)). Die Reihenfolge der ARA in weiteren Tabellen entspricht nicht dieser Auflistung.

Kläranlage <sup>1</sup>	Inbetriebnahme O <sub>3</sub>	Belastung [EW]	davon Einwohner [EW]	davon Industrie [EW]	Q <sub>mittel</sub> Trockenwetter [l/s]	Biologische Stufe	Volum O <sub>3</sub> [m <sup>3</sup> ]	Aufenthaltszeit O <sub>3</sub> Q <sub>TW</sub> [min]
Morgenthal + Hofen <sup>2</sup>	2021	160'000	88'000	72'000	460	Belebtschlamm mit Nitrifikation und Denitrifikation	907	16.8
Altenrhein <sup>3</sup>	2019	120'000			221	Belebtschlamm und Festbettbiologie	2 x 385	30 (1 Reaktor)
Werdhölzli <sup>2</sup>	2018	650'000	450'000	200'000	2'500	AI-Verfahren	4 x 1'535	40
Porrentruy <sup>2</sup>	2020	25'000	20'000	5'000	110	Belebtschlamm mit Nitrifikation und Denitrifikation	167	25
Neugut <sup>2</sup>	2014	105'000	50'000	55'000	200		530	37
Aadorf <sup>2</sup>	2022	27'000	19'000	8'000	150	AI-Verfahren	256	28.4
Bassersdorf <sup>2</sup>	2018	28'000	23'000	5'000	125	Belebtschlamm mit Nitrifikation und Denitrifikation	250	33
Reinach <sup>2</sup>	2016	45'000	30'000	15'000	240		2 x 180	25
Furthof <sup>2</sup>	2021	14'500	11'000	3'500	90	AI-Verfahren	295	55

<sup>1</sup> die Betriebsdaten stammen aus den Steckbriefen auf der VSA Plattform Verfahrenstechnik Mikroverunreinigung (<https://micropoll.ch/ara-ausbau/ozon/>)

<sup>2</sup> die gewählten ARA behandeln das Abwasser nach Ozonung mit einem Sandfilter

<sup>3</sup> ARA Altenrhein betreibt ein Kombi-Verfahren bestehend aus Ozonung + GAK-Filter

## 2 METHODEN

### 2.1 Probenahme

Alle Probenahmen fanden bei Trockenwetter statt und wurden durch die jeweilige ARA selbst durchgeführt. Sofern möglich wurden die Proben parallel zu den regelmässigen EMV-Proben genommen. Alle Proben wurden bei 4°C gelagert und per A-Post zu ENVILAB geschickt.

Die Probennummern wurden immer nach der folgenden Reihenfolge zugewiesen: Zulauf Ozonung, Auslauf Ozonung, Auslauf ARA.

**Tabelle 3: Bezeichnungen und Beschreibung der Proben für die Ames-Tests**

Kläranlage	Datum der Probenahme	Probennummer (Jahr)
ARA n°1	22.09.2022	5381 bis 5382 (2022)
	10.04.2023	1783 bis 1785 (2023)
ARA n°2	05.10.2022	5650 bis 5652 (2022)
	14.02.2023	0732 bis 0734 (2023)
ARA n°3	08.11.2022 (08:05 Uhr)	6355 bis 6357 (2022)
	08.11.2022 (15:35 Uhr)	6358 bis 6360 (2022)
ARA n°4	10.+11.10.2022	5763 bis 5765 (2022)
	20.04.2023	2026 bis 2028 (2023)
ARA n°5	06.10.2022	5699 bis 5701 (2022)
ARA n°6	28.03.2023	1528 bis 1530 (2023)
	03.04.2023	1634 bis 1636 (2023)
ARA n°7	23.01.2023	0369 bis 0371 (2023)
	04.05.2023	2163 bis 2165 (2023)
ARA n°8	17.11.2022	6485 bis 6487 (2022)
ARA n°9	20.04.2023	1964 bis 1966 (2023)

## 2.2 Analytik

Der gelöste, organische Kohlenstoff (DOC) wurde mittels thermischer Oxidation und nachgeschalteter Infrarot-Detektion (DIMATOC 2100) gemäss DIN EN 1484 bestimmt. Für die Ermittlung der Nitritgehalte wurden Küvetten-Tests (Hach-Lange) verwendet. Messungen von Bromid und dessen Oxidationsprodukt Bromat wurden mittels Ionenchromatographie (Bromid) und Flüssigchromatographie gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bei ENVILAB durchgeführt. Diese spezielle Methode ist höchst selektiv und erreicht niedrige Bestimmungsgrenzen für Bromat (0.5 µg/L).

Die Daten zur Reinigungsleistung bzgl. organischer Spurenstoffe der einzelnen ARA stammen aus deren EMV-Überwachung und wurden nicht gesondert für diese Studie erhoben. Sie sind deshalb nur für einen Teil der ARA bei ENVILAB und teilweise in anderen Vertragslabors erhoben worden und wurden für den Zweck dieser Studie zusammengetragen.

Die 12 organischen Spurenstoffe (Leitsubstanzen) wurden gemäss den definierten Verordnungen unter Verwendung einer hochspezifischen LC-MS/MS mit sMRM-Methode (*Scheduled Multiple Reaction Monitoring*) bestimmt<sup>1</sup>. Die Stoffe sind in zwei Kategorien aufgeteilt: Kategorie 1, sehr gut oxidierbare Substanzen; Kategorie 2, gut oxidierbare Substanzen. Das Verhältnis der sehr gut abbaubaren zu den gut abbaubaren Stoffen muss dabei 2:1 betragen. Der Reinigungseffekt von mindestens 80%, welcher in der schweizerischen GSchV gefordert wird, soll gegenüber Rohabwasser, also über die gesamte Kläranlage, bestimmt werden.

---

<sup>1</sup> Die Stoffauswahl basiert auf der departementalen Verordnung des UVEK (Eidgenössisches Departement für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation): „Überprüfung des Reinigungseffekts von Massnahmen zur Elimination von organischen Spurenstoffen bei Abwasserreinigungsanlagen“ in Anlehnung an die Gewässerschutzverordnung (GSchV, Stand 01.01.2016).



## 2.3 Festphasenextraktion

Für die Biotests wurden die Proben bei ENVILAB mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert. Dazu werden pro Probe 1000 mL des Abwassers mittels Festphasenextraktion über eine Waters Oasis® HLB-Kartusche aufkonzentriert, anschliessend eluiert und nach weiterer Einengung in 1 mL Dimethylsulfoxid aufgenommen. Diese Anreicherung entspricht einem Faktor von 1000. Für Proben zur Untersuchung mit TA98 und TA100 +/-S9 sowie YG1041/1042 und YG7108-Stämmen (in zwei unterschiedlichen Laboren), wurden zwei 1 mL Extrakte der gleichen Probe zusammengemischt und wieder aufgeteilt. Über das Projekt wurden neun Proben als Blindprobe (Reinstwasser) auf identische Weise behandelt.

Die Aufkonzentrierung erfolgt nach dem folgenden Schema:

Probe filtrieren (0.7µm Glasfaser)  
mit Salzsäure auf **pH-Wert 3** einstellen

1'000 mL Probe (Gravimetrisch)



Anreicherung auf **Oasis® HLB (6cc)**  
ca. 10mL / min

Konditionierung mit:  
2mL Hexan, 2mL Aceton, 3x2mL Methanol  
und 3x2mL Reinstwasser (pH 3)



Nach Anreicherung, Kartusche mit Luft trocknen lassen

Eluieren mit:  
4x1mL Aceton  
2x1mL Methanol



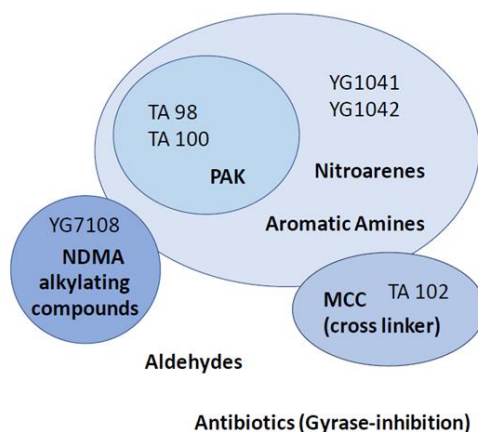
Unter N<sub>2</sub>-Fluss eindampfen bis zu wenige µL (max. 30°C), dann in **1mL** Dimethylsulfoxid (DMSO) aufnehmen



## 2.4 Biotests

Mit Biotests können spezifische, toxische Wirkungen von unbekanntem Substanzen im Abwasser ermittelt werden. Der Ames-Test bestimmt das mutagene Potenzial verschiedener Chemikalien resp. einer Mischung von Chemikalien. Die mittels Festphasenextraktion gewonnenen Extrakte (siehe voriger Abschnitt) wurden mit folgenden Biotests getestet, die von zwei unterschiedlichen Biotest-Laboren durchgeführt wurden:

- Ames-Test mit TA98 und TA100-Stämmen: Hier werden die *Salmonella typhimurium* Stämme TA98 (Frameshift-Mutation) und TA100 (Basenpaar Substitution) verwendet, mit und ohne metabolischer Aktivierung durch Kofaktoren (+/-S9-Mix). Die Beobachtung von Mutagenität ohne Zugabe von Kofaktoren bzw. ohne Aktivierung der Moleküle weist auf das Vorhandensein von Substanzen mit direkter Mutagenität hin. Diese Stämme werden aktuell für die Abklärung Verfahrenseinigungen Ozonung benutzt. Die Biotests wurden bei Xenometrix sowie auch der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) mit 20x Aufkonzentrierung durchgeführt.
- Ames-Test mit YG1041/1042 und YG7108-Stämmen: Hier werden *Salmonella typhimurium* Stämme der neuen Generation benutzt. Bei den YG1041 und 1042 handelt es sich um modifizierte TA98- resp. TA100-Stämme mit erhöhter Aktivität von Nitroreduktase und Acetyltransferase, die vor allem empfindlicher gegenüber Mutagenität von Nitroaromaten und aromatischen Aminen sind (Hagiwara, et al., 1993). Gegenüber TA98 und TA100 zeichnen sich diese Stämme insgesamt durch eine höhere Sensitivität gegenüber einer breiteren Stoffpalette aus. Der YG7108-Stamm ist dank der Expression von humanem Cytochrom P450 und humaner NADPH-Cytochrome P450 Reduktase hoch spezifisch und sehr empfindlich gegenüber alkylierenden Wirkstoffen (Yamada, et al., 1997; Fujita, et al., 2001). Alle Stämme wurden ebenfalls mit und ohne metabolische Aktivierung (+/-S9-Mix) verwendet. Experimente mit diesen Stämmen wurden ausschliesslich bei der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) mit 20x Aufkonzentrierung durchgeführt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ames-Stämme und den ihnen zugewiesenen Stoffgruppen. Quelle: Buchinger, 2022.**

## **3 RESULTATE**

### **3.1 Betriebsdaten und ergänzende Analytik**

Die Betriebsdaten der ARA zum Zeitpunkt der Probenahmen sowie die ergänzenden Abwasserparameter zu den jeweiligen Proben (gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Nitrit) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die Nitrit-kritischen Proben erreichen Konzentrationen zwischen 0.26 bis 0.81 mg NO<sub>2</sub>-N/L und decken somit ein breites Spektrum ab von leicht unter bis deutlich über dem Richtwert von 0.3 mg NO<sub>2</sub>-N/L.

Die spezifischen Ozondosen auf den beteiligten ARA liegen zwischen 0.4 und 1.1 gO<sub>3</sub>/gDOC (ohne Betrachtung der Ozondosis der ARA mit Kombi-Verfahren). Der damit bewirkte Abbau der organischen Spurenstoffe (zwischen 81% und 92%) war in jedem Fall ausreichend, um die Anforderungen der GSchV zu erfüllen.

Tabelle 4: Betriebsdaten der ARA zur Zeit der Probenahmen.

Kläranlage	Datum der Probenahme	Abwassermenge [m <sup>3</sup> /Tag]	Nitrit im Zulauf der Ozonung [mg NO <sub>2</sub> -N/L]	DOC im Zulauf der Ozonung [mg C/L]	Ozondosis [gO <sub>3</sub> /gDOC]	Temperatur im Zulauf O <sub>3</sub> [°C]	MV-Abbau 24/48h-Sammelprobe	Bromid im Zulauf der Ozonung [µg/L]	Bromat im Ablauf der Ozonung [µg/L]
ARA n°1	22.09.2022	35'760 / 20'701 <sup>B</sup>	0.028	5.6	0.59	18.5	91%	50	<0.5
	10.04.2023	31'580 / 19'657 <sup>B</sup>	0.074	5.4	0.61	12.5	81%	45	<0.5
ARA n°2	05.10.2022	Keine Angabe	<0.015	5.4	0.13	17.9	90%	nb	nb
	14.02.2023	Keine Angabe	0.26	13.4	0.10	13.1	86%	nb	nb
ARA n°3	08.11.2022 (08:05 Uhr)	139'394	0.14	6.2	0.73	16.8 (Auslauf ARA)	84%	37	1.0
	08.11.2022 (15:35 Uhr)		0.43	6.4	1.02				
ARA n°4	10.+11.10.2022	6'531	<0.015	3.8	0.79	16.5	86%	29	1.1
	20.04.2023	9'590	<0.015	3.3	0.91	13.2	92% <sup>D</sup>	12	1.1
ARA n°5	06.10.2022	14'470	<0.015	4.9	0.40	20	82% <sup>C</sup>	41	<0.5
ARA n°6	28.03.2023	Keine Angabe	0.81	6.3	0.79	11.9	nb	nb	nb
	03.04.2023	Keine Angabe	0.086	5.3	0.87	11.5	89%	11	1.7
ARA n°7	23.01.2023	6'379	<0.015	4.5	0.59	11.7	91%	32	1.1
	04.05.2023	8'404	<0.015	3.4	0.65	14.0	91% <sup>A</sup>	27 <sup>A</sup>	1.4 <sup>A</sup>
ARA n°8	17.11.2022	Keine Angabe	<0.015	6.4	0.63	15.1 (Auslauf ARA)	nb	nb	nb
ARA n°9	20.04.2023	5'920	0.027	3.7	0.80	13.3	90%	23	<0.5

nb: nicht bestimmt

<sup>A</sup>: Werte für die 48h-Sammelprobe vom 02.+03.05.2023

<sup>B</sup>: Abwassermengen von ARA 1a und ARA 1b

<sup>C</sup>: Werte für 24h-Sammelprobe

<sup>D</sup>: ohne Betrachtung von Benzotriazol (Zunahme nach der Ozonung); mit Benzotriazol nur 80% Eliminationsleistung

### 3.2 Ames-Tests

Die Resultate aller Ames-Tests sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Gut übereinstimmende Doppelbestimmungen zahlreicher Proben in beiden Test-Laboren (Xenometrix und BfG) sowie unauffällige Blind-Proben (Resultate nicht gezeigt) bekräftigen die Robustheit der Ergebnisse und schliessen durch Probenaufbereitung verursachte Mutagenität aus. Folgende Kriterien liegen der Auswertung zu Grunde:

- Die Basislinie wird anhand des Mittelwertes und der Standardabweichung der negativen Kontrollen berechnet, dabei werden die Resultate parallel (am gleichen Tag) angesetzter Proben gepoolt.  
Die Berechnung lautet wie folgt: Basislinie = Mittelwert + 1 St.Abw.  
Werte <1 werden auf 1 gestellt.  
**Werte > 2x Basislinie werden als verdächtig eingestuft.**
- Höher konzentrierte Probenextrakte lösen erwartungsgemäss einen grösseren Effekt aus (**Dosisabhängigkeit**).
- **Nur** bei Werten >2x Basislinie, die **zusätzlich** eine Dosisabhängigkeit aufzeigen, kann von einer Probe mit mutagenem Potential ausgegangen werden.

Der Abgleich von Ergebnissen aus dem gleichen Batch kann zudem weitere Informationen liefern. Neben der *mutagen/nicht mutagen* Beurteilung werden in diesem Bericht *Zunahme* (↑), *Abnahme* (↓) und *Nichtveränderung* (↔) der Mutagenität gekennzeichnet.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Resultate des Ames-Tests.

ARA		Nitrit [mgN/L]	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	YG1042-S9	YG1042+S9	YG7108-S9	YG7108+S9
ARA n°1	Zulauf O3	0.028										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	0.074										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°2	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	0.26										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°3	Zulauf O3	0.14										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	0.43										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°4	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°5	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°6	Zulauf O3	0.086										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	0.81										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°7	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°8	Zulauf O3	<0.015										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											
ARA n°9	Zulauf O3	0.027										
	Auslauf O3											
	Auslauf ARA											

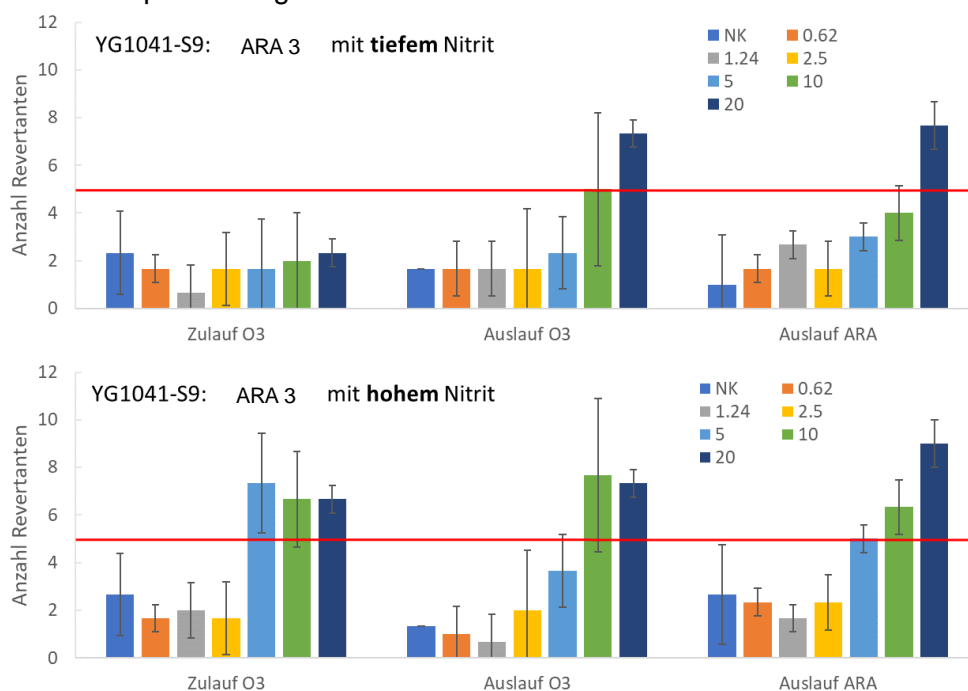
mutagen    
  nicht mutagen    
  Evtl. mutagen (>2x Baseline bei höchster Konz. aber keine klare Dosisabhängigkeit)    
 ↑ Zunahme    
 ↓ Abnahme    
 ↔ Unverändert

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Mit einer Ausnahme, zeichnen sich alle beteiligten Kläranlagen durch mutagenes Potential in mindestens einer Probe des Zulaufs zur Ozonung aus, welches meistens bereits mit der Ozonung abgebaut wird und nach der biologischen Nachbehandlung nicht mehr nachweisbar ist.

Bei vier der untersuchten Kläranlagen nimmt die Mutagenität durch die Ozonbehandlung für mindestens einen Stamm zu: Das sind die ARA 6 (TA98+S9), die ARA 7 und ARA 5 (beide YG7108-S9) sowie die ARA 3 (YG1041-S9, YG1042-S9 und YG7108-S9). Die biologische Nachbehandlungsstufe (Sandfilter) eliminiert diese mutagenen Effekte allerdings wieder. Einzige Ausnahme gänzlich ohne Abbau oder Reduktion ist die Kläranlage 3, wo die Mutagenität mit den verschiedenen Teststämmen sehr unterschiedlich zu bewerten ist. Bei alleiniger Betrachtung von Stamm YG1041+S9 scheint das mutagene Potential über die gesamte Kläranlage abgebaut zu werden. Die Tests mit den Stämmen YG1041-S9, YG7108-S9 und YG1042-S9 (nur bei hohem Nitrit) deuten jedoch eher verstärkte bzw. im besten Fall gleichbleibende Mutagenität im Abstrom der ARA an. Für die ARA 3 ist die Wasserqualität insgesamt daher schwer einzuschätzen.

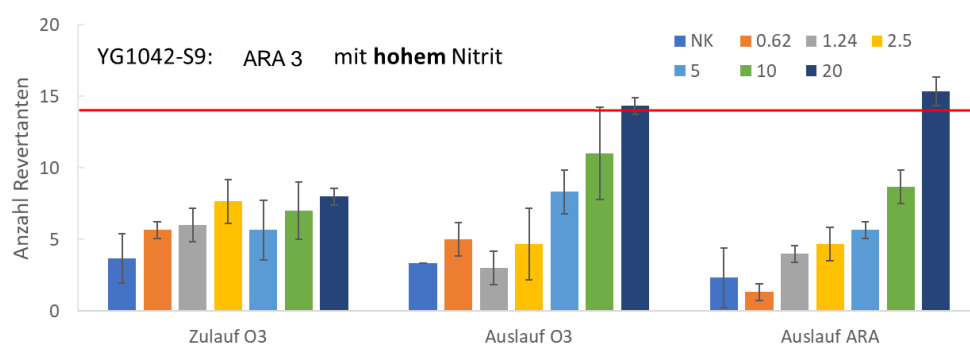


**Abbildung 3: Resultate des Ames-Tests mit dem Teststamm YG1041 ohne Kofaktor S9, bei tiefem und hohem Nitrit auf der ARA 3. Die rote Linie zeigt den Grenzwert für 2x Basislinie an.**

Obwohl der Stamm TA98 mehrmals mit und ohne S9-Aktivierung Mutagenität anzeigte, hat sich der Stamm YG1041 insgesamt als deutlich empfindlicher erwiesen. In mehreren Fällen konnten mit ihm mutagene Wirkungen erfasst werden, die mit den im Testverfahren verwendeten Stämmen nicht sichtbar waren. Einzig mit erhöhten Nitrit-Konzentrationen im Auslauf O<sub>3</sub> der ARA 6 hat der

Stamm TA98+S9 Mutagenität gezeigt, während YG1041+S9 nicht reagierte. Die Möglichkeit, die Veränderung des mutagenen Potentials entlang des Verfahrens zu verfolgen, hat sich als besonders wertvolle Einsatzmöglichkeit des Stammes YG1041 herausgestellt.

Der Stamm TA100 wurde weder mit noch ohne S9-Aktivierung ausgelöst und auch der empfindlichere Stamm YG1042 reagierte nur auf Proben der ARA 3. Wie bereits mit YG1041 beobachtet, zeigt auch YG1042 ohne S9-Aktivierung im Abwasser des Ablaufs der Ozonung und des Ablaufs des Filters ein mutagenes Potential auf, was abermals darauf hinweist, dass die verantwortlichen Mutagene im Sandfilter nicht oder nur teilweise abgebaut werden (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Resultate des Ames-Tests mit YG1042 ohne Kofaktor S9, bei hohem Nitrit auf der ARA 3. Die rote Linie zeigt den Grenzwert für 2x Basislinie an.**

Eine mutagene Wirkung mit dem Stamm YG7108 wurde im ozonierten Abwasser der ARAs 7, 5 und 3 bei nitritarmen und -reichen Bedingungen angezeigt. Die Mutagenität wurde jedoch in jedem Fall durch die biologische Wirkung des Sandfilters gut abgebaut (etwa Faktor 2).

Ob sich Nitrit auf die Bildung mutagener Effekte in der Ozonung auswirkt, lässt sich nicht abschliessend beurteilen. Die Datenlage ist nicht ausreichend dazu. Die Tendenz besteht aber, dass Abwasser mit erhöhten Nitritwerten auch tendenziell zu mutagenen Effekten führt. Bei Betrachtung der ARA 3 scheint die nitritreiche Probe mehr mutagene Effekte (Auslösung mehrerer Stämme) zu erzeugen. Während bei tiefen Konzentrationen von Nitrit (0.14 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L) die Bildung mutagener Nebenprodukte erst bei der Ozonung entstehen, ist bei nitritreichen Bedingungen (0.43 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L) bereits im Zulauf O<sub>3</sub> ein deutliches mutagenes Potential vorhanden, welches durch die Ozonung allerdings nicht weiter verschärft wird. Auch bei der ARA 2 ist mit TA98-S9 eine höhere Mutagenität im Zu- und Auslauf Ozonung gegenüber der nitritarmen Probe zu beobachten. Allerdings deutet die direkte mutagene Wirkung (ohne Zugabe von Kofaktor S9) auf TA98 im nitritreichen Zu- und Auslauf der Ozonung der ARA 2 eher auf eine unterschiedliche Wasserzusammensetzung und nicht auf Nitrit als Ursache des mutagenen Effekts hin. Diese Aussage wird durch den höheren DOC-Wert unterstützt und könnte auf eine refraktäre Abwasserkomponente als eigentliche Ursache hinweisen.



## 5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die TA-Stämme zeigen keine mutagene Effekte im Ablauf der ausgebauten ARA. Die Resultate auf den grosstechnischen Anlagen stimmen somit mit den Resultaten des Ozontestverfahrens gemäss der VSA-Empfehlung überein.

Der TA98 Stamm zeigt in sechs Proben im Zulauf zur Ozonung und vereinzelt auch nach der Ozonung an. Der TA100 Stamm deutete in keinem der untersuchten Fälle auf eine mutagene Wirkung hin, was sich mit den erhobenen Daten im Rahmen der Verfahrenseignung Ozonung deckt (Daten nicht gezeigt). Ob der TA100 Stamm weiterhin für die Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung verwendet werden soll, ist zu diskutieren.

Im Weiteren zeigte sich, dass die zusätzlich verwendeten Stämme YG1041 und 1042 sensitiver sind als die bisher verwendeten Stämme TA98 und 100. Das heisst wenn TA98 eine Mutagenität anzeigte, gibt auch der Stamm YG1041 an. Die Stämme YG1041 und 1042 zeigten aber in zusätzlichen Proben eine mutagene Wirkung an. Da die YG-Stämme noch nicht normiert sind, ist deren Einsatz im Rahmen der Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung noch abzuklären.

Nitrit-Werte über 0.2 mg N/L im Zulauf zur Ozonung könnten einen Einfluss auf die Bildung von mutagenen Verbindungen haben. Die Datengrundlage in diesem Projekt ist allerdings zu klein, um dies abschliessend zu beurteilen.

## 5.1 Empfehlung

Aus dieser Studie leiten sich folgende Aussagen, bzw. Empfehlungen für die Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung ab:

- Bei den Stufen 1 und 2 (Betriebsdaten) sollten möglichst auch die Nitrit-Konzentrationen in die Betrachtung einfließen.
- Bei der Stufe 4 (Biotest) können die neuen Stämme YG1041 und YG1042 eingeführt werden. Diese Stämme decken die gleichen mutagenen Effekte wie TA98 und TA100 ab, sind aber empfindlicher und breiter. Insbesondere hat der Stamm TA100 keine Mutagenität nachgewiesen und kann daher mit einer der neuen Stämme ersetzt werden.

## 5.2 Einschränkung der Interpretationsgültigkeit

Die obigen Aussagen beziehen sich auf die Untersuchungen der ARA von September 2022 bis Mai 2023. Es handelt sich in diesem Projekt um Stichproben, daher ist es möglich, dass einzelne Proben eine für die jeweilige Probenahme-stelle nicht repräsentative Abwasserzusammensetzung abbilden. Die Resultate können bei anderen Abwasserzusammensetzungen abweichen. Zudem ist der Datenumfang limitiert.

### ENVILAB AG

Analytik aus Leidenschaft



Alessandro Piazzoli

Leiter

Organische Spurenanalytik

0041 62 745 70 53

[alessandro.piazzoli@envilab.ch](mailto:alessandro.piazzoli@envilab.ch)



Samuel Christe

MSc. Umweltchemie und Ökotoxikologie

[samuel.christe@envilab.ch](mailto:samuel.christe@envilab.ch)

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abegglen, Christian und Siegrist, Hansruedi. 2012.** *Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser - Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen.* Bern : Bundesamt für Umwelt, 2012. Umwelt-Wissen Nr. 1214: 210S.
- Abegglen, Christian, et al. 2009.** *Ozonung von gereinigtem Abwasser - Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf.* Dübendorf : Eawag, 2009.
- Buchinger, Sebastian. 2022.** Use of diagnostic strains in the Ames-test - Background and application. *Workshop zu den Ökotoxikologischen Untersuchungen von ozonierten Abwässern.* s.l. : Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2022.
- Clemens von Sonntag, Urs von Gunten. 2012.** *Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment: From Basic Principles to Applications.* s.l. : IWA Publishing, 2012.
- Fujita, Ken-ichi, et al. 2001.** Construction of Salmonella typhimurium YG7108 strains, each coexpressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental and molecular mutagenesis.* 2001, Bd. 38. [10.1002/em.10034](https://doi.org/10.1002/em.10034)
- Hagiwara, Yuji, et al. 1993.** Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis.* 1993, Bd. 291, 3. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(93\)90157-U](https://doi.org/10.1016/0165-1161(93)90157-U)
- Koppe, Paul und Stozek, Alfred. 1998.** *Kommunales Abwasser: seine Inhaltsstoffe nach Herkunft, Zusammensetzung und Reaktionen im Reinigungsprozess einschliesslich Klärschlämme.* Vulkan; Auflage: 4 (30. Dezember 1998) : s.n., 1998.
- Krauss, Longrée, Hollender. 2009.** Nitrosamines - a water safety risk? *Eawag News.* 2009, 66e.
- Lee, Minju, et al. 2013.** Analysis of N-nitrosamines and other nitro(so) compounds in water by high-performance liquid chromatography with post-column UV photolysis/Griess reaction. *Water Research.* 4893 - 4903. 47 2013.
- Manasfi, Tarek, et al.** "In Vorbereitung".
- Margot J., Kienle C., Magnet A., Weil M., Rossi L., de Alencastro L.F., Abegglen C., Thonney D., Chèvre N., Schärer M., Barry D.A. 2013.** Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? *Science of the Total Environment.* 2013, Bde. 461-462: 480-498.
- Oekotoxzentrum, Eawag-EPFL. 2016.** *Environmental Quality Standard (EQS) - Vorschlag des Oekotoxzentrums für: Bromat.* 2016.
- Wunderlin, Pascal. 2021.** *Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung.* [pdf] s.l. : VSA, 2021.
- Wunderlin, Pascal, et al. 2015.** Behandelbarkeit von Abwasser mit Ozon - Testverfahren zur Beurteilung. *Aqua & Gas.* 7/8, 2015.

**Yamada, Masami, et al. 1997.** New tester strains of Salmonella typhimurium lacking O6-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to mutagenic alkylating agents. *Mutation Research/Fundamenta and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997, Bd. 381, 1. [10.1016/s0027-5107\(97\)00139-5](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00139-5)

**Zietzschmann, Frederik, et al. 2018.** *TestTools - Entwicklung und Validierung von schnellen Testmethoden zum Spurenstoffverhalten in technischen und natürlichen Barrieren des urbanen Wasserkreislaufs*. Berlin : TU Berlin, 2018.

