

SCHLUSSBERICHT (zum internen Gebrauch)

Evaluation von Verfahren zur Entfernung von Mikroverunreinigungen aus dem Abwasser mittels Suspect- und Non-target-Screening - Ozon, Aktivkohle und Kombiverfahren (SCREEN-O3TP)

Im Auftrag des Bundesamts für Umwelt BAFU
Vertrags-Nr.: 00.0102.PZ / P403-1651
Projektdauer: 10.2016 – 11.2020

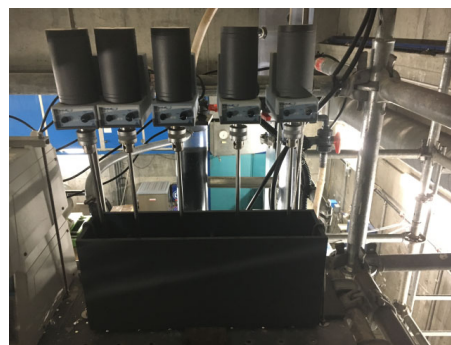


Bild: GAK-Kolonnen auf ARA Glarnerland (links), GAK Filter auf ARA Altenrhein (rechts oben), PAK-Zudosierung auf ARA ProReno (rechts unten)

Christa S. McArdell, Jennifer E. Schollée, Juliane Hollender, Rebekka Gulde, Urs von Gunten, Cornelia Kienle

Dübendorf, Juni 2021

Eawag: Das Wasserforschungs-Institut des ETH-Bereichs

Herausgeber:

Eawag, Dübendorf

Ueberlandstrasse 133, CH-8600 Dübendorf, Schweiz, www.eawag.ch, info@eawag.ch

Auftraggeber:

Bundesamt für Umwelt, BAFU

Begleitung durch Saskia Zimmermann-Steffens

Autoren:

Christa S. McArdell, Eawag, Dübendorf

Jennifer E. Schollée, Eawag, Dübendorf

Juliane Hollender, Eawag, Dübendorf

Rebekka Gulde, Eawag, Dübendorf

Urs von Gunten, Eawag, Dübendorf

Cornelia Kienle, Oekotoxzentrum, Dübendorf

Analysen und Aufbereitung Ergebnisse (neben Autoren):

Theocharis Sideris, Eawag, Dübendorf

Sophie Bogler, Eawag, Dübendorf

Christelle Oltramare, Eawag, Dübendorf

Baptiste Clerc, Eawag, Dübendorf

Moreno Rutsch, Eawag, Dübendorf

Andrea Schifferli, Oekotoxzentrum, Dübendorf

Dimitrios Spiliotopoulos, Xenometrix AG, Allschwil

Sergio Santiago, Soluval Santiago, Couvet

Weitere Fachliche Begleitung:

Heinz Singer, Eawag

Marc Böhler, Eawag

Adriano Joss, Eawag

Etienne Vermeirssen, Oekotoxzentrum

Thomas Wintgens, ehemals FHNW

Michael Thomann, ehemals Holinger AG

Roberto Frei, Betriebsleiter ARA ProReno

Klaus Biermann, Betriebsleiter ARA Glarnerland

Christoph Egli, Betriebsleiter ARA Altenrhein

Danksagung:

Die Autoren danken den Betreibern der Pilotanlagen und den Projektpartnern für die Probenahme: Kläranlage Pro Reno im Rahmen des Projekts „Aktifilt Plus“ (Roberto Frei, Selina Jörg, Sebastien Burtschy und Sandra Henneberger von der ARA, Thérèse Krahnstöver und Prof. Dr. Thomas Wintgens, ehemals FHNW, Fachhochschule Nordwestschweiz); Kläranlage Altenrhein (Christoph Egli und Rolf Peng von der ARA und Michael Thomann, ehemals Holinger AG); Kläranlage Glarnerland (Klaus Biermann von der ARA, Julian Fleiner, Simon Mangold, Christelle Oltramare, Antonio Hernandez und Marc Böhler, Eawag); Kläranlage Neugut (Max Schachtler, Nathalie Hubaux). Im weiteren danken wir Christelle Oltramare, Marc Bourgin, Rebekka Teichler, Theocharis Sideris und Sophie Bogler für ihre Messungen von Zielsubstanzen, Cresten Mansfeldt für die Entwicklung der Funktion zur Imputation fehlender Werte, Elisabeth Salhi für die Einführung in Ozonungsversuche und Michele Stravs, Sabine Anliker, und Karin Kiefer für fachliche Unterstützung. Weitere finanzielle Unterstützung innerhalb dem Projekt TRANSFO₃RM verdanken wir der Wasserversorgung Zürich (WVZ) und der Eawag (discretionary fund).

Information / Kontakt:

Christa S. McArdell, Eawag, christa.mcardell@eawag.ch

Juliane Hollender, Eawag, juliane.hollender@eawag.ch

Inhalt

KURZFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Hintergrund	3
1.2 Ziele des Projektes und Vorgehensweise	5
2 PILOTANLAGEN UND ANALYSEN	6
2.1 Abwasserreinigungsanlagen und Probenahmen	6
2.2 Non-target Analyse	8
2.3 Detektion der OTPs von 87 MVs	9
2.4 Screening nach vorhergesagten OTP	9
2.4.1 Durchführung und Messung der Laborexperimente	9
2.4.2 LC/HRMS/MS Datenanalyse und Aufklärung der OTP Struktur	10
2.5 Ökotoxikologische Biotests	10
2.5.1 Messprogramm und Probenvorbereitung	10
2.5.2 Ames-Fluktuationstest	11
2.5.3 Kombiniertes Algentest	11
2.5.4 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	11
3 RESULTATE	12
3.1 Verhalten der Gesamtheit von Stoffen in der Abwasserbehandlung	12
3.1.1 Methodenentwicklung zur Auswertung von Non-target Analysen	12
3.1.2 Durchschnittliche Elimination	12
3.1.3 Elimination grösser als 80%	14
3.1.4 Industrie-Chemikalien	17
3.2 Beurteilung der Abwasserbehandlung mit Biotests	18
3.2.1 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	18
3.2.2 Kombiniertes Algentest	18
3.2.3 Ames-Fluktuationstest	20
3.3 Ozonungs-Transformationsprodukte (OTPs) und deren Verhalten in der Abwasserbehandlung	23
3.3.1 Verhalten von Non-target OTP Signalen	23
3.3.2 Verhalten von OTPs von bekannten MVs	23
3.3.3 Screening nach vorhergesagten OTPs aus « <i>in silico</i> » Fragmentierung	25

4	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG.....	30
4.1	Evaluierung der Abwasserbehandlungsstufen mit der Non-target Analytik	30
4.2	Evaluierung der Abwasserbehandlungsstufen mit Biotests	31
4.3	Ozonungs-Transformationsprodukte und deren Verhalten in der Nachbehandlung..	32
4.4	Probleme im Projekt und Output	33
Abbildungen		34
Tabellen.....		35
Literatur		36

Abkürzungen

AOC	Assimilable Organic Carbon - assimilierbarer organischer Kohlenstoff
AR	ARA Altenrhein
ARA	Abwasserreinigungsanlage
BAFU	Schweizerisches Bundesamt für Umwelt
BIO	Ablauf der biologischen Behandlung
BEQ	Biologische Äquivalenzkonzentration
BV	Bettvolumina: durchgesetztes Abwasservolumen pro Filterbettvolumen
DEQ	Diuron-Äquivalenzkonzentration
DOC	Disolved organic carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)
DOM	Disolved organic matter (gelöstes organisches Material)
Eawag	Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz
EBCT	Empty bed contact time, Leerbettkontaktzeit: Filterbettvolumen dividiert durch Durchfluss
EFF	Ablauf der Kläranlage
EW	Einwohnerwerte
GAK = GAC	Granulierte Aktivkohle, Ablauf der GAK-Filtration
GL	ARA Glarnerland
GSchV	Gewässerschutzverordnung (Schweiz)
GSchG	Gewässerschutzgesetz (Schweiz)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
MV	Mikroverunreinigung, Spurenstoff
NG	ARA Neugut
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LS	Leitsubstanzen: 12 Indikatorstoffe zur Beurteilung der MV-Elimination (GSchV)
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HILIC	Flüssigchromatographie mit hydrophiler Wechselwirkung
NKB	Nachklärbecken
O ₃	Ozon
O3-PPD	Vorhersagemodell für OTPs (Lee et al. 2017)
OTP	Ozonungs-Transformationsprodukt
OZO/OZ	Ablauf der Ozonung
PAK = PAC	Pulveraktivkohle
PAK+SF	Pulveraktivkohle dosiert auf einen Sandfilter
PR	ARA ProReno
RPLC	Umkehrphase Flüssigchromatographie (reverse phase liquid chromatography)
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
TEQ	Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration

Kurzfassung

Für die erfolgreiche Entfernung von Mikroverunreinigungen (MVs) aus Abwasser ist eine weitergehende Abwasserbehandlung notwendig. Die Behandlung mit Ozon oder mit Pulveraktivkohle hat sich bewährt, und mehrere Kläranlagen in der Schweiz sind bereits mit diesen Technologien ausgerüstet. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch die granulierten Aktivkohle oder die Kombination von einer Vorozonung mit Aktivkohle-Behandlung interessante Technologien sein können, um MVs effizient und kostengünstig zu entfernen. Diese Technologien sind jedoch noch nicht im Detail untersucht. Ausserdem stellt sich die Frage, wie gut die «Gesamtheit» von MVs damit entfernt wird. Gemäss Gesetz werden zwölf Leitsubstanzen (12LS) für die Evaluierung der Verfahren herangezogen. Die quantitative Erfassung einer grossen Anzahl an MVs ist sehr aufwändig und kostspielig. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung der non-target Analytik, mit welcher die Gesamtheit der organischen Substanzen im Abwasser erfasst wird, die jedoch nicht nur MVs, sondern auch Matrixbestandteile umfasst. Inwieweit sich diese Methodik für die Abwasserbeurteilung eignet wurde jedoch bisher kaum untersucht. Zudem bestehen bei der Ozonung Wissenslücken bezüglich der entstehenden Ozonungs-Transformationsprodukte (OTPs) und deren Elimination in der Nachbehandlung, sei das in einem Sandfilter oder mit Kohlebehandlungen. Komplementär zur chemischen Analytik haben sich in bisherigen Studien ökotoxikologische Biotests als vielversprechend und relevant für die Evaluation von weitergehenden Reinigungsstufen erwiesen. Mit Biotests kann auch evaluiert werden, ob problematische Stoffe z.B. in der Ozonung entstehen und ob diese durch weitergehende Behandlungen wieder eliminiert werden können.

Dieses Projekt hatte deshalb zum Ziel, Abwasserbehandlungsstufen mit Ozon gefolgt von Aktivkohlebehandlung oder nur mit granulierter Aktivkohle-Filtration durch Non-target Analytik und ökotoxikologische Biotests zu evaluieren. Im Weiteren sollte mit einem gezielten Suspect Screening nach OTPs gesucht und deren Verhalten in der Nachbehandlung untersucht werden. Für die Probenbeschaffung wurden Synergien mit laufenden Projekten auf den drei Kläranlagen ProReno, Glarnerland und Altenrhein genutzt.

Für die Evaluierung des Verhaltens der Non-target Substanzen über die verschiedenen Abwasserbehandlungsstufen wurde eine automatisierte Methode unter Anwendung der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-LCMS) entwickelt, welche viele falsch-positive Signale und einen Teil der Signale der Matrix-Komponenten (homologe Reihen) ausschliesst. Die so identifizierten Non-target Substanzen vom Zulauf wurden in den Reinigungsstufen stark reduziert, wobei sich dort aber viele neue Substanzen bildeten. Diese machten im Ablauf der Kläranlage rund die Hälfte der Non-target Substanzen aus. Zwei verschiedene Auswertungsmethoden (durchschnittliche Elimination vs. Elimination grösser als 80%) erzielten sehr ähnliche Ergebnisse. Viele Non-target Substanzen vom Zulauf wurden bereits in der Biologie sehr gut entfernt (durchschnittlich >77%), und die verschiedenen untersuchten Nachbehandlungsstufen zeigten in den vorhandenen Proben relativ kleine Unterschiede. Aussagekräftiger war die Auswertung der Signale einer Auswahl von 66 bekannten, abwasserrelevanten Mikroverunreinigungen (66MV). Die 66MV & 12LS verhielten sich recht ähnlich. In der biologischen Stufe wurden beide im Durchschnitt zu weniger als 40% eliminiert. Dies deutet darauf hin, dass viele der Non-target Substanzen matrixbezogene Verbindungen sind und/oder dass die Auswahl der 66MV auf Verbindungen ausgerichtet wurde, die während der biologischen Behandlung persistent sind. Die durchschnittliche Elimination der 66MV&12LS zeigte eine Abhängigkeit von der Ozondosierung (20-60% mit 0.2-0.3 gO₃/gDOC),

und von der Laufzeit des GAK-Filters (90-60% bei 8'000-48'000 Bettvolumen). Zudem ergab sich eine schwache Abhängigkeit von der PAK-Dosierung (60-80% mit 7.7-12.5 mg/L PAK). Insgesamt wurde eine durchschnittliche Elimination von mehr als 80% über die gesamte ARA in allen Proben für die Non-target Substanzen und die Auswahl an MVs erreicht, ausser beim GAK-Filter ohne Vorozonung, wo die 66MV und 12LS nur bis 17'000 BV zu >80% entfernt wurden.

Die Resultate zeigen, dass mit der Non-target Analytik die verschiedenen Verfahren nur bedingt evaluiert werden können. Aussagekräftiger war jedoch die Auswertung der 66MV. Für diese Stoffe, die nur schlecht biologisch abgebaut wurden, erhöhte die weitergehende Behandlung die Elimination über die ganze ARA signifikant, sehr ähnlich wie für die 12LS. Die Behandlung mit Vorozonung und Aktivkohle erscheint als vielversprechende Verfahrenskombination, insbesondere die Kombination mit einem GAK-Filter, der auch bei 48'000 Bettvolumen noch eine signifikante Eliminationsleistung erzielte. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen aus den breit angelegten Pilotprojekten mit GAK-Filtern auf den ARA Furt/Bülach und Glarnerland.

Die Proben der ARA ProRhenno ermöglichten mit der Non-target Analytik die Bestimmung von 54 industriell eingetragenen Substanzen, die alle in der biologischen und weitergehenden Abwasserbehandlung zu >97% entfernt wurden.

Die durchgeführten Biotests brachten wichtige zusätzliche Erkenntnisse, v.a. in Bezug auf Mutagenität und Algentoxizität. Auf der ARA Glarnerland waren diese Messungen zentral für die Entscheidung gegen die Wahl einer Ozonung. An diesem Standort wurde nach der Ozonung eine sehr hohe Mutagenität festgestellt, die jedoch über die GAK-Filter wieder entfernt wurde. Diese Toxizität rührte wohl von Industriechemikalien her, die jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die Identifikation der Stoffe bzw. Stoffmischungen, die für die Wirkung verantwortlich sind, ist, je nach gewähltem Biotest, schwierig. Bei bestimmten Wirkungen, wie z.B. der Hemmung der Photosynthese durch Herbizide, können die verantwortlichen Stoffe teilweise identifiziert werden (z.B. Diuron verantwortlich für Algentoxizität auf ARA Glarnerland).

Ozonungs-Transformationsprodukte wurden mit drei verschiedenen Methoden identifiziert. Mit der Non-target Analytik wurden 1911 in der Ozonung entstehende Non-target Substanzen gefunden, die wohl mehrheitlich Transformationsprodukte der Matrix darstellen. In einem zweiten Ansatz konnten 36 OTPs von 50 MVs identifiziert werden, die als OTPs mit einem Vorhersagemodell (O3-PPD) anhand erwarteter Reaktionsmechanismen mit Ozon vorhergesagt wurden. In einem dritten Ansatz konnten Synergien zu einem parallel laufenden Projekt (TRANSFO₃RM) genutzt werden, in welchem OTPs zuerst in Laborexperimenten identifiziert wurden. 83 OTPs wurden sowohl in den Laborexperimenten wie auch in Abwasserproben gefunden, und für diese OTPs konnten chemische Strukturen vorgeschlagen werden. Mit allen drei angewandten Methoden konnten bisher unbekannte OTPs detektiert werden. Diese können in zukünftigen Studien verwendet werden, um die Mechanismen der OTP-Bildung während der Ozonung besser zu verstehen und sowohl Ozon- als auch Hydroxylradikal-Reaktionen einzubeziehen, und somit Vorhersagetools zu verbessern.

Der Verbleib von 56 verifizierten OTPs von 40 spezifischen MVs wurde in den verschiedenen Nachbehandlungsstufen untersucht. Die OTPs waren mehrheitlich stabil im Sandfilter, zeigten eine mittlere Elimination im GAK-Filter abhängig von der Anzahl durchlaufener Bettvolumen, wobei bei 48'000 BV immer noch 23% entfernt wurden, und wiesen die beste Elimination mit einer Dosierung von 13 mg/L PAK auf einen Sandfilter auf. Die Kombination einer Vorozonung mit Aktivkohlebehandlung zeigte sich also als vielversprechende Abwasserbehandlungsmethode für die Entfernung von OTPs.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Mit der Revision des Schweizer Gewässerschutzgesetz (GSchG) und der Gewässerschutzverordnung (GSchV) vom 1. Januar 2016 wurde die Grundlage gelegt, um ausgewählte Abwasserreinigungsanlagen mit einer zusätzlichen Stufe zur Elimination von Mikroverunreinigungen (MVs) auszubauen, da die biologische Behandlung MVs nicht effizient eliminiert (Abegglen & Siegrist 2012, Falas et al. 2016, Bourgin et al. 2018).

Aktuell stehen zwei weitergehende Verfahren zur Entfernung von MVs zur Auswahl. Ozonung (gefolgt von einem Sandfilter (SF)) oder Pulveraktivkohle (PAK) sind etablierte Methoden, für welche ähnliche Kosten berechnet wurden. In Pilotprojekten auf den ARAs Furt/Bülach (Böhler et al. 2020a) sowie der ARA Glarnerland (McArdell et al. 2020) wurden auch granuliert Aktivkohle (GAK) und Kombiverfahren (Ozonung und AK) als mögliche Verfahren evaluiert. Diese Untersuchungen und auch Resultate mit GAK in Deutschland (Benstöm et al. 2016a&b, Benstöm 2017, Fundneider 2020) weisen darauf hin, dass bei genug hohen Aufenthaltszeiten des Abwassers im GAK-Filter Standzeiten erreicht werden können, die mit dem Gebrauch an Kohle bei PAK-Anwendungen verglichen werden können und dadurch konkurrenzfähig werden (Böhler et al. 2020b).

Nicht jedes Abwasser eignet sich für die Behandlung mit Ozon (siehe Ozontestverfahren, Wunderlin et al. 2015, Schindler Wildhaber et al. 2015, Wunderlin et al. 2017, Grelot et al. 2020). Daher muss die Eignung des Abwassers für diese Behandlung vorab mit einem modularen Konzept evaluiert werden. Messungen der Stabilität von Ozon und die Eliminationseffizienz ausgewählter Stoffe zeigen auf, ob das Abwasser eine «normale» kommunale Abwassermatrix aufweist. Wenn die Messungen von den Werten in anderen kommunalen Abwässern abweichen, deutet dies darauf hin, dass andere Stoffe in der Abwassermatrix in signifikanten Mengen vorkommen, wie es zum Beispiel bei Industrieinträgen der Fall sein kann. Dann ist Vorsicht geboten, weil oft nicht bekannt ist, welche Stoffe vorhanden sind bzw. je nach industrieller Produktion dazukommen und unklar ist, wie diese Industriechemikalien mit Ozon reagieren. Auch bestehen grosse Wissenslücken bezüglich der Bildung von Nebenprodukten aus Abwassermatrix und Ozonungs-Transformationsprodukten (OTPs) aus MVs. Gemäss Testverfahren müssen bekannte Ozonungs-Nebenprodukte, Bromat und Dimethylnitrosamin (NDMA), untersucht, und ökotoxikologische Biotests durchgeführt werden.

Überprüft werden die Verfahren durch die Messung von zwölf Leitsubstanzen (12LS), die schweizweit vorkommen und sich gut, einfach und robust messen lassen. Durch die Einhaltung des Reinigungseffektes von 80%, gemessen anhand dieser Leitsubstanzen, wird ein optimaler Betrieb der Verfahren zur Elimination von MV erreicht, der repräsentativ für eine Bandbreite von MV ist. In diversen Projekten (Labor-, Pilot- und Grossmassstab-Versuche) wurden weitere MV untersucht (z.B. Otto et al. 2014, Boehler et al. 2012, Bourgin et al. 2018) und auch in einem Bericht zusammengetragen (Lee & von Gunten, 2018). Eine sehr breite Messkampagne wurde auf der ARA Neugut mit einer Ozonung durchgeführt (Bourgin et al. 2018, Böhler et al. 2017a&b). Dort wurde ein quantitatives Screening von 550 Substanzen (Arzneimittel, Pflanzenschutzmittel, weitere Chemikalien und bekannte biologische Abbauprodukte) mit zwei 48 Std. Sammelproben durchgeführt, wobei 175 Substanzen im Zulauf gefunden wurden (d.h. in Konzentration grösser als die Bestimmungsgrenze, >LOQ). Bei der empfohlenen spezifischen Ozondosis von 0.55 gO₃/gDOC wurden die 12LS zu 87% in der Ozonung und 88% über die ganze ARA eliminiert.

Die 175 detektierten Substanzen wurden über die ganze ARA im Durchschnitt zu >79% (median >89%) eliminiert, wobei der Sandfilter keine signifikante Elimination zeigte. In der Biologie betrug die durchschnittliche Elimination 34% (median 22%), und in der Ozonung >67% (median >74%). Bei der gewählten Ozondosis wurde also im Durchschnitt eine mittlere Elimination von rund 80% der ausgewählten grossen Gruppe von MVs erreicht. Die durchschnittliche Elimination in der Biologie war, wie bereits früher für eher persistente MVs festgestellt, nur gut 30%. Eine solche quantitative Analyse ist jedoch sehr aufwändig. Ausserdem muss beachtet werden, dass die Auswahl der MVs spezifisch auf Substanzen beruht, die in der Biologie eher stabil sind.

Es bestehen dadurch weiterhin Wissenslücken zum Verhalten der Gesamtheit von MVs während der Abwasserreinigung. Eine Möglichkeit zur Erfassung der Gesamtheit von Stoffen ist die Non-target Analytik mit Flüssigchromatographie gekoppelt an die hochauflösende Massenspektrometrie (LC-HRMS), wobei die Intensität von Signalen angeschaut wird, da keine Quantifizierung möglich ist. Die Intensität kann jedoch als ungefähres Proxy für die Konzentration betrachtet werden. Damit werden jedoch neben den MVs auch die Bestandteile der Matrix erfasst. Für die Aufbereitung der Proben ist meist eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) nötig. Hiermit kann ein Grossteil, jedoch nicht alle, der im Abwasser vorhandenen Stoffe angereichert werden und ein Teil der Matrix wird abgetrennt. Mit der in diesem Projekt angewendeten nachfolgenden Auftrennung mittels reverse-phase (RP) LC Säule werden sehr polare Substanzen nicht erfasst. Im Anschluss an die Auftrennung erfolgt eine Elektronenspray-Ionisierung (ESI), die ebenfalls einen Grossteil, jedoch nicht alle, der Substanzen ionisiert und dadurch detektierbar macht. So wird durch die angewendete Methodik ((SPE)-RP-LC-ESI-HRMS) eine grosse Palette an MVs, wie z.B. viele Pharmazeutika und Biozide, aber nicht alle Substanzen erfasst.

In der Ozonung werden die MVs in der Regel nicht mineralisiert. Es werden dabei OTPs mit mehr oder weniger ähnlichen Strukturen gebildet, die jedoch mehrheitlich unbekannt sind. Zur Detektion von OTPs kann die Non-target Analytik verwendet werden, wobei jedoch auch Nebenprodukte der Ozonung aus der Hintergrundmatrix erfasst werden (Schollée et al. 2018). Eine Zuordnung der Signale zu chemischen Strukturen bzw. zur Herkunft der OTPs ist damit jedoch schwer. Eine Alternative ist die Suche nach in Laborversuchen gefundenen OTPs von einzelnen MVs (z.B. Zimmermann et al. 2012; Borowska et al. 2016). Der analytische Nachweis von OTPs wird normalerweise für Einzelsubstanzen mit LC-HR-MS/MS durchgeführt, aber ist sehr aufwändig und meist nicht quantitativ, weil keine Standards vorhanden sind. Die Interpretation von MS/MS-Spektren zusammen mit Expertenwissen ermöglicht es aber, die chemische Struktur der OTPs zu ermitteln. Eine weitere Hilfe können Vorhersagemodelle sein (z.B. O3-PPD, entwickelt in der Gruppe von U. von Gunten; Lee et al. 2017), mit welchen einzelne OTPs anhand erwarteter Reaktionsmechanismen für bestimmte MV vorhergesagt werden können und nach diesen gesucht werden kann.

Die Kombination von Ozonung mit Aktivkohle könnte trotz höheren Investitionskosten interessant sein. Wissenslücken bei Kombiverfahren bestehen vor allem darin, dass nicht bekannt ist, in wie fern eine nachgeschaltete Aktivkohlebehandlung die entstandenen OTPs zu eliminieren vermag.

Zur Beurteilung der Qualität des Abwassers (inkl. Nebenprodukten und OTPs) können ökotoxikologische Biotests eingesetzt werden (Kienle et al. 2015). *In-vivo*-Biotests mit ganzen, mehrzelligen Organismen können Effekte der Gesamtheit der im Abwasser vorhandenen Stoffe erfassen, auf welche die Testorganismen empfindlich sind. Dahingegen ermöglichen *in-vitro*-Biotests die Evaluierung von Stoffgruppen mit gleichen Wirkmechanismen, die spezifische

Wirkungen wie z.B. Mutagenität oder Photosynthese-Hemmung auslösen. Die Empfindlichkeit unterscheidet sich je nach eingesetztem Testorganismus/Biotest. Zur Untersuchung weitergehender Abwasserreinigungsverfahren kann eine Probenanreicherung nötig sein. Biotests können u.a. komplementär zur chemischen Analytik eingesetzt werden und liefern wichtige Zusatzinformationen für die Entscheidung für oder gegen eine Reinigungstechnik.

1.2 Ziele des Projektes und Vorgehensweise

Dieses Projekt hatte daher die folgenden Ziele:

1. *Evaluierung der Behandlungsstufen durch Non-target Analytik und Biotests:*

In diesem Projekt sollte die Non-target Analytik angewandt werden, um das Verhalten der Gesamtheit von Stoffen im Abwasser über die verschiedenen Stufen der Abwasserbehandlung inklusive erweiterter Abwasserbehandlung mit Ozon und/oder Aktivkohle zu charakterisieren. Als Schwerpunkt sollten dabei Standorte mit einer gewissen industriellen Belastung untersucht werden. Ergänzend wurden Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität herangezogen.

2. *Screening nach Ozonungs-Transformationsprodukten und deren Verhalten in der Aktivkohlebehandlung:*

Des Weiteren sollte gezielt mit einem Suspect-Screening nach Transformationsprodukten der Ozonung gesucht und deren Verhalten in der nachfolgenden Behandlung mit Aktivkohle (PAK, GAK) untersucht werden. Die Resultate leisten einen Beitrag zur Verfahrensevaluation der erweiterten Abwasserbehandlung, insbesondere in Bezug auf die Bildung von OTPs und deren Elimination in einer nachfolgenden Aktivkohlebehandlung.

Während in einem früheren Projekt die Ozonung mit nachfolgender Sandfiltration durch die Non-target Analytik evaluiert wurde (Schollée et al. 2018), sollte hier die Kombination einer Teilozonung mit nachfolgender Aktivkohlebehandlung, bzw. die reine Aktivkohle-Filtration, im Fokus stehen. Dafür wurden Synergien mit laufenden Projekten genutzt, in welchen bereits grosstechnische Versuche in Pilot- bzw. Vollmassstab durchgeführt wurden. Hierbei konnten für dieses Projekt zusätzliche Proben genommen werden. Auf den ARA Glarnerland und der Altenrhein wurden granulierten Aktivkohlefilter (GAK-Filter) mit Vorozonung betrieben, auf der ARA Glarnerland parallel auch GAK-Filter ohne Vorozonung. Im Pilotprojekt auf der ARA ProReno wurden Versuche zur Vorozonung mit nachfolgender Behandlung mit Pulveraktivkohle, welche auf einen Sandfilter dosiert wurde, bei verschiedenen Dosierungen von Ozon und PAK durchgeführt. Die quantitative Messung von ausgewählten MVs, insbesondere der Leit-substanzen, wurde in den jeweiligen Projekten durchgeführt, sodass das Projekt hier auf die Non-target Analytik fokussieren konnte. Ausgewählte Proben wurden zudem mit drei relevanten Biotests zur Beurteilung der Qualität des Abwassers untersucht.

Für die Identifikation von Ozonungs-Transformationsprodukten wurden verschiedene Ansätze gewählt. Einerseits wurde die Non-target Analytik angewendet, um Signale auszufiltern, die in der Ozonung entstehen. Andererseits wurde ein Suspect Screening nach «bekannten» OTPs durchgeführt. Dieses Suspect Screening wurde durch die Zusammenarbeit mit dem Projekt «TRANSFO₃RM» möglich, in welchem in Laborversuchen gezielt nach OTPs gesucht wurde, die in der Ozonung von ausgewählten 87 MVs in Abwasser entstehen. In einem weiteren Ansatz wurde nach OTPs gesucht, welche durch das Vorhersagemodell O3-PPD (Lee et al. 2017) vorhergesagt wurden. Dafür wurden Laborexperimente mit Zudosierung von ausgewählten MVs in Abwasserproben durchgeführt. Das Verhalten all dieser OTPs wurde dann in den Nachbehandlungen untersucht.

2 Pilotanlagen und Analysen

2.1 Abwasserreinigungsanlagen und Probenahmen

Die Proben wurden in vier Kläranlagen in der Schweiz bei überwiegend trockener Witterung entnommen, die meist mit biologischer Behandlung im Vollmaßstab und weitergehender Behandlung im Pilotmaßstab betrieben wurden. Proben wurden im Zulauf der Kläranlage (INF), nach der biologischen Behandlung (BIO), nach der Ozonung (OZO) und nach der Nachbehandlung am Ablauf (EFF bzw. SF, GAK, PAK) genommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Eine Zusammenfassung der analysierten Proben findet sich in Tabelle 1. Abbildung 1 zeigt schematisch die Behandlungsstufen in den vier Kläranlagen.

Die **Kläranlage Neugut (NG)** behandelt Abwasser von 105'000 Einwohnerwerten (EW) mit ca. 50% Industrieanteil (v.a. von Lebensmittel-verarbeitenden Industrien). Das Abwasser wird mit dem Belebtschlammverfahren behandelt, gefolgt von einer volltechnischen Ozonung und einem Sandfilter (SF). Zwei flussproportionale 24 Std. Sammelproben bei einer spezifischen Ozondosis von ca. 0.5 gO₃/gDOC wurden von dieser Anlage verwendet. Details zur Anlage und Probenahme werden in Böhler et al. (2017a&b) und Bourgin et al. (2018) beschrieben.

Die **Kläranlage Glarnerland (GL)** behandelt das Abwasser von 70'000 EW, mit einem Industrieanteil von ca. 40%. Die biologische Reinigung besteht aus der S::Select®-Technologie mit Hydrozyklonen zur Abtrennung des Überschussschlamms. Ein Teil dieses Abwassers wurde in die Pilotanlage geleitet und entweder mit einer GAK-Filtration oder mit einer Vorozonung gefolgt von einer GAK-Filtration behandelt. Die GAK-Leerbettkontaktzeit (EBCT) betrug 24 Minuten bei Trockenwetter, und flussproportionale 24 Std. Sammelproben wurden über die Zeit (6700-35000 BV) bei einer spezifischen Ozondosis von ca. 0.2 gO₃/gDOC genommen. Details zur Anlage sind in McArdeil et al. (2020) bzw. Oltramare et al. (in prep) zu finden.

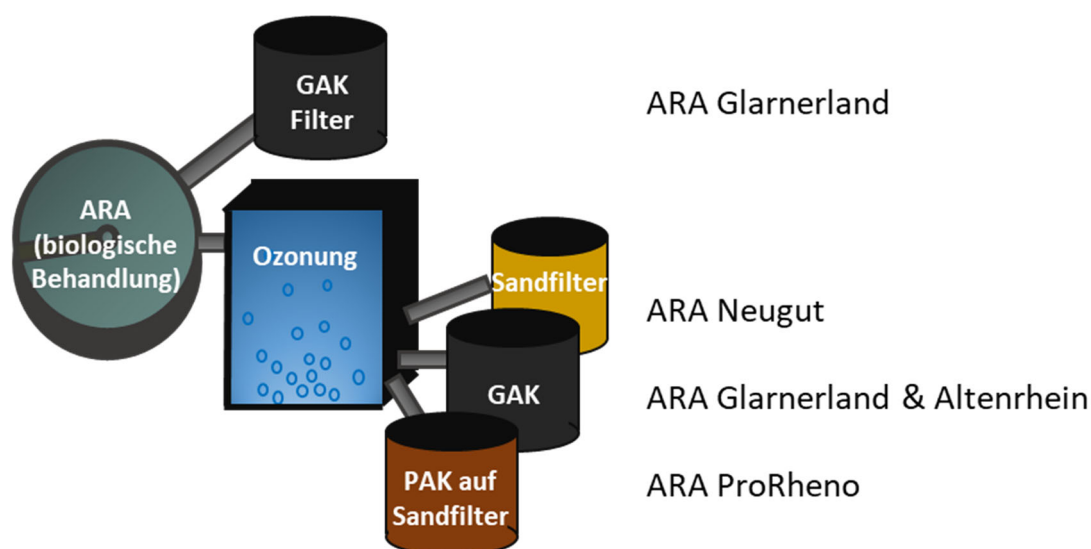


Abbildung 1 Schema der Pilotanlagen zur erweiterten Abwasserbehandlung in den vier beprobten Kläranlagen.

Die **Kläranlage Altenrhein (AR)** behandelt das Abwasser von 82'000 EW und hat einen industriellen Anteil von ca. 26%. Die biologische Behandlung besteht aus parallel arbeitenden Belebtschlamm- und Festbettverfahren, gefolgt von einem Sandfilter. Ein Teil des gereinigten Abwassers wurde in die Pilotanlage umgeleitet, die mit einer Vorozonung und anschließender

GAK-Filtration mit einer EBCT von 20 Minuten ausgestattet war. Es wurden zwei Probenahme-kampagnen mit zwei verschiedenen spezifischen Ozondosen (0.15 ± 0.03 gO₃/gDOC und 0.33 ± 0.04 gO₃/gDOC) durchgeführt, wobei jeweils flussproportionale 24 Std. Mischproben an drei aufeinanderfolgenden Tagen gesammelt wurden. Die GAK BVs während der Probenahme lagen bei etwa 44'000 bzw. 48'000 (siehe Schollée et al. (2021a) und Bogler (2019) für Details).

Die **Kläranlage ProRhen** (**PR**) behandelt Abwasser von 470'000 EW. Eine Pilotanlage erhielt zwei Zufluss-Abwasserströme. Der eine (**PR-Comm**) bestand hauptsächlich aus kommunalem Abwasser (ca. 26% Industrieanteil), während der zweite (**PR-Chem**) aus der nahe gelegenen, hauptsächlich pharmazeutischen Industrie stammte (100% Industrieabwasser). Die beiden Ströme wurden gemischt (90:10 PR-Comm:PR-Chem v:v) und bei konstantem Fluss in einem Sequencing-Batch-Reaktor (SBR) behandelt, gefolgt von einer Ozonung und der Dosierung von PAK/Eisen(III)-Chlorid auf einen zweischichtigen Sandfilter. Das PAK-haltige Schlammwasser wurde in den SBR rezirkuliert. Details zur Pilotanlage sind in Krahnstöver et al. (2018) beschrieben. Innerhalb dem Projekt «Aktifilt Plus» wurden mehrere Probenahme-kampagnen mit 48 Std. Sammelproben durchgeführt, die einen Bereich von spezifischen Ozondosen (0-0.27 gO₃/gDOC) und PAK-Dosen (0-16.3 mg/L) abdeckten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Probenahmestandorte und -einstellungen, einschließlich der Probenahmedaten und -Kampagnen, der Zulaufmengen, des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) nach der biologischen Behandlung, der angewendeten spezifischen Ozondosis und der Einstellungen der jeweiligen Nachbehandlung, entweder Sandfilter (SF), granulierter Aktivkohlefilter (GAK) inklusiv durchlaufene Bettvolumen (BV), oder Pulver-Aktivkohle (PAK), die auf einen Sandfilter dosiert wurde. Proben in **pink+violet** wurden für die Non-target Analytik verwendet, Proben in **blau+violet** wurden für die Analyse nach OTPs im TRANSFO₃RM Projekt verwendet. Proben, die in den Biotests untersucht wurden, sind **kursiv** angegeben.

Probenahmen		Proben-Kampagne	Zulauf (m ³ /d)	DOC nach BIO (mg/L)	Ozondosis (gO ₃ /gDOC)	GAK BV
ARA Neugut (Ozonung SF)	10.03.2015	NG _{SFa}	19290	5.0	0.55	-
	14.04.2015	NG _{SFb}	17742	5.5	0.50	-
ARA Glarnerland (GAK ohne/mit Vorozonung) 24 Std. Sammelproben	08.06.2017	GL _{noO3_GAC7000}	16371	5.7	0	6720
	16.01.2018	GL _{noO3_GAC17000}	31904	8.4	0	17051
	05.09.2018	GL _{noO3_GAC31000}	16267	7.3	0	30535
	06.06.2017	GL _{0.2O3_GAC8000a}	31'566	8.0	0.16	8272
	07.06.2017	GL _{0.2O3_GAC8000b}	22'028	5.4	0.32	8347
	08.06.2017	GL _{0.2O3_GAC8000c}	16371	5.7	0.22	8415
	20.06.2017	GL _{0.5O3_GAC9000a}	14'395	11.8	0.39	9150
	21.06.2017	GL _{0.5O3_GAC9000b}	16'401	7.6	0.63	9208
	22.06.2017	GL _{0.5O3_GAC9000c}	14'337	9.7	0.52	9260
	21.11.2017	GL _{GAC1a}	18347	5.4	0.33	16278
	16.01.2018	GL _{0.2O3_GAC19000}	31904	8.4	0.2	19121
	18.04.2018	GL _{GAC1b}	20862	10.7	0.33	24679
	05.09.2018	GL _{0.2O3_GAC33000}	16267	7.3	0.18	32853
	17.10.2018	GL _{GAC1c}	19966	8.7	0.23	35282
ARA Altenrhein (beladene GAK mit Vorozonung) 24 Std. Sammelproben	16.07.2018	AR _{0.2O3_GAC44000}	14096	8.6	0.13	44483
	17.07.2018	AR _{0.2O3_GAC44000}	13837	8.7	0.13	44555
	18.07.2018	AR _{0.2O3_GAC44000}	13690	9.5	0.18	44627
	03.09.2018	AR _{0.3O3_GAC48000}	18467	6.1	0.36	48010
	04.09.2018	AR _{0.3O3_GAC48000}	16138	6.4	0.35	48082
	05.09.2018	AR _{0.3O3_GAC48000} AR _{GAC2}	15751	7.6	0.29	48154

Probenahmen		Proben-Kampagne	Zulauf Pilotanlage (L/h)	DOC nach BIO (mg/L)	Ozondosis (gO ₃ /gDOC)	PAK (mg/L)	PAK (g/gDOC)
ARA ProRhenio (PAK auf SF mit/ohne Vorozonung) 48 Std. Sammelproben	21.02.2017	PR _{0.2O3_PAC7.7}	20.6	8	0.19	5.8	0.73
	02.03.2017	PR _{0.2O3_PAC7.7}		NA	0.27	8.8	1.1
	09.03.2017	PR _{0.2O3_PAC7.7}		8	0.24	8.6	1.1
	06.04.2017	PR _{0.2O3_PAC12.1}	21.3	8	0.2	13.6	1.7
	12.04.2017	PR _{0.2O3_PAC12.1}		6	0.2	9.9	1.7
	20.04.2017	PR _{0.2O3_PAC12.1} PR _{PAC}		7	0.21	12.9	1.8
	27.04.2017	PR _{0.1O3_PAC12.5}	20.4	7	0.09	9.3	1.3
	04.05.2017	PR _{0.1O3_PAC12.5}		7	0.09	11.8	1.7
	11.05.2017	PR _{0.1O3_PAC12.5}		8	0.08	16.3	2.0
	06.06.2017	PR _{noO3_PAC13.6}	22.1	7	0	15.8	2.3
	15.06.2017	PR _{noO3_PAC13.6}		9	0	13.4	1.5
	22.06.2017	PR _{noO3_PAC13.6}		8	0	11.8	1.5
	20.07.2017	PR _{0.3O3_noPAC}	21.4	8	0.29	0	0
	27.07.2017	PR _{0.3O3_noPAC}		9	0.27	0	0
	10.08.2017	PR _{0.3O3_noPAC}		10	0.21	0	0

2.2 Non-target Analyse

In der Non-target Datenanalyse werden sogenannte «non-target signals/features», hier «Non-target Substanzen» genannt, detektiert, welche sich auf ein Signal mit einem bestimmten exakten Masse-zu-Ladungs Verhältnis (m/z), einer bestimmten Retentionszeit (RT) und einer Intensität beziehen. Diese Non-target Substanzen beinhalten nicht nur die MVs, sondern auch die Bestandteile der Matrix.

Die Abwasserproben wurden wie in Bourgin et al. (2018) beschrieben gemessen. Dafür wurden die Proben über Nacht aufgetaut, filtriert und verdünnt (Zulaufproben 1:3 (w:w), alle anderen Proben 1:1 (w:w) mit Nanopur-Wasser). Jede Probe wurde mit einer Mischung aus 147 isotopen-markierten internen Standards aufgestockt, mit einer mehrschichtigen online-Festphasenextraktion (SPE) angereichert und anschließend in der Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie gefolgt von positiver Elektrospray-Ionisierung und hochauflösender Massenspektrometrie (LC-(+)ESI-HRMS) auf einem Qexactive Instrument (Thermo Scientific) gemessen. Die quantitative Analyse der 12LS erfolgten in den jeweiligen Projekten (siehe Kapitel 2.1).

Die Analyse der LC-HRMS-Daten umfasste mehrere Schritte (Details in Schollée et al. 2021a). Zuerst wurden die LC-HRMS-Daten mittels verschiedener Algorithmen verarbeitet, um eindeutige exakte Masse/Retentionszeit-Paare (d.h. «Non-target Substanzen») in jeder Probe zu erkennen. Zweitens wurde zur Analyse der Trends von Non-target Substanzen in den verschiedenen Abwasserbehandlungsschritten eine automatische Trend-Analyse entwickelt und angewendet. Drittens wurden zwei Listen aus den Non-target Substanzen extrahiert: (1) eine Liste mit 66 bekannten, abwasserrelevanten organischen Mikroverunreinigungen (66MV) und (2) eine Liste mit bekannten OTPs, welche aus Literaturdaten zusammengestellt wurde. Viertens wurde eine Klassifizierungsmethode ähnlich wie bei Anliker et al. (2020) angewendet, um mögliche industrielle Einträge zu priorisieren und zu identifizieren (nur auf ARA ProRhenio). Schließlich wurde eine Verknüpfungsanalyse (linkage analysis, Schollée et al. (2015)) angewendet, um nach möglichen unbekannten OTPs zu suchen und ihre Entfernung in verschiedenen Nachbehandlungen zu vergleichen.

2.3 Detektion der OTPs von 87 MVs

Innerhalb dieses Projekts wurden Synergien mit dem parallel laufenden TRANSFO₃RM Projekt genutzt, um OTPs von relevanten MVs im Abwasser zu detektieren (Details in Gulde et al. 2021a). Dort wurden Ozonungsexperimente im Labor in wässrigen Lösungen durchgeführt, welche die organischen Ersatzsubstanzen Acetat und Methanol enthielten, um Ozonungsbedingungen zu simulieren, die hinsichtlich der Exposition gegenüber Ozon und Hydroxylradikalen ähnlich wie im Abwasser waren. Die 87 ausgewählten Ausgangs-MVs wurden in 19 Gemische aufgeteilt, was die Identifizierung von OTPs und Zuordnung zu den Ausgangs-MVs mit einer optimierten Anzahl von Experimenten ermöglichte.

Im TRANSFO₃RM Projekt wurden zwei Ansätze gewählt, um OTPs zu identifizieren. (1) Ein Screening nach Signalen, die in den LC-HRMS Messungen der Laborexperimente als OTP Signale für jedes MV identifiziert wurden. Dies ergab eine Liste von 1749 potenziellen OTP-Kandidatensignalen, die 70 Ausgangs-MVs zugeordnet werden konnten. (2) Im Weiteren wurde ein Screening nach LC-HRMS Signalen durchgeführt, die sowohl in den Laborexperimenten als auch in Proben der Kläranlagen gebildet wurden. Dieser zweite Ansatz war letztendlich zeiteffizienter und wurde hier auf Proben der vier ausgewählten Kläranlagen angewendet. Die Proben aus den Ozonungsexperimenten im Labor von 87 MVs wurden dafür parallel mit den Abwasserproben gleich wie für die Non-target Analyse (siehe Kapitel 2.2) gemessen. Die Messung erfolgte separat mit positiver und negativer Elektrospray-Ionisierung auf dem LC-HRMS/MS.

Zur Detektion von entstehenden Non-target OTP-Substanzen nach der Ozonung wurde der Filter folgendermassen gewählt: die Intensität des Signals in den ozonbehandelten Laborproben musste mindestens 2x grösser sein als die Intensität vor der Zugabe von Ozon, und das Signal musste auch in der Abwasserprobe vorkommen.

2.4 Screening nach vorhergesagten OTP

2.4.1 Durchführung und Messung der Laborexperimente

Für die Versuche wurde biologisch behandeltes Abwasser der Kläranlage Glarnerland am 13. und 18. Februar 2018 mit 24 Std. Sammelproben genommen und ins Labor transportiert, filtriert, und <14 Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, bevor die Laborversuche stattfanden.

Für die Ozonungsexperimente wurden Aliquote der beiden Proben mit 50 ausgewählten MVs mit einer Konzentration von 10 µg/L gespickt, mit einem Phosphat-Puffer bei pH 7.5 stabilisiert, und mit para-Chlorobenzoessäure (pCBA) dotiert (zur Bestimmung der Hydroxyl-Radikal Exposition). Nach der Zudosierung von Ozon (total transferierte spezifische Ozondosis 0.8 gO₃/gDOC) wurden in regelmässigen zeitlichen Abständen (0=t₀, 15s=t₁, 45s=t₂, 75s=t₃, 105s=t₄, 135s=t₅, 165s=t₆, 210s=t₇, 300s=t₈, 450s=t₉, 600s=t₁₀) Proben genommen, um die Ozonkonzentration (mittels Indigo-Methode) und Hydroxyl-Radikalkonzentration (durch Messung von pCBA nach Quenchen mit Na₂SO₃) und MVs und OTPs mit LC-HRMS/MS zu bestimmen. Insgesamt waren die Bedingungen in den Laborexperimenten (Ozon- und Hydroxylradikal-Exposition) ähnlich wie in anderen Abwasser-Ozonungsexperimenten.

Zur chemischen Analyse der MVs und OTPs wurden die ozonbehandelten Proben mit isotoopenmarkierten internen Standards versetzt und mit einer RPLC-ESI-HRMS Methode gemäss Gulde et al. (2021a) gemessen nach direkter Injektion von 100 µL Probe, Verwendung einer RPLC C18 Waters Atlantis T3 Säule (3.0 x 150 mm, 3 µm Partikelgösse), ESI Ionisierung (separat

positiv und negativ) und einem hochauflösenden Quadrupol Orbitrap HRMS (Thermo Scientific, QExactive). Parallel dazu wurden die gleichen Proben (nach 1:9 Verdünnung mit Acetonitril) mit einer zweiten HILIC Säule (Waters BEH Amide) getrennt und gemessen, ebenfalls nach direkter Injektion von 100 µL Probe.

2.4.2 LC/HRMS/MS Datenanalyse und Aufklärung der OTP Struktur

Zur Detektion der gebildeten Non-target OTPs nach der Ozonung wurde die Non-target Datenanalyse gemäss Schollée et al. (2015) verwendet. Dabei wurde der folgende Filter gewählt: die Intensität des Signals in den ozonbehandelten Proben musste mindestens 4x grösser sein als die Intensität vor der Zugabe von Ozon, und die Intensität des Signals in den mit MV gespikten Proben musste mindestens 4x grösser sein als in den nicht-gespikten Proben.

Mit der Software O3-PPD (Lee et al. 2017) wurden OTPs von 85 MVs bis zur dritten Generation ihrer Reaktion mit Ozon vorhergesagt. Es muss beachtet werden, dass mit der Software keine OTPs vorhergesagt werden, welche durch die Reaktion der MVs mit Hydroxyl-Radikalen entstehen können. Für alle vorhergesagten OTPs (>70,000) wurden Substrukturen (e.g. Aldehyde, Amine, Phenole) zugeordnet, sowie logP (Oktoanol/Wasser Verteilungskoeffizienten) und Retentionszeiten mit RPLC vorhergesagt.

Die beiden *in-silico* Fragmentierungssoftware MetFrag und CSI:FingerID wurden verwendet, um den gemessenen HRMS/MS Spektren mögliche chemische Strukturen zuzuweisen. Die beiden Programme verwenden unterschiedliche Methoden, um *in silico* Fragmentierungen von Strukturkandidaten vorherzusagen. Die Programme suchen nach Strukturen, dessen vorhergesagte Fragmente am besten zu den gemessenen Fragmenten passen, und erstellen eine Rangliste der möglichen Strukturen. Die Liste der Strukturkandidaten umfasste die PubChem Datenbank sowie auch die Liste der vorhergesagten OTPs. Für die Priorisierung der OTP Kandidaten und die Zuweisung des dazugehörigen Ausgangs-MVs wurde die Ähnlichkeit der OTP Struktur mit den gespikten MVs und bekannten Massen-Differenzen (basierend auf bekannten Ozonungs-Mechanismen) verwendet. Das resultierende OTP mit der grössten Wahrscheinlichkeit wurde mit einem «confidence-level» charakterisiert (Schymanski et al. 2014) um aufzuzeigen, wie vertrauenswürdig die Struktur ist bzw. wieviel Information vorhanden ist, welche für diese Struktur spricht.

2.5 Ökotoxikologische Biotests

2.5.1 Messprogramm und Probenvorbereitung

Zur Beurteilung der ökotoxikologischen Effekte wurden ausgewählte Proben (siehe Tabelle 1) mit Biotests evaluiert. Auf den ARA Altenrhein, Glarnerland und ProRhenon wurden je zwei Ozonkonzentrationen in jeweils 3 Messkampagnen in 24 bzw. 48 Std. Mischproben nach 3 Behandlungsstufen (Ablauf biologische Behandlung (BIO), Ablauf Ozonung (OZO), Ablauf GAK (ARA Altenrhein und Glarnerland) bzw. PAK+SF (ARA ProRhenon) (AC) untersucht. Eingesetzt wurden der kombinierte Algentest zur Erfassung von Photosynthese- und Wachstumshemmung, der Ames-Fluktuationstest zur Erfassung von Mutagenität, ebenso wie ein Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen. Alle drei Tests kommen im Ozontestverfahren des VSA zum Einsatz (Wunderlin et al. 2015). Für den kombinierten Algentest und den Ames-Fluktuationstest wurden die Proben mit einer Festphasenextraktion 500fach angereichert (Lichrolut RP18-EN Kartuschen, Merck) (Margot et al. 2013), der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen wurde mit nativen Proben durchgeführt.

2.5.2 Ames-Fluktuationstest

Der Ames-Fluktuationstest diente zur Erfassung von Mutagenität (eine vererbare Veränderung des Erbguts) der Abwasserproben (International Organization for Standardization, 2012). Dieser Test ist empfindlich, standardisiert, weit verbreitet und wird kontinuierlich weiterentwickelt. Er wurde durch das Auftragslabor Xenometrix AG (Allschwil, Schweiz) in 384-Well-Platten mit den angereicherten Proben durchgeführt. Zur Erfassung unterschiedlicher Erbgutveränderungen wurden zwei verschiedene Bakterienstämme eingesetzt (*Salmonella typhimurium*, TA98 und TA100). Zusätzlich wurden die Versuche mit und ohne Zugabe von Stoffwechselenzymen (S9-Mix) zur Simulation von Biotransformation durchgeführt. Zur Bestimmung der mutagenen Wirkung der Abwasserproben (je drei Replikate pro Verdünnung) wurde die Zunahme (fold increase) der Vertiefungen mit rückmutierten Bakterien im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt (18 Replikate). Stieg die Anzahl der positiven Vertiefungen um das Zweifache oder mehr im Vergleich zum Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle (Basislinie) an, wurde die Probe als unklar beurteilt. Bei einem mehrfach höheren Anstieg galt die Probe als deutlich positiv. Lag die Zahl der positiven Vertiefungen unter der 2fachen Basislinie wurde die Probe als negativ eingestuft.

2.5.3 Kombiniertes Algentest

Der kombinierte Algentest diente zur Beurteilung von Auswirkungen des Abwassers auf Wachstum und Photosynthese von einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) (Escher et al. 2008). Dieser Test wurde am Oekotoxzentrum mit den angereicherten Proben durchgeführt. Untersucht wurden die Parameter Photosynthesehemmung (nach 2 Std.) und Wachstums- hemmung (nach 24 Std.). Eine Hemmung der Photosynthese (Photosystem II, PSII) ist ein Summenparameter für alle Herbizide mit diesem Wirkmechanismus und deckt auch Mischungseffekte ab. Die Hemmung des PSII tritt sehr schnell auf (einige Minuten nach Exposition der Algen mit einem Wirkstoff / einer Umweltprobe), daher wird dieser Parameter bereits 2 Std. nach Testbeginn gemessen. Eine Hemmung des Wachstums als Endpunkt wird auch durch Stoffe verursacht, die nicht primär als Herbizide gelten wie z.B. Triclosan, verschiedene Pharmazeutika und Metalle. Effektdaten für Umweltproben werden als Äquivalente der Referenzsubstanz Diuron ausgedrückt (Diuron-Äquivalenz-Konzentrationen, DEQ (ng/L), = die Konzentration der Referenzsubstanz Diuron, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe). Die Hemmung des Wachstums wurde in Basis-Toxizitäts-Äquivalenten (Basis-TEQ, mg/L) ausgedrückt.

2.5.4 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen

Der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (*Ceriodaphnia dubia*) diente zur Beurteilung von Auswirkungen des Abwassers auf die Nachkommenzahl und Sterblichkeit von Wasserflöhen (AFNOR, 2000). Dieser Test wurde durch das Auftragslabor SOLUVAL (Couvet, CH) durchgeführt. Die Jungtiere (weniger als 24 Std. alt und alle innerhalb von 8 Std. des gleichen Alters zu Beginn des Tests) wurden bis zu 8 Tage in einem statischen System mit täglichem Wasserwechsel in verschiedenen Testansätzen exponiert (ein Kontrollansatz und zwei Abwasserverdünnungen (90% und 60%) mit 12 Replikaten pro Ansatz). Das Überleben der Mütter und die Anzahl der Nachkommen wurden über die gesamte Testdauer bestimmt. Daraus wurde die Konzentration ermittelt, die keinen signifikanten Effekt auf die Nachkommenzahl hat (No Observed Effect Concentration, NOEC).

3 Resultate

3.1 Verhalten der Gesamtheit von Stoffen in der Abwasserbehandlung

3.1.1 Methodenentwicklung zur Auswertung von Non-target Analysen

Für die Auswertung der Non-target Substanzen musste zuerst eine geeignete Methode auf die Matrix angepasst und validiert werden. Dabei ging es darum, die vielen detektierten Signale, die von der gleichen Substanz herrühren können (z.B. durch Isotope, Addukte und Signal-Auftrennung) so zu gruppieren und zu ordnen, dass jedes Signal möglichst nur einer Substanz zugeordnet werden kann. Ausserdem wurden falsch-positive Signale und Signale von homologen Reihen, welche von Tensiden (García et al. 2019, Mairinger et al. 2021) oder Matrix-Komponenten, wie z.B. Proteinen oder DOM ((Mairinger 2019, Verkh et al. 2018), herrühren, ausgefiltert. Details zur Methodenentwicklung finden sich in Schollée et al. (2021a). Die total 459'867 ursprünglich detektierten Signale (ESI+) konnten damit auf 50'722 Non-target Substanzen reduziert werden.

3.1.2 Durchschnittliche Elimination

Insgesamt wurden Proben von 3 Pilotanlagen untersucht, die alle mit dem Kombiverfahren Vorozonung und Aktivkohle ausgestattet waren. Zwei davon (ARA Altenrhein und ARA Glarnerland) waren mit einer Vorozonung gefolgt von einem GAK-Filter ausgestattet, auf der dritten ARA (ARA ProRhen) wurde nach der Vorozonung PAK auf einen Sandfilter (SF) dosiert. Eine reine GAK-Behandlung (ohne Vorozonung) wurde ebenfalls untersucht (ARA Glarnerland). Insgesamt wurden 13 Messkampagnen mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen, GAK Bettvolumina, und PAK-Dosierungen durchgeführt. Auf der ARA ProRhen) wurden auch Proben ohne Ozondosierung gemessen, wobei unerwarteter Weise relativ viele entstehende Signale detektiert wurden. Diese können von biologischen Abbauprodukten herrühren, welche im Biofilm auf den Wänden der Ozonkolonnen gebildet wurden. Ein Teil sind eventuell auch analytische oder Probenahme-bedingte Abweichungen. Sie wurden als falsch-positive Signale von allen Proben herausgefiltert.

Mit der Non-target Analytik wurden die sogenannten Non-target Substanzen detektiert. Diese beinhalten nicht nur die MVs, sondern auch die Bestandteile der Matrix. Dabei werden die Intensitäten von Signalen angeschaut. Eine Quantifizierung ist so zwar nicht möglich, die Intensität kann jedoch als ungefähres Proxy für die Konzentration betrachtet werden. Im Vergleich zu allen Non-target Substanzen des Zulaufs wurden die Intensitäten der Signale von 66 ausgewählten Mikroverunreinigungen (66MV) angeschaut. Ausserdem wurde mit der Elimination der 12 quantifizierten Leitsubstanzen (12LS) verglichen (auf ProRhen) nur 6 LS, da nicht alle 12LS gemessen wurden). Die quantitative Messung der Leitsubstanzen erfolgte hauptsächlich in anderen Projekten (siehe Kapitel 2.1).

Als erstes wurde die durchschnittliche Elimination der Non-target Substanzen, der 66MV, und der 12LS angeschaut (siehe Abbildung 2).

Generell verhielten sich die 66MV und 12LS recht ähnlich, wobei die 12LS über die ganze ARA leicht besser als die 66MV entfernt wurden. Die 66MV wurden biologisch etwas besser abgebaut, die 12LS etwas besser in der weitergehenden Behandlung, wobei jedoch zu beachten ist, dass die 66MV nur halbquantitativ (über Signalintensitäten) evaluiert wurden. Gegenüber den Non-target Substanzen ergaben sich aber zum Teil grössere Unterschiede.

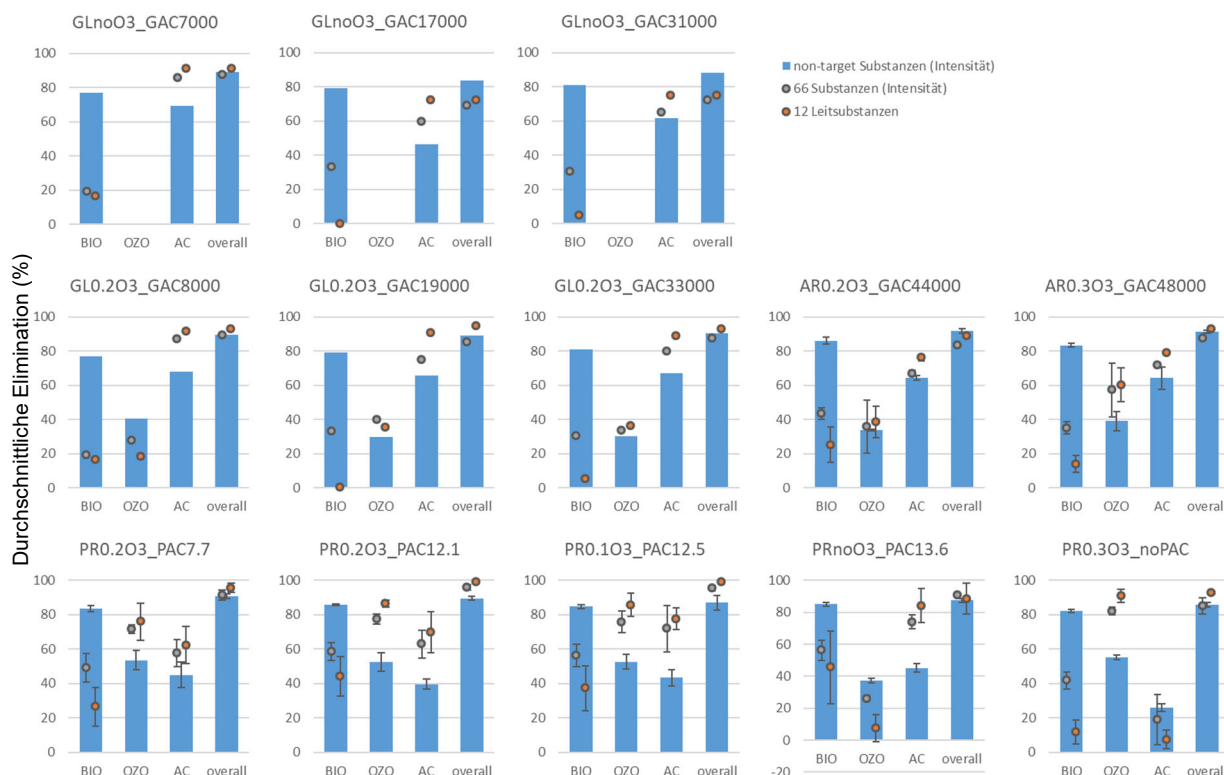


Abbildung 2 Durchschnittliche relative Elimination von Substanzen in den einzelnen Stufen in drei verschiedenen ARAs. Non-target Substanzen (blaue Balken), 66 Mikroverunreinigungen (graue Punkte), 12 Leitsubstanzen (orange Punkte); negative Eliminationen wurden jeweils auf «0» gesetzt. GL: ARA Glarnerland ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500, 18'000 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 oder 0.3 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000-48'000 BV). PR: ARA ProRhenno ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.1-0.3 gO₃/gDOC) und 7.7 - 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie).

Folgende Resultate wurden gefunden:

- In der **Biologie** wurden die Non-target Substanzen durchschnittlich zu 77-86% eliminiert. Für die ausgewählten 66MV und die 12LS wurden in der Biologie deutlich niedrigere Eliminationen gefunden (im Bereich 0-40%; ARA ProRhenno etwas höher wegen rückgeführter PAK aus Nachbehandlung). Die schlechtere Elimination der 66MV und 12LS ist nicht erstaunlich, weil die Auswahl von MVs auf solchen Substanzen beruht, welche bezüglich biologischem Abbau eher persistent sind. Viele in der Biologie entfernten Non-target Substanzen sind wohl auch matrixbezogene Verbindungen.
- In der **Ozonung** mit einer spezifischen Ozondosis von 0.2-0.3 gO₃/gDOC wurden die restlichen Non-target Substanzen in den ARA Glarnerland und Altenrhein zu 30-40% entfernt (in ProRhenno: 52-55% mit 0.1-0.3 gO₃/gDOC). Die Elimination der 66MV und 12LS war bei einer Ozondosierung von 0.2 gO₃/gDOC ähnlich tief (20-40%), etwas höher bei 0.3 gO₃/gDOC (ca. 60%). Auf der ARA ProRhenno wurden die 66MV und die 12LS viel besser eliminiert (70-90%). Hier wurden also signifikant höhere Eliminationen beobachtet als in den anderen ARAs bei ähnlichen Ozondosierungen. Basierend auf diesen Werten und auf der beobachteten Elimination von quantifizierten MVs (Krahnstöver et al. 2018), muss angenommen werden, dass die an diesem Standort applizierten Ozondosen höher waren als berichtet und eine relativ hohe Unsicherheit aufwiesen.
- In den **GAK-Filtern** wurden 47-69% der Non-target Substanzen eliminiert, unabhängig von Bettvolumen (BV) bzw. mit/ohne Vorozonung. Bei den 66MV und den 12LS zeigten sich aber Unterschiede in den Verfahren: schlechtere Elimination in den GAK Filtern ohne Vorozonung

(Elimination kleiner als 80% ab 17'000 BV), während die GAK-Filter nach der Vorozonung die MV besser eliminierten. Inklusiv der Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) konnten >80% bis 33'000 BV gehalten werden.

- Auf der ARA ProRhenon wurden mit 7.7-12.5 mg/L **PAK** 40-45% der Non-target Substanzen eliminiert, ohne Korrelation zu den PAK-Dosierungen. Die 66MV und die 12LS wurden zu etwas grösserem Prozentsatz eliminiert (60-80%), mit schwacher Abhängigkeit von der PAK Dosis bei grossen Unsicherheiten. Dies legt die Frage nahe, wie genau die PAK-Dosierung war. Ausserdem erschweren die bei PR angewendeten höheren Ozondosen die Beurteilung der Nachbehandlung PAK+SF, da aufgrund der hohen Elimination in der Ozonung die Substanzen bereits im Zulauf der Nachbehandlung in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze vorlagen. Dadurch kann eine zusätzliche Elimination in der Nachbehandlung nicht gut quantifiziert werden, weshalb die Elimination in PAK+SF wahrscheinlich unterschätzt wird.
- Über die **ganze ARA** wurden die Non-target Substanzen zu 84-92% eliminiert, ohne grosse Unterschiede in den Verfahren. Die 66MV und die 12LS wurden in der GAK-Filtration ohne Vorozonung ab ca. 17'000 BV weniger als zu 80% eliminiert, in allen anderen Verfahrenskombinationen durchschnittlich mehr als 80%.

Als Fazit ergibt sich, dass die Analyse der Gesamtheit an Non-target Substanzen nur bedingt geeignet ist, um die weitergehenden Verfahren zu beurteilen, weil die Unterschiede meist gering sind. Die durchschnittliche Elimination der Auswahl der 66 Substanzen war jedoch recht aussagekräftig, und ist sehr ähnlich wie diejenige der 12LS.

Eine solche Auswertung über die «durchschnittliche Elimination» muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Sobald ein Stoff im Ablauf, d.h. nach seiner Elimination in der Stufe, unter die Bestimmungsgrenze fällt, wird die berechnete Elimination unterschätzt.

3.1.3 Elimination grösser als 80%

Aus diesem Grund wurde eine weitere Auswertungsmethode in der Non-target Methode gewählt (Schollée et al. 2021a). Dabei wird zwischen den Substanzen unterschieden, deren Signal in der Reinigungsstufe um mehr als 80% oder um weniger als 80% verringert wird. Die Auswertung nach dieser Methode ist in Abbildung 3 aufgezeichnet.

Generell zeigen alle ARAs eine grosse Reduktion der Anzahl Non-target Substanzen vom Zulauf zum Ablauf. Dabei muss beachtet werden, dass auch eine erhebliche Anzahl der Non-target Substanzen, die im Ablauf detektiert wurden, in den einzelnen Stufen gebildet werden, d.h. nicht Non-target Substanzen sind, welche bereits im Zulauf vorhanden waren (dunkelgraue Balken). Im Durchschnitt aller Kläranlagen bestand das Abwasser im Ablauf nur zu 45% aus Non-target Substanzen aus dem Zulauf. Der Rest wurde in der biologischen Behandlung, während der Ozonung oder in der Nachbehandlung mit GAK oder PAK+SF gebildet. Allerdings wiesen die neugebildeten Substanzen viel geringere Intensitäten auf und sind damit vermutlich geringer konzentriert.

Auch mit dieser Methode wurden «alle» Non-target Substanzen mit der Auswahl der 66MV verglichen. In Abbildung 4 ist aufgezeichnet, in welchen Behandlungsstufen wieviel der Substanzen aus dem Zulauf zu mehr als 80% eliminiert werden.

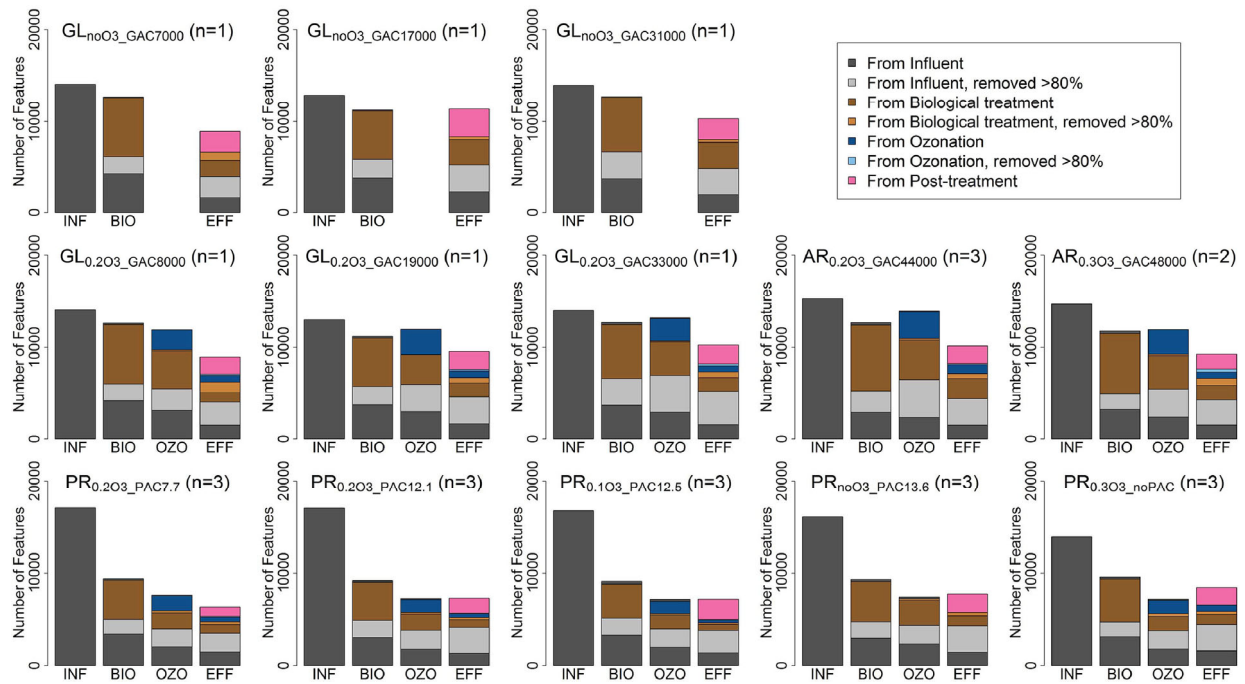


Abbildung 3 Anzahl Non-target Substanzen in der Abwasserbehandlung (INF: Zulauf, BIO: nach biologischer Behandlung, OZO: nach Ozonung, EFF: nach Nachbehandlung). Non-target Substanzen, welche zu mehr als 80% entfernt wurden (z.B. from influent, removed >80%) werden dabei von Substanzen unterschieden, die weniger als 80% entfernt wurden (z.B., from influent). Non-target Substanzen, welche nicht mehr detektiert wurden, werden nicht mehr angezeigt. GL: ARA Glarnerland ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500, 18'000 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 oder 0.3 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000-48'000 BV). PR: ARA ProReno ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.1-0.3 gO₃/gDOC) und 7.7 - 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie).

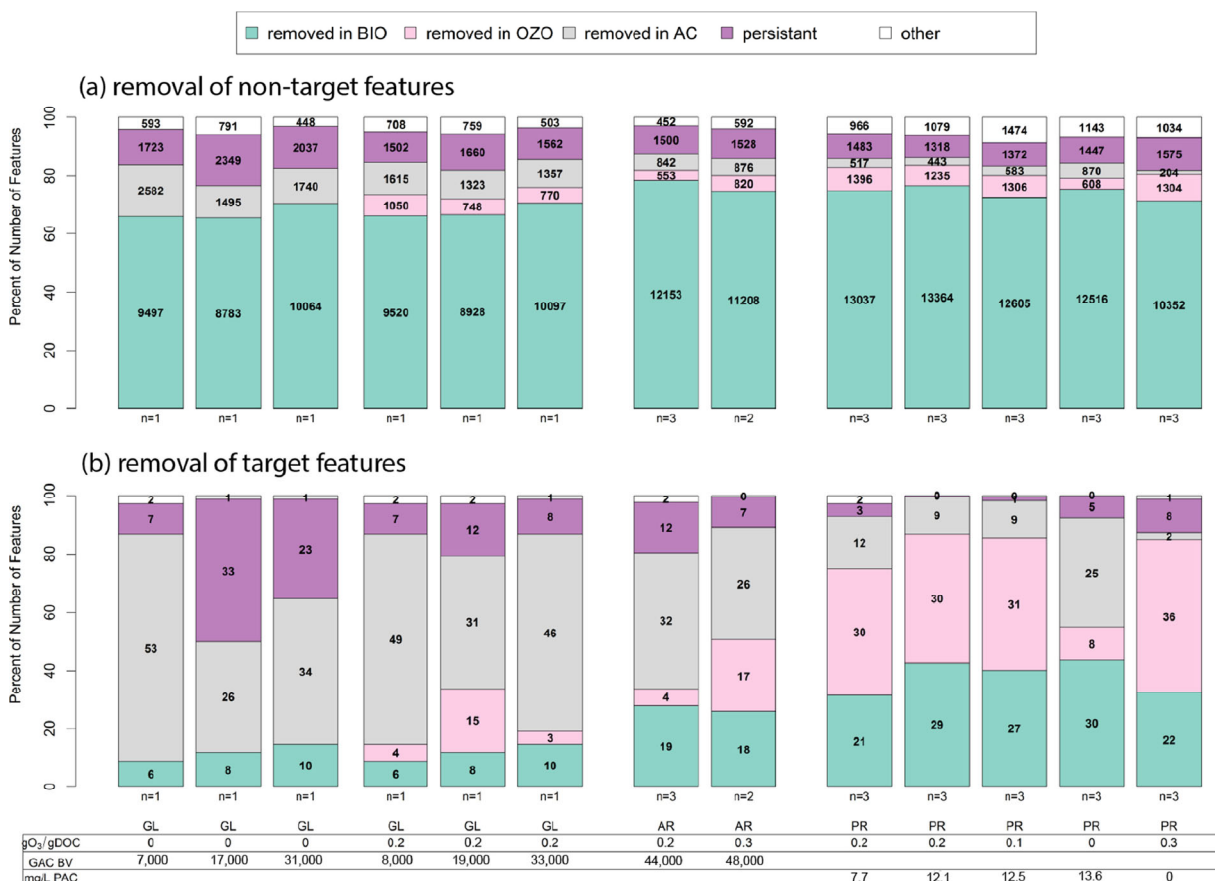


Abbildung 4 Verhalten und Elimination der Substanzen vom Zulauf der ARAs in jeder Stufe der Abwasserbehandlung (BIO: in biologischer Behandlung, OZO: in Ozonung, AC: in Nachbehandlung mit Aktivkohle). (a) Non-target Substanzen und (b) 66 Mikroverunreinigungen (66MV). Die Farben zeigen, in welcher Stufe wieviel Prozent der Substanzen vom Zulauf der ARA zu mehr als 80% wurden, bzw. welche als persistent gelten (violett) und im Ablauf der ARA noch vorhanden waren. GL: ARA Glarnerland ohne und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500, 18'000 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 oder 0.3 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000-48'000 BV). PR: ARA ProReno ohne und mit Vorozonung (0.1-0.3 gO₃/gDOC) und 7.7 - 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie).

Folgende Aussagen können getroffen werden:

- In der **Biologie** wurden die meisten der Non-target Substanzen eliminiert (66-81% wurden zu >80% eliminiert). Im Gegensatz dazu wurden nur 6-42% der 66MV zu >80% entfernt. In PR ist die Elimination höher, weil dort PAK in die biologische Reinigung rezirkuliert wurde.
- In der **Ozonung** wurden 7-18% der Non-target Substanzen vom Zulauf in Glarnerland und Altenrhein mit einer spezifischen Ozondosis von 0.21 ± 0.08 gO₃/gDOC zu >80% eliminiert, bzw. 3-28% der 66MV Substanzen. In Altenrhein wurden weniger der Non-target Substanzen, die nach der biologischen Behandlung detektiert wurden, bei 0.15 ± 0.03 gO₃/gDOC (6.4%) als bei 0.33 ± 0.04 gO₃/gDOC (24.8%) zu >80% eliminiert, ähnlich wie die 66 MV (4 bzw. 17 MV bei den beiden Ozondosen). In ProReno wurden signifikant höhere Eliminationen beobachtet als in den anderen ARAs bei ähnlichen Ozondosierungen, weil hier die Ozondosen wohl höher waren als berichtet (siehe Kapitel 3.1.2).
- Bei **PAK**-Dosierungen von 7.7 und 13.6 mg/L wurden 8-21% der restlichen Non-target Substanzen vom Zulauf und 13-59% der 66MV-Verbindungen zu >80% entfernt, ohne deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen PAK-Dosen. Die bei PR angewendeten höheren Ozondosen erschweren die Beurteilung der Nachbehandlung PAK+SF, wie in Kapitel 3.1.2 diskutiert.
- In den **GAK**-Filtern auf der ARA Glarnerland wurden wie erwartet mehr der restlichen Non-target Substanzen nach der Vorozonung im relativ frischen GAK bei 7'000-8'000 BV (33%) als im weniger frischen GAK bei 17'000-33'000 BV (18-25%) eliminiert. Die GAK-Filter eliminierten auch bei hohen Bettvolumen (45'000 BV) nach einer Vorozonung noch sehr viele der 66MV (40-50%) zu mehr als 80%. Eine Vorozonung erhöhte die Gesamtentfernung zusätzlich. Der GAK-Filter allein konnte bei 30'000 BV eine ziemlich große Anzahl (25%) der verbleibenden Non-target Substanzen zu >80% entfernen.
- Über die **ganze ARA** wurden in allen Behandlungsstufen mehr als 80% der Non-target Substanzen zu >80% eliminiert. Eine Ausnahme bildet der GAK-Filter ohne Vorozonung. Hier wurden bereits ab 17'000 BV weniger als 80% der Non-target Substanzen und der 66MV zu >80% eliminiert. Die 66MV zeigten eine grössere Elimination in der weitergehenden Behandlung (38-83% zu >80% eliminiert) als in der Biologie.

Allgemein sind diese Resultate sehr gut mit der vorherigen Auswertung der «durchschnittlichen Elimination» vergleichbar. Die Biologie leistet sehr viel zur Elimination von Non-target Substanzen im Abwasser, jedoch signifikant weniger für die Auswahl der 66MV. Dies hat wohl mit der Auswahl der 66MV zu tun und auch damit, dass ein Grossteil der Non-target Substanzen Bestandteile der Matrix und nicht MVs sind. Es wurden nur kleine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen weitergehenden Behandlungen für die Non-target Substanzen wie auch für die 66MV beobachtet, aber gemäss den erwarteten Trends. Über die ganze ARA wurden in allen Behandlungsstufen mehr als 80% der Non-target wie auch der 66MV zu >80% entfernt, ausser bei der GAK-Filtration ohne Vorozonung ab 17'000 BV. Die weitergehende Behandlung erbrachte also eine signifikante Erhöhung der Elimination der 66MV. Eine Vorozonung erhöhte die Gesamtentfernung, was vor

allem dann wichtig ist, wenn die GAK-Filtration z.B. bei Regenereignissen nicht optimal funktioniert (Böhler et al. 2020a, McArdell et al. 2020). Der GAK-Filter nach der Ozonung eliminiert auch bei 48'000 BV immer noch eine recht grosse Anzahl von Non-target Substanzen und auch Substanzen der 66MV Liste.

3.1.4 Industrie-Chemikalien

Für die Proben der ARA ProReno wurde ein Klassifizierungsmethode angewandt, um potenzielle industrielle Non-target Substanzen herauszufiltern. Nur für diese ARA waren genug Proben vorhanden, um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten. Dabei wurde untersucht, welche von den Non-target Substanzen im Industrie-Zulauf die höchsten Intensitäten und die höchsten Intensitäts-Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben aufwiesen. Mit dieser Methode wurden 1207 Non-target Substanzen herausgefiltert. Durch Vergleich der MS/MS Spektren mit Datenbanken konnten davon 54 Substanzen identifiziert werden. Zur endgültigen Bestätigung waren jedoch keine Referenzsubstanzen vorhanden (d.h. confidence level 2b nach Schymanski et al. 2014). Zwei Beispiele sind in Abbildung 5 aufgeführt.

Die Mehrzahl der 1207 potenziellen industriellen Non-target Substanzen wurden in der biologischen Behandlung zu >80% eliminiert. In der Ozonung wurden zusätzlich 9% der Substanzen eliminiert, und weniger als 3% waren persistent.

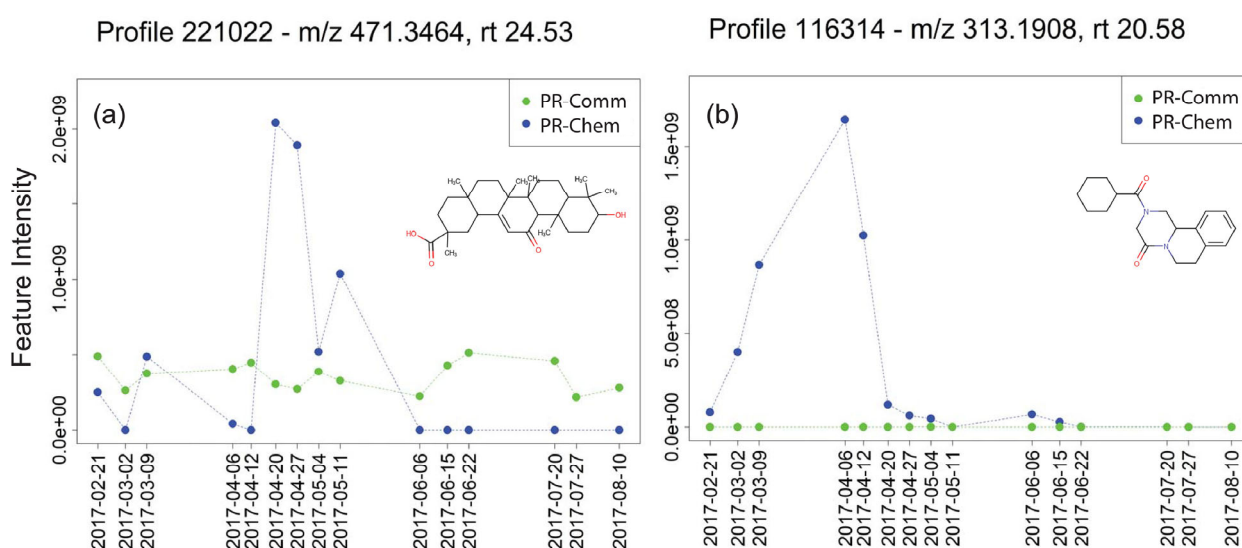


Abbildung 5 Intensitätsprofile zweier potentiellen Industrie-Chemikalien im Zulauf der ARA ProReno (Konfidenzniveau 2b) (a) 18 β -Glycyrrhetinsäure und (b) Praziquantel. Auf der x-Achse ist das Datum der Probenahme (JJJJ-MM-TT) und auf der y-Achse die absolute Intensität des Signals aufgetragen. Bei der anschließenden Abwasserbehandlung werden beide Substanzen vollständig entfernt, 18 β -Glycyrrhetinsäure vollständig in der biologischen Behandlung, Praziquantel teilweise in der biologischen Behandlung (77 % Intensitätsreduktion) und vollständig bei der Behandlung mit Ozonung gefolgt von PAK+SF.

3.2 Beurteilung der Abwasserbehandlung mit Biotests

Zur Beurteilung der ökotoxikologischen Effekte des Abwassers wurden drei verschiedene Biotests an ausgewählten Proben in mehreren Messkampagnen untersucht (siehe Tabelle 1).

3.2.1 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen

Es wurden keine negativen Auswirkungen des Abwassers der ARA Glarnerland, Altenrhein und ProReno auf die Fortpflanzung von Wasserflöhen (*Ceriodaphnia dubia*) gemessen. Teilweise trat in den Abwasserproben eine höhere Nachkommenzahl als in der unbelasteten Kontrolle auf, vermutlich aufgrund von höherer Nährstoffverfügbarkeit in diesen Proben.

3.2.2 Kombierter Algentest

Es wurden keine Auffälligkeiten auf den ARA Altenrhein und ProReno mit dem kombinierten Algentest mit einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) mit Probenextrakten gemessen (Abbildung 6). Die Werte lagen im Bereich von früheren Messungen auf ARAs. Die Gesamtelemination von Ozonung + AC betrug auf der ARA Altenrhein 85% für den Parameter PSII-DEQ_{bio} und 89% für den Parameter Wachstumshemmung. Auf der ARA ProReno lagen diese Werte bei 75% (PSII-Hemmung) und 78% (Wachstumshemmung).

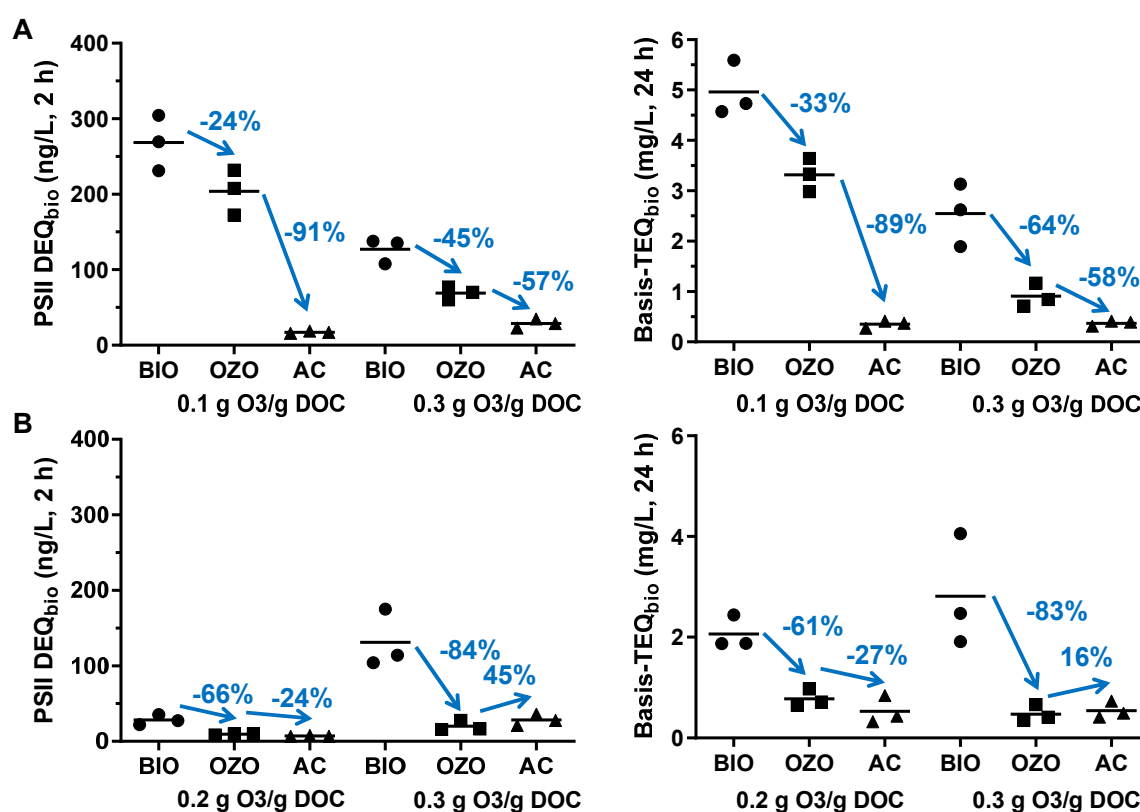


Abbildung 6 Kombierter Algentest: Photosynthesehemmung (Diuron-Äquivalenzkonzentration, DEQ, ng/L, links) und Wachstumshemmung (Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (Basis-TEQ, mg/L), rechts). A: ARA Altenrhein (AR), B: ARA ProReno (PR), 6 Probenahmen (je 3 mit gleichen Ozondosen) vom Juli und September 2018 (AR) und April-August 2017 (PR). BIO = Ablauf Nachklärbecken. OZO = nach Ozonung bei zwei Dosierungen, AC = nach GAK bei ca. 44'000-48'000 BV (AL) bzw. nach PAK (PR). Linie = Mittelwert.

Auf der ARA Glarnerland zeigten alle Proben des Ablaufs der biologischen Behandlung eine starke Wirkung auf Algenphotosynthese und -wachstum (Abbildung 7). Sie zeigten eine aussergewöhnlich hohe DEQ bezogen auf die Hemmung der Photosynthese nach 2 Std. und sehr hohe Basis-TEQ bezogen auf die Hemmung des Wachstums der Grünalgen nach 24 Std. Die gemessenen Werte sind um einiges höher als Messungen von 27 anderen Kläranlagen der Schweiz (Abbildung 8).

Die Ozonung brachte jedoch eine Verbesserung, wobei die Abnahme der Toxizität bei höherer Ozondosis höher ausfiel (Abbildung 7). GAK verursachte eine weitere deutliche Reduktion. Die Gesamtelemination von Ozonung + GAK betrug auf der ARA Glarnerland 100% für den Parameter PSII-Hemmung und 84% für den Parameter Wachstumshemmung. Nach der GAK-Filtration wurde der ökotoxikologische Beurteilungswert für Oberflächengewässer von 70 ng/L DEQ (Escher et al. 2018, Kienle et al. 2018) unterschritten. Dabei ist zu beachten, dass diese Messung im Ablauf des GAK bei rund 9'000 BV stattgefunden hat. Eine spätere Messung innerhalb dem Glarnerland-Projekt zeigte auch bei 15'500 BV Ablaufkonzentrationen unterhalb 70 ng/L DEQ (McArdell et al. 2020).

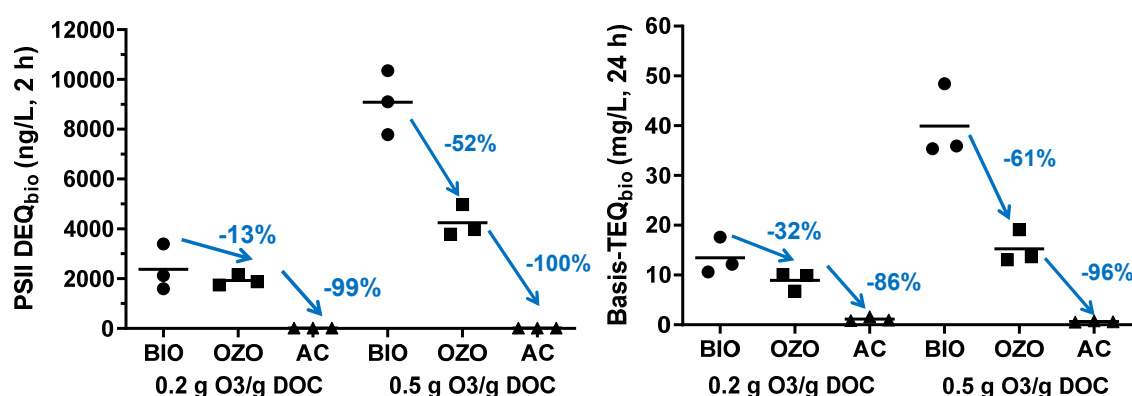


Abbildung 7 Kombiniertes Algentest: Photosynthesehemmung (Diuron-Äquivalenzkonzentration, DEQ, ng/L, links) und Wachstumshemmung (Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (Basis-TEQ, mg/L), rechts) auf der ARA Glarnerland. 6 Probenahmen (je 3 mit gleichen Ozondosen) vom Juni 2017. BIO = Ablauf Nachklärbecken, OZO = nach Ozonung bei zwei Dosierungen, AC = nach GAK 3a bei ca. 9000 BV. Linie = Mittelwert.

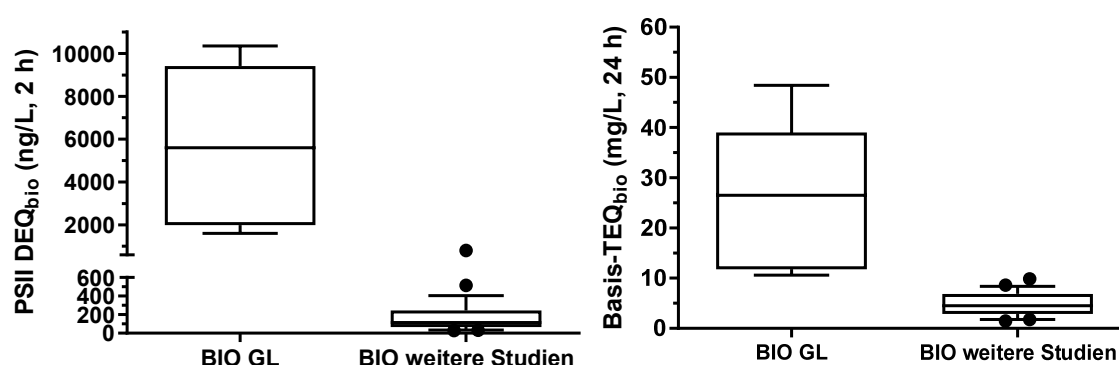


Abbildung 8 Photosynthesehemmung nach 2 Std. (Diuron-Äquivalenzkonzentration DEQ, links) und Wachstumshemmung nach 24 Std. (Basis-TEQ, rechts) im kombinierten Algentest der sechs Proben im Ablauf Nachklärbecken (BIO) in ARA Glarnerland (GL) vom Juni 2017 im Vergleich zu BIO-Messungen aus anderen Studien in der Schweiz (Daten von 27 ARA). Box-Whisker-Diagramm: Linie = Median, Box = 50% der Daten oberhalb und unterhalb des Medians, Fehlerbalken: 10.-90. Perzentile, Punkte: Messwerte ausserhalb dieses Bereichs).

In den gleichen Proben wurde auch Diuron gemessen, das bekanntlich sehr algentoxisch ist (Diuron ist die Referenzsubstanz im Algentest). Die Photosynthesehemmung aus dem Biotest wird, wie oben erwähnt, entsprechend als Diuron-Äquivalenz-Konzentration (DEQ_{bio}) ausgedrückt, und kann mit der Konzentration von Diuron aus der chemischen Analyse ($Diuron_{chem}$) verglichen werden. In Abbildung 9 ist dieser Vergleich für alle gemessenen Proben in den sechs Probenahmen dargestellt. Es zeigt sich eine sehr gute Korrelation zwischen der Algentoxizität und der Diuron-Konzentration im (behandelten) Abwasser.

Die Wirkung auf die Photosynthese kann durch hohe Konzentrationen an Diuron aus der Industrie erklärt werden. Dieses Beispiel zeigt, dass in Einzelfällen auch nur ein Stoff der Verursacher von Toxizität sein kann. Nach Kontaktaufnahme der Eawag mit dem Hersteller beschloss dieser ab etwa 2020 vollständig auf den Einsatz von Diuron zu verzichten.

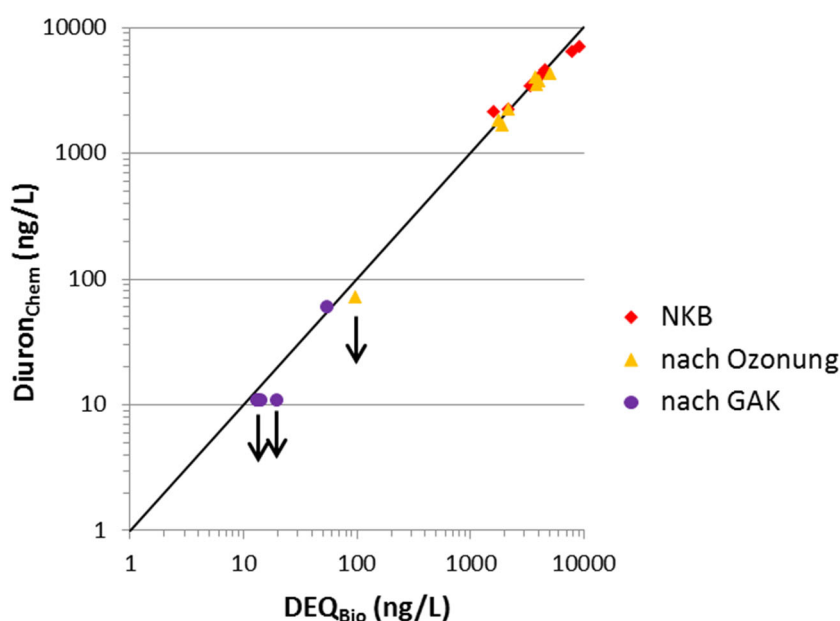


Abbildung 9 Vergleich der Diuron-Äquivalenz-Konzentrationen aus der Photosynthesehemmung im Algentest (DEQ_{bio}) mit der gemessenen Diuron-Konzentrationen ($Diuron_{chem}$) in 6 Proben auf der ARA Glarnerland. Die Pfeile zeigen Werte, bei denen die Bestimmungsgrenze von Diuron unterschritten wurde (hier ist die Bestimmungsgrenze dargestellt, wobei der wahre Wert auch tiefer liegen kann).

3.2.3 Ames-Fluktuationstest

Auf der ARA Altenrhein war eine geringe bis mittlere Mutagenität nach Ozonung in den angereicherten Proben vorhanden (siehe Tabelle 2A und Abbildung 10A), welche jedoch durch die GAK-Filtration wieder eliminiert wurde. Bei der ARA ProRhenno war keine Mutagenität nach Ozonung zu beobachten. Es war jedoch konsistent über einen langen Zeitraum eine hohe Mutagenität nach dem Sandfilter vorhanden (siehe Tabelle 2B und Abbildung 10B). Teilweise trat dies auch in verdünnten Proben noch auf. Dieser Befund ist ungewöhnlich und wurde weder bei Versuchen auf ARA ProRhenno in 2013 noch bei Versuchen im Rahmen des VSA Ozontestverfahrens beobachtet (Kienle et al. 2013, Wunderlin et al. 2015). Deshalb wurden weitere Versuche auf der ARA ProRhenno durchgeführt. In einem parallel dazu installierten und identisch betriebenen zweiten (neuen) Pilotsandfilter trat dieser Effekt über einen Zeitraum von 3 Monaten nicht auf (Kienle et al. 2020). Deshalb wird die im Juni 2017 gemessene hohe Mutagenität auf den verwendeten Pilotsandfilter zurückgeführt.

Tabelle 2 Ames-Fluktuationstest auf den ARA Altenrhein und ProRheno: Beurteilung der Mutagenität des biologisch behandelten (BIO), des ozonierten (OZO) und des mit Aktivkohle (AC, AR: ca. 44'000-48'000 BV, PR: PAK+SF) behandelten Abwassers auf den Pilotanlagen. Mutagenität negativ (grün), unklar (grau), positiv (rot, leer (gering), + (mittel), ++ (hoch), +++ (sehr hoch), unterstrichen (Effekte bei 1.25x Konz.)).

ARA Altenrhein		TA98-S9			TA98+S9			TA100-S9			TA100+S9		
Probenahmedatum	Ozonkonzentration	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC
16.7.2018	0.1 g O ₃ /g DOC												
17.7.2018	0.1 g O ₃ /g DOC												
18.7.2018	0.1 g O ₃ /g DOC		+										
3.9.2018	0.3 g O ₃ /g DOC												
4.9.2018	0.3 g O ₃ /g DOC												
5.9.2018	0.3 g O ₃ /g DOC		+			+			+				

ARA ProRheno		TA98-S9			TA98+S9			TA100-S9			TA100+S9		
Probenahmedatum	Ozonkonzentration	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC
4.-6.4.2017	0.2 g O ₃ /g DOC			+++			+						
10.-12.4.2017	0.2 g O ₃ /g DOC			++									
18.-20.4.2017	0.2 g O ₃ /g DOC			+									
18.-20.7.2017	0.5 g O ₃ /g DOC			+++			++			+			
25.-27.7.2017	0.5 g O ₃ /g DOC			+++			+++			+			
8.-10.8.2017	0.5 g O ₃ /g DOC			+++			+++			+			

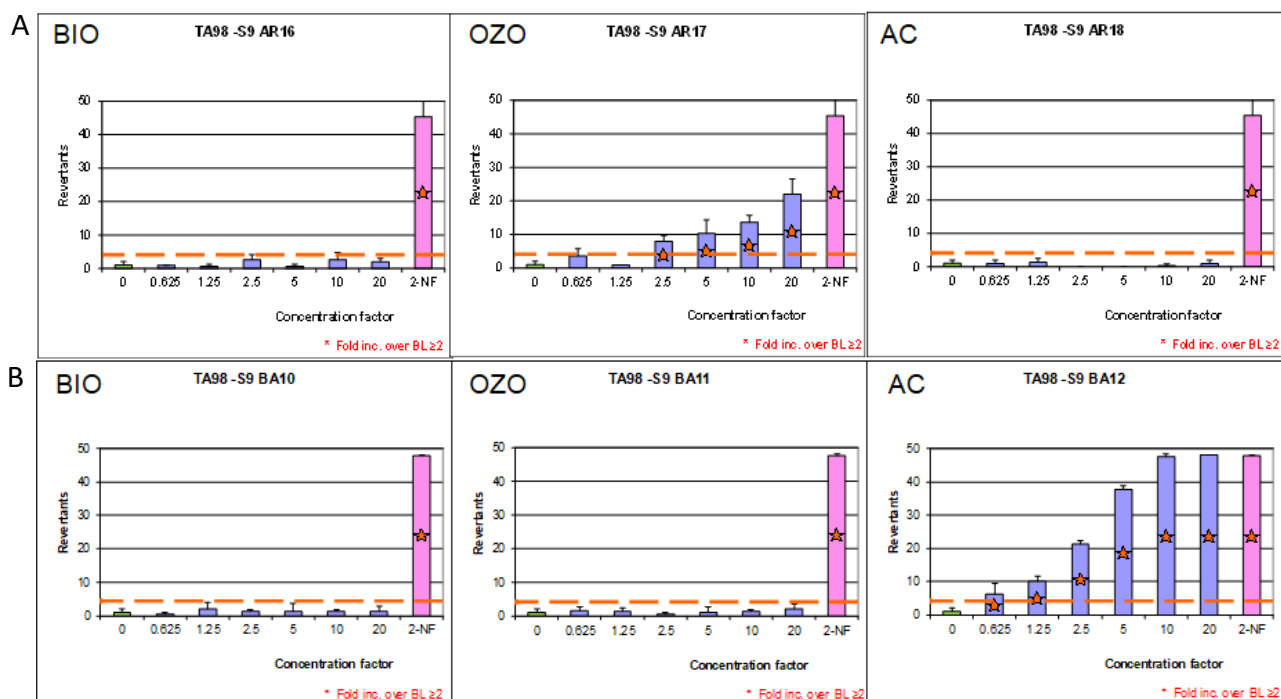


Abbildung 10 Ames-Fluktuationstest (Stamm TA98-S9) auf (A) ARA Altenrhein (AR) und (B) ProRheno (PR): Mutagenität der Proben vom 5. Sept. 2018 (AR) und vom 18.-20. Juli 2017 (PR) vor der Ozonung (BIO), nach der Ozonung mit 0.3 gO₃/gDOC (OZO) und nach AC (AR: GAK-Filter bei ca. 48'000 BV, PR: PAK+SF). X-Achse zeigt den Anreicherungsfaktor, Y-Achse die Anzahl Wells mit Mutagenität, die rote Linie (2xBlindwert) die Basislinie, rechter Balken (rosa) die Positiv-Kontrolle (2-NF, 2- Nitrofluoren).

Die Proben der ARA Glarnerland zeigten eine starke bis sehr starke Mutagenität nach der Ozonung in den Bakterienstämmen TA98-S9 und TA98+S9 (siehe Tabelle 3 und Abbildung 11). Die Mutagenität (Stamm TA98-S9) war teilweise auch in verdünnten Proben noch vorhanden, d.h. solchen in denen die angereicherte Probe bis unter die 1fache Konzentration (= native Probe) verdünnt wurde. In bisherigen Studien (z.B. Fux et al. 2015; Kienle et al. 2011, Kienle et al. 2017, Magdeburg et al. 2014, Schindler Wildhaber et al. 2015, Stalter et al. 2010) wurde teilweise auch eine erhöhte Mutagenität nach Ozonung gemessen, jedoch nur nach Aufkonzentration der Proben und sie war deutlich geringer als auf der ARA Glarnerland. Nach GAK-Filtration wurde diese Mutagenität jedoch wieder stark reduziert, und es wurden keine oder nur leicht mutagene Effekte gemessen.

Tabelle 3 Ames-Fluktuationstest (Stamm TA98-S9) auf der ARA Glarnerland: Beurteilung der Mutagenität des biologisch behandelten (BIO), des ozonierten (OZO) und des mit GAK3a (bei ca. 9000 BV) behandelten Abwassers auf der Pilotanlage. Mutagenität negativ (grün), unklar (grau), positiv (rot, leer (gering), + (mittel), ++ (hoch), +++ (sehr hoch), unterstrichen (Effekte bei 1.25x Konz.)).

ARA Glarnerland		TA98-S9			TA98+S9			TA100-S9			TA100+S9		
Probenahmedatum	Ozonkonzentration	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC	BIO	OZO	AC
5.-6.6.2017	0.2 g O ₃ /g DOC		+++			+++			+				
6.-7.6.2017	0.2 g O ₃ /g DOC		+++			+++			+				
7.-8.6.2017	0.2 g O ₃ /g DOC		+++			+++			++				
19.-20.6.2017	0.5 g O ₃ /g DOC		+++			+++			+				
20.-21.6.2017	0.5 g O ₃ /g DOC		+++			+++			+				
21.-22.6.2017	0.5 g O ₃ /g DOC		+++			+++			+				

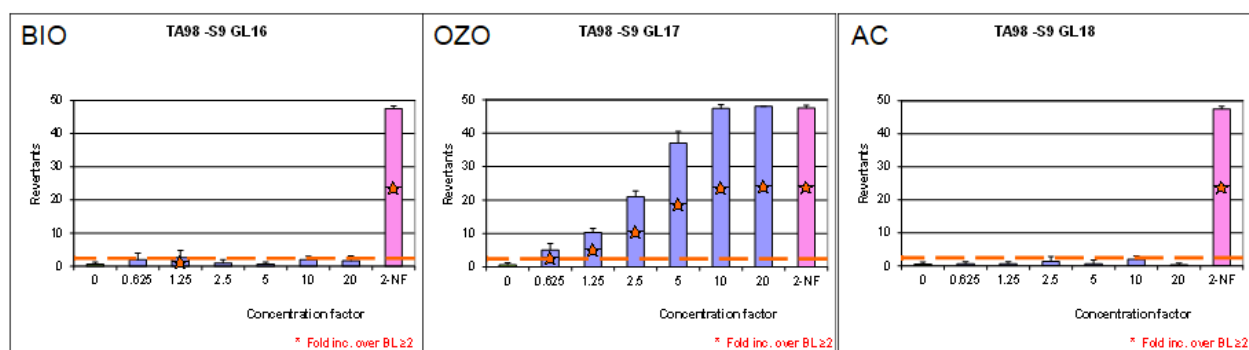


Abbildung 11 Mutagenität der Proben vom 21.-22. Juni 2017 auf der ARA Glarnerland vor der Ozonung (BIO), nach der Ozonung mit 0.2 gO₃/gDOC (OZO) und nach AC (GAK-Filter 3a bei ca. 9'000 BV). X-Achse zeigt den Anreicherungsgrad, Y-Achse die Anzahl Wells mit Mutagenität, die rote Linie (2xBlindwert) die Basislinie, rechter Balken (rosa) die Positiv-Kontrolle.

Die Messungen zeigen, dass die Toxizität, wenn sie nach der Ozonung steigt, in den Nachbehandlungen wieder entfernt wird. GAK kann, auch bei sehr hohen BV, die Mutagenität, die in der Ozonung entsteht, gut entfernen und auch nach der Ozonung noch vorhandene algentoxische Stoffe gut eliminieren.

3.3 Ozonungs-Transformationsprodukte (OTPs) und deren Verhalten in der Abwasserbehandlung

3.3.1 Verhalten von Non-target OTP Signalen

Mit der Trend-Analyse wurden 5-13% der Non-target Substanzen (total 1911) durch deren Zunahme in der Ozonung als OTPs klassifiziert. 53 davon wurden in anderen Studien identifiziert (u.a. in der zweiten Studie, siehe Kapitel 3.3.2). Viele der restlichen OTPs sind vermutlich Transformationsprodukte aus der Matrix. Die Anzahl gebildeter Non-target Substanzen korrelierte nicht mit der Ozondosis, was bereits in einer früheren Studie mit einer grösseren Bandbreite an Ozondosen gefunden wurde (Schollée et al. 2018).

68±9% der Non-target OTP Substanzen, die in der Ozonung entstanden sind, wurden in den Nachbehandlungen zu mehr als 80% eliminiert. Die eliminierten Non-target OTPs hatten höhere Massen und Retentionszeiten als diejenigen, die nicht gut eliminiert wurden, d.h. die persistenten Substanzen waren eher die niedermolekularen und polaren Stoffe.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Nachbehandlungen für die Elimination der Non-target OTP Substanzen waren aber nicht sehr gross. Diese Methode ist deshalb nur bedingt brauchbar bzw. aussagekräftig, um das Verhalten von Reaktionsprodukten aus der Ozonung abzuschätzen. Auch kann ohne weitergehende Identifizierung nicht unterschieden werden, ob die Non-target OTP Substanzen aus den MVs oder aus der Matrix entstanden sind.

3.3.2 Verhalten von OTPs von bekannten MVs

Um spezifisch Transformationsprodukte von MVs zu identifizieren, ist ein Suspect-Screening nötig, in welchem spezifisch nach Transformationsprodukten gesucht wird, die sich in der Ozonung aus bekannten MVs gebildet haben.

Dazu wurden Synergien zu einem anderen, parallel laufenden Projekt (TRANSFO₃RM-Projekt) genutzt. Anhand einer eigens entwickelten Methode (siehe Kapitel 2.3, Gulde et al. 2021a) wurden in Abwasserproben 84 relevante OTPs von 40 Ausgangs-MVs identifiziert, 1-7 OTPs pro MV. Für 83 dieser OTPs konnten chemische Strukturen durch Interpretation von MS/MS-Spektren und Expertenwissen in der Ozonchemie vorgeschlagen werden. 48 OTPs (58%) wurden vorher in der Literatur nicht beschrieben.

Das Verhalten der verifizierten OTPs wurde in dieser Studie in verschiedenen Nachbehandlungsschritten untersucht (siehe Abbildung 12). Nur 56 OTPs mit einem eindeutigen MS/MS-Spektrum wurden dafür angeschaut, wobei nicht alle OTPs auf jeder Kläranlage gefunden wurden (42-53). Die Reduktion des OTP-Signals in der Nachbehandlung wurde für eine Klassifizierung dessen Verhaltens wie folgt bewertet: «entfernt» bei Signalreduktion >50%, «stabil» zwischen 50% und -50%, und «gebildet» bei <-50%.

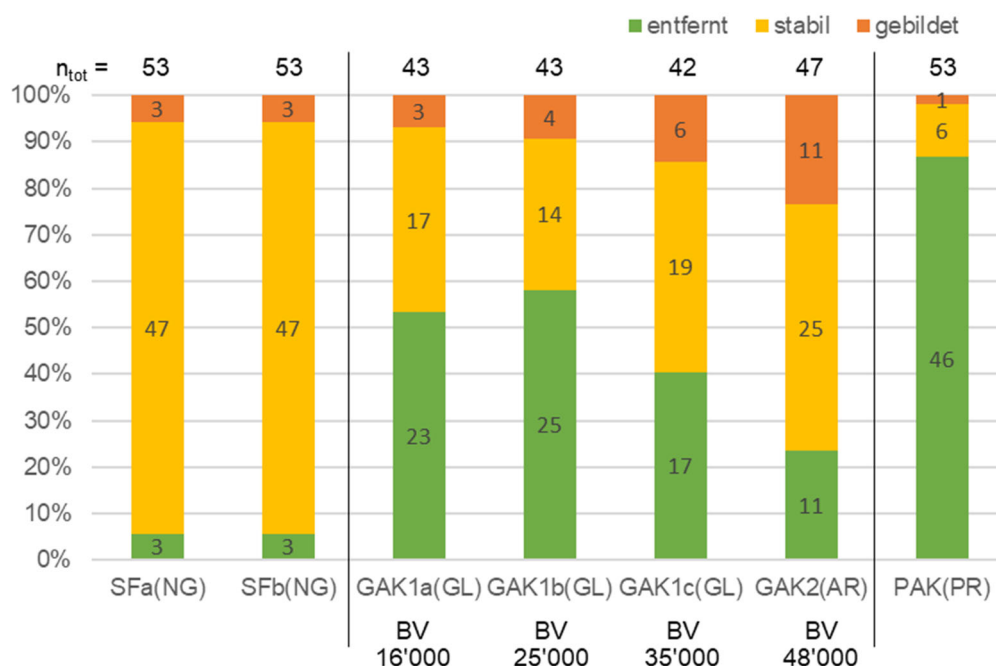


Abbildung 12 Verhalten von OTPs in verschiedenen Nachbehandlungen, die entsprechend ihrer relativen Signalreduktion drei Kategorien zugeordnet wurden: entfernt, stabil und gebildet (siehe Text für Definition). Zwei Kampagnen auf der ARA Neugut (NG) mit einem biologischen Sandfilter (SFa und SFb), drei Kampagnen auf der ARA Glarnerland (GL) mit einem GAK-Filter beprobt bei GAK1a: 16'000 Bettvolumen (BV), GAK1b: 25'000 BV, GAK1c: 35'000 BV, eine Kampagne auf der ARA Altenrhein (AR) mit einem GAK-Filter beprobt bei GAK2: 48'000 BV, und eine Kampagne auf der ARA ProRheno (PR) mit 13 mg/L PAK dosiert auf einen Sandfilter (PAK). Die Anzahl der OTPs in den verschiedenen Kategorien ist ebenfalls in der Grafik angegeben.

Auf der ARA Neugut waren 47 (89%) der 53 identifizierten OTPs im Sandfilter stabil. Nur 4 OTPs (6%) wurden entfernt, wahrscheinlich durch biologischen Abbau: ein OTP von Carbamazepin, auch BQM genannt (wie auch schon anderweitig beobachtet, siehe Hübner et al. 2014), zwei OTPs von Flufenaminsäure und eines von Lidocain. 3 OTPs wurden gebildet, u.a. BaQD, ein anderes OTP von Carbamazepin, gebildet durch den Abbau von BQM. Eine systematische Bewertung des Abbaus der OTPs im Vergleich zu ihren Ausgangs-MVs basierend auf ozonreaktiven funktionellen Gruppen wurde in einer anderen Studie für ozontes Oberflächenwasser, gefolgt von einem biologischen Sandfilter, durchgeführt (Gulde et al. 2021b).

Im GAK-Filter auf der Kläranlage Glarnerland, der bei drei verschiedenen Laufzeiten beprobt wurde (16'000, 25'000 und 35'000 BV), wurden 40-58% der identifizierten OTPs entfernt, also eindeutig mehr als beim biologischen Sandfilter. Weniger OTPs (33-45%) waren stabil und 7-14% wurden gebildet. Im Vergleich der verschiedenen Laufzeiten wurden ähnliche Ergebnisse bei 16'000 und 25'000 BV erhalten (23/25 OTPs entfernt, 53/58%), und bei 35'000 BV wurden weniger OTPs entfernt (17 OTPs, 40%).

Im GAK-Filter auf der Kläranlage Altenrhein (beprobte bei 48'000 BV) war der Anteil der entfernten OTPs (11 OTPs, 23%) noch geringer als auf der ARA Glarnerland. Weitere OTPs waren stabil (25 OTPs, 53%) oder wurden gebildet (11 OTPs, 23%). Dies bestätigt den Trend einer weniger effizienten OTP-Reduktion bei längeren GAK-Filterlaufzeiten, was durch die geringere Adsorptionskapazität von GAK-Filtern mit zunehmender Betriebszeit erklärt werden kann (Crittenden et al. 2005). Zusätzlich zu den Adsorptionsstellen weisen GAK-Filter einen Biofilm auf, der eine Biotransformation ermöglicht (Reungoat et al. 2012). Es ist jedoch schwierig, Sorption und Biotransformation zu unterscheiden. Von den im GAK-Filter gebildeten OTPs zeigten vier

eine klare Tendenz zur stärkeren Bildung über die Zeit (ein OTP von Candesartan, eines von Carbamazepin (BaQD), eines von Diclofenac und eines von Phenazon). Höchstwahrscheinlich sind diese OTPs auch Biotransformationsprodukte der Ausgangs-MVs oder anderer OTPs.

In der Kläranlage ProReno wurde das ozonbehandelte Abwasser mit 13 mg/L PAK, dosiert auf einen Sandfilter, behandelt. Diese Nachbehandlung schnitt mit 87% OTP-Reduktion (46 OTPs) signifikant besser ab als die GAK- oder Sand-Filtration. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, weil dem Sandfilter kontinuierlich frische PAK zugeführt wird, was eine bessere Sorption von MVs und OTPs im Vergleich zu einem sich erschöpfenden GAK-Filter ermöglicht.

Zusammenfassend ergibt sich, dass der Sandfilter die detektierten OTPs von 40 MVs kaum entfernt (89% stabil, 6% entfernt), im GAK-Filter werden bedeutend mehr OTPs entfernt (23-58%), mit Tendenz zu einer Abnahme mit höheren Bettvolumen, während in der PAK-Behandlung (Dosierung von 13 mg/L PAK auf Sandfilter) am meisten OTPs entfernt werden (87%).

3.3.3 Screening nach vorhergesagten OTPs aus «*in silico*» Fragmentierung

Methodenbeschreibung

Für die Aufklärung bzw. Bestätigung der chemischen Struktur einer Substanz ist dessen MS-Spektrum notwendig. Das gemessene Spektrum wird mit dem Spektrum einer mitgemessenen Referenzsubstanz oder mit MS-Spektren aus Datenbanken verglichen. Bei Substanzen, für welche keine MS-Spektren in Datenbanken vorhanden sind, kann die *in silico* Fragmentierung beispielsweise mit MassFrontier, MetFrag, CSI:FingerID, oder CFM-ID für die Strukturaufklärung sehr nützlich sein. Die damit *in silico* erzeugten MS-Spektren können dann zum Vergleich herangezogen werden. Diese Methoden benutzen hauptsächlich Substanzdatenbanken wie PubChem oder ChemSpider. Leider stellt dies ein Problem für die Strukturaufklärung von TPs im Allgemeinen und von OTPs im Speziellen dar, da solche Verbindungen in diesen Datenbanken nur selten vorhanden sind.

Um diese Lücke zu füllen, wurde hier die Datenbank PubChem mit vorhergesagten OTPs ergänzt, ähnlich wie in einer kürzlich durchgeführten Studie zur Identifizierung von aus Pestiziden stammenden TPs (Kiefer et al. 2019). Hierzu wurde das Programm O3-PPD verwendet (Lee et al. 2017), welches aufgrund von bekannten Reaktionsmechanismen von Ozon mit funktionellen Gruppen in Substanzen OTPs vorhersagt. Damit wurden OTPs von 85 verschiedenen MVs vorherzusagen. Gleichzeitig wurden Laborexperimente durchgeführt, in welchen 50 dieser MVs zu biologisch behandeltem Abwasser gespikt und dann mit Ozon behandelt wurden, um OTPs aufgrund der Erhöhung von Signal-Intensitäten zu identifizieren. Neben der gängigen Umkehrphasen-Chromatographie (RPLC) wurde eine zweite Flüssigchromatographie mit hydrophiler Wechselwirkung (HILIC) angewendet, welche für die Messung hochpolarer Verbindungen besser geeignet ist. Aufgrund der großen Datenmenge, die durch LC-ESI-HRMS-Analysen der Laborexperimente erzeugt wurde, und der umfangreichen Liste möglicher vorhergesagter OTPs, war eine manuelle Bewertung nicht möglich, und es wurde ein automatisierter Ansatz zur Erkennung möglicher OTPs und zur anschließenden Strukturaufklärung entwickelt. Zuerst wurde eine Liste möglicher OTPs, die von den 50 dotierten MVs stammen können aus den LC-ESI-HRMS-Daten der Laborversuche, erstellt. Um diesen OTPs chemische Strukturen zuzuweisen, wurde eine *in-silico* Fragmentierung mit MetFrag und mit CSI:FingerID von Substanzen in der chemischen Datenbank PubChem sowie der vorhergesagten OTP-Strukturen durchgeführt und mit den gemessenen OTP Kandidaten verglichen.

Charakterisierung der vorhergesagten OTPs

Mit der O3-PPD Software wurden 70'242 OTPs bis zur dritten Generation aus den 85 MVs vorhergesagt. Dies ist eine sehr große Anzahl potenzieller OTPs, und viele werden in Realität wahrscheinlich nicht gebildet. Da dasselbe OTP über mehrere Reaktionswege erzeugt werden kann, war die Anzahl eindeutiger OTPs mit 63'890 geringfügig kleiner. Die Anzahl der eindeutigen Molekülformeln für diese OTPs (d.h. OTPs mit verschiedenen exakten Massen) beträgt «nur» 4'844. Sehr viele OTPs haben also dieselbe Molekülformel, was zeigt, wie schwierig ein Screening nach OTPs ohne weitere Strukturinformation ist.

77.3% der vorhergesagten OTPs hatten eine höhere Masse als deren Ausgangs-MV, und die häufigste Modifizierung war die Addition von weiteren Sauerstoffatomen (+3O, +4O, +5O). OTPs hatten, wie erwartet, ein höheres Sauerstoff zu Kohlenstoff (O/C) -Verhältnis, und weniger Kohlenstoffatome und Doppelbindungen. Aldehyde wurden am meisten vorhergesagt (siehe Abbildung 13), gefolgt von Aminen, weil 48% aller evaluierten MVs selber Amine waren.

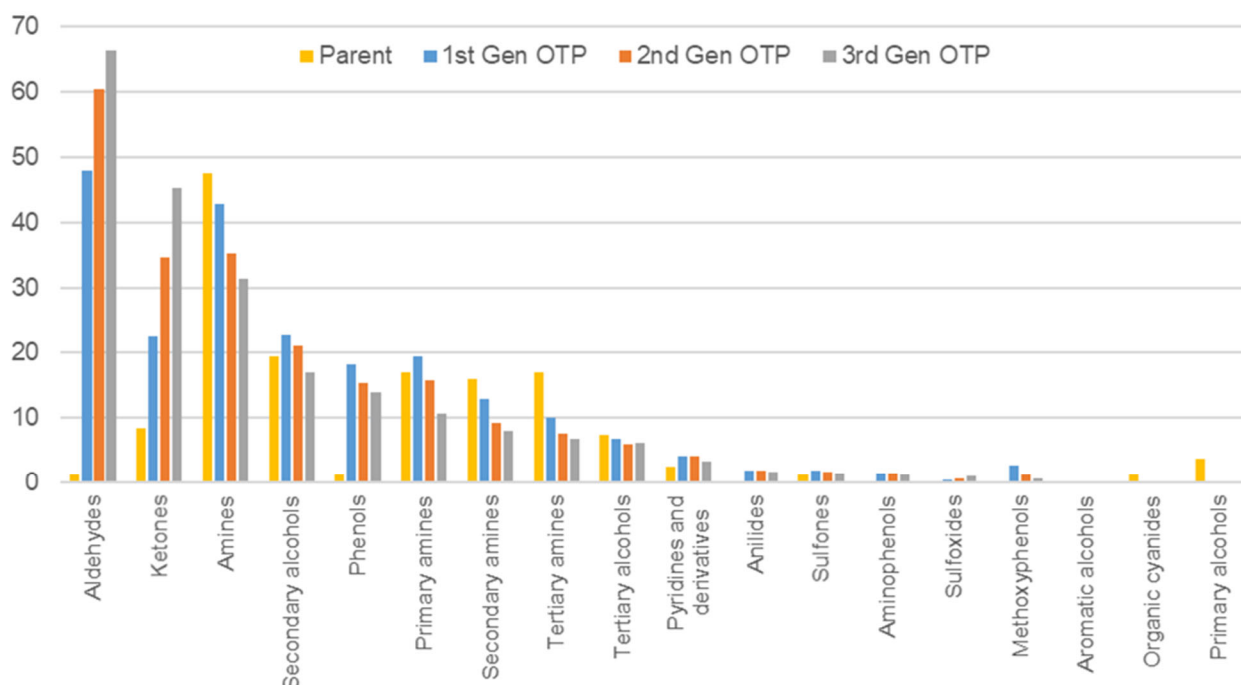


Abbildung 13 Verteilung der detektierten Substrukturen in den Ausgangs-MVs und den vorhergesagten OTPs der ersten, zweiten und dritten Generation (1st Gen, 2nd Gen, 3rd Gen). Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Strukturen mit dieser Substruktur relativ zur Gesamtzahl der Verbindungen dieser Gruppe (d.h. der Ausgangs-MVs, der OTP der ersten, zweiten oder dritten Generation) aufgetragen.

OTP-Priorisierung und -Strukturaufklärung

Total wurden 116'247 Non-target Substanzen in den gespikten und ungespikten Proben vor und nach Ozondosierung detektiert (siehe Tabelle 4). Rund 1.6% davon (1857 OTPs) konnten möglichen OTP Kandidaten der gespikten 50 MVs zugeordnet werden, weil sie den erwarteten Trend (Zunahme nach Ozondosierung und nach Spiken von MVs) aufwiesen. Für einen Drittel dieser OTP Kandidaten (538 OTPs) waren MS/MS-Spektren vorhanden, wovon wiederum ein Drittel (167 OTPs) die notwendige «Reinheit» aufwies, um damit eine Strukturaufklärung durchführen zu können.

Tabelle 4 Zusammenfassung der Priorisierung und Strukturaufklärung der OTPs in den folgenden vier Messmodi: (1) RP-pos: Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (RPLC) und positive Elektrospray-Ionisation (ESI); (2) RP-neg: RPLC und negativer ESI; (3) HILIC-pos: Flüssigkeitschromatographie mit hydrophiler Wechselwirkung (HILIC) und positiver ESI; (4) HILIC-neg: HILIC und negativer ESI. Prozentzahlen beziehen sich auf die totale Anzahl der detektierten Non-target Substanzen; auf die OTP Kandidaten, welche nach der Zugabe von Ozon und im Vergleich zu den nicht-gespikten Proben an Intensität zunahmen; auf die OTP Kandidaten mit MS/MS Spektrum; bzw. auf die OTP Kandidaten mit «reinen» MS/MS Spektren.

	RP-pos	RP-neg	HILIC-pos	HILIC-neg	Total
Totale Anzahl der Non-target Substanzen	19,393	8,229	54,953	33,672	116,247
Anzahl OTP Kandidaten					
OTP Kandidaten (Zunahme Intensität)	384 / 2.0%	160 / 1.9%	743 / 1.4%	570 / 1.7%	1,857 / 1.6%
OTP Kandidaten mit MS/MS Spektrum	129 / 34%	90 / 56%	166 / 22%	153 / 27%	538 / 30%
“reine” MS/MS Spektren (msPurity> 40%)	36 / 28%	74 / 82%	22 / 13%	35 / 23%	167 / 31%
Vertrauenswürdigkeit der OTP Struktur					
Level 2b Kandidaten (wahrscheinliche Struktur)	9 / 25%	6 / 8%	1 / 5%	2 / 6%	18 / 11%
Level 3 Kandidaten (mögliche Struktur)	6 / 17%	8 / 11%	0 / 0%	4 / 11%	18 / 11%
Level 4 Kandidaten (nur Molekülformel)	12 / 33%	25 / 34%	18 / 82%	7 / 20%	62 / 37%
Level 5 Kandidaten (nur exakte Masse)	9 / 25%	35 / 47%	3 / 14%	19 / 54%	66 / 40%

Für 22% der OTP Kandidaten mit reinen MS/MS-Spektren konnte anhand der entwickelten Methode (siehe Kapitel 2.4.2) eine Struktur zugeordnet werden, 18 OTPs (11%) als wahrscheinliche Struktur und 18 OTPs (11%) als mögliche Struktur. Von diesen OTPs stimmen 4 mit OTPs überein, die auch im TRANSFO₃RM Projekt gefunden wurden (siehe Kapitel 3.3.2). Die Strukturaufklärung der Hälfte dieser OTP-Kandidaten war nur durch den Vergleich mit den vorhergesagten OTPs möglich, weil sie in der verwendeten chemischen Datenbank (PubChem) nicht vorhanden waren. Für weitere 62 OTPs (37%) konnten nur Molekülformeln zugeordnet werden.

Generell wurde von den 36 OTPs mit Strukturvorschlägen nur ein OTP pro Ausgangs-MV detektiert (für 5-Methylbenzotriazol, Aliskiren, Amisulprid, Atenolol, Benzotriazol, Cetirizin, Clozapin, Diuron, Fenfluramin, Irbesartan, Napropamid, Phenazon, Tramadol, Trimethoprim, Valsartansäure). Für Clarithromycin und Metoprolol wurden je 2 OTPs, für Sitagliptin 4 OTPs und für Hydrochlorothiazid 5 OTPs gefunden. Für weitere 5 OTPs war die Zuordnung der Ausgangs-MV nicht möglich.

Im Folgenden ist an einem Beispiel kurz aufgezeichnet, wie die Strukturaufklärung eines OTPs zustande kam (siehe Abbildung 14). Die von MetFrag vorgeschlagenen sechs wahrscheinlichsten Strukturen dieses OTPs (RP-neg_2; profile 1183) enthielten alle einen Tetrazol-Ring, der an ein Benzol gebunden war, was auf ein OTP hinweist, das mit einem der gespikten Sartane (d.h. Candesartan, Irbesartan, Valsartan und Valsartansäure) verwandt ist. Die berechnete Strukturähnlichkeit zwischen den vorgeschlagenen OTPs und den Sartanen war mit Ausnahme von Valsartansäure im Allgemeinen gering. Die Massen von Candesartan, Irbesartan und Valsartan liegen zwischen 428.2320 und 440.1590, was erheblich größer ist als das vorgeschlagene OTP (m/z 189.0416, RT 13.7). Im Gegensatz dazu ist Valsartansäure (m/z 266.0800) viel kleiner. Daher wird postuliert, dass das OTP aus Valsartansäure gebildet wurde, wie mit der Software O3-PPD vorhergesagt. Es handelt sich dabei um das OTP, welches von MetFrag als Top1 Kandidat vorgeschlagen wurde (Konfidenzniveau 2b), weil es die meisten gemessenen Fragmente erklärt.

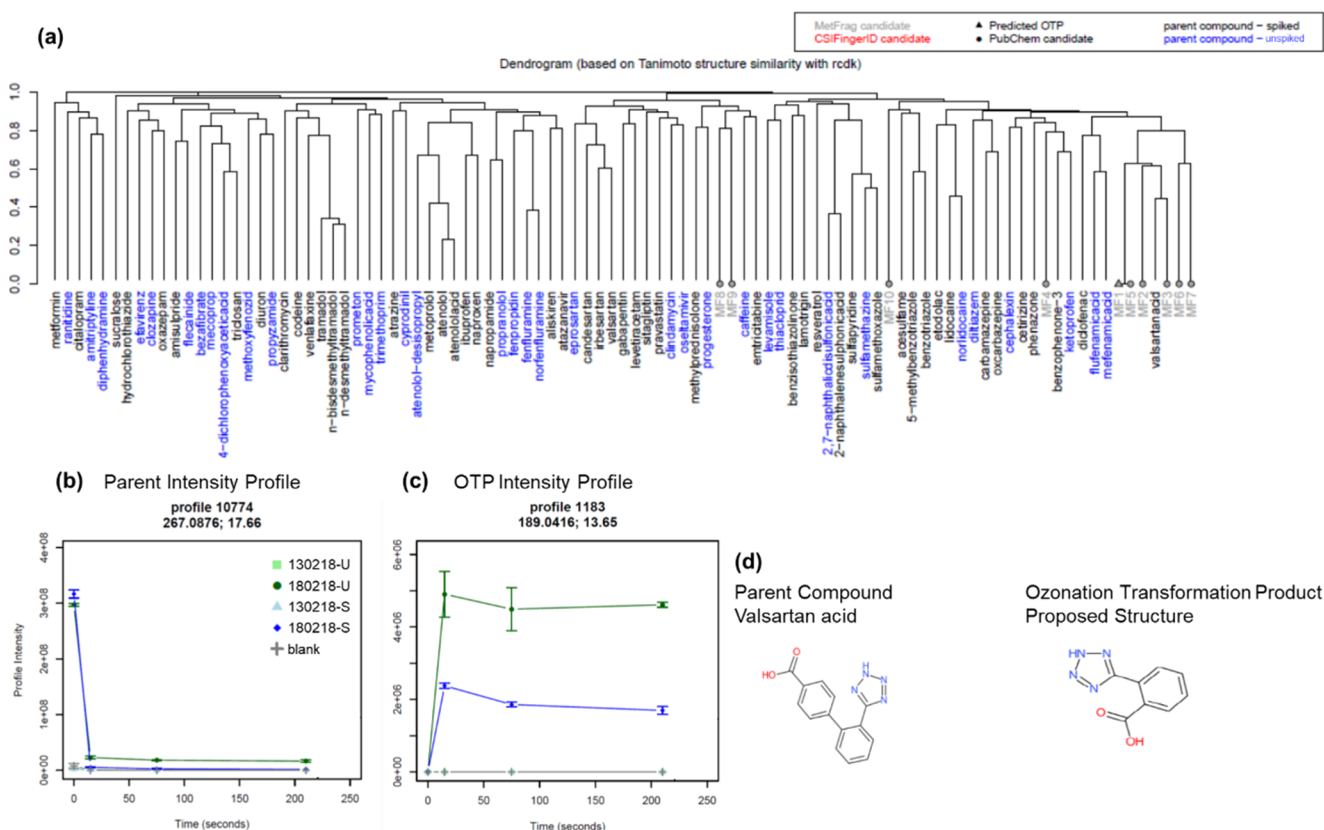


Abbildung 14 Strukturaufklärungsnachweis für ein mögliches OTP (RP-neg_2; Profil 1183) mit m/z 189.0416 bei negativer Elektrospray-Ionisation und Retentionszeit von 13.65 Min. in der Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie. (a) Die Strukturähnlichkeit zwischen den Top 20 der vorgeschlagenen OTP-Strukturen (angezeigt durch graue und rote Kreise und Dreiecke) und 85 Ausgangs-MVs (50 gespickt und 35 nicht gespickt in Laborexperimenten) wird in einem Dendrogramm sichtbar gemacht. Je näher ein Zweig an 0 (auf der y-Achse) divergiert, desto größer ist die Ähnlichkeit zwischen den Strukturen (Namen auf der x-Achse). (b) Intensitätsprofil des vorgeschlagenen Ausgangs-MV (Valsartansäure) in den Ozonungsexperimenten. (c) Intensitätsprofil des OTP-Kandidaten. "U" kennzeichnet normale Abwasserproben und "S" mit MV gespickte Proben. (d) Struktur der wahrscheinlichen MV-Ausgangsverbindung und die vorgeschlagene OTP-Struktur.

Der Erfolg bei der Strukturzuweisung variierte zwischen den verschiedenen Messmodi. Fast die Hälfte (15 OTPs, 42%) der OTPs mit wahrscheinlicher oder möglicher Struktur wurden mit RP-pos detektiert, während nur ein OTP mit HILIC-pos detektiert wurde (siehe Tabelle 4). Mehrere Faktoren könnten zu diesem Unterschied beigetragen haben. Erstens wurden mit HILIC gemessene Proben im Vergleich zu RPLC-Messungen um einen Faktor 10 verdünnt, was zu weniger intensiven und qualitativ schlechteren MS/MS-Spektren führte. Daher war auch die Reinheit der Spektren (msPurity) in HILIC-pos wesentlich geringer. Zweitens wurde zur Strukturaufklärung nur das $[M+H]^+$ -Addukt berücksichtigt, und nicht auch das Ammonium-Addukt, welches aufgrund der Zugabe von Ammoniumformiat in das HILIC-Elutionsmittel möglich ist.

Im negativen ESI-Modus wurde im Vergleich zum positiven ESI-Modus ein geringerer Erfolg bei der Strukturzuweisung beobachtet, und die Anzahl der Kandidaten mit nur exakter Masse (Level 5) betrug rund 50% im negativen ESI-Modus vs. 20% im positiven ESI-Modus, unabhängig von der Chromatographiemethode. Diese Unterschiede spiegeln wahrscheinlich die Unterschiede in der Menge der Trainingsdaten wider, die für die Strukturaufklärungssoftware in den einzelnen Ionisationsmodi verfügbar sind, weil viele Projekte zur Strukturaufklärung sich nur auf Daten von positivem ESI konzentrieren.

Zu einer besseren Strukturaufklärung könnten vor allem bessere (bzw. eine erhöhte Anzahl von) MS/MS-Spektren beitragen. Die Hauptprobleme bestehen jedoch in der Zuweisung von MS/MS-Fragmenten zu den Strukturkandidaten. Eine bessere Qualität der MS/MS-Spektren könnte auch durch Anreicherung der Proben erreicht werden. Dies bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass OTPs dabei verloren gehen können, wenn sie nicht an der verwendeten Festphase in der Festphasenextraktion sorbieren. Mehr Messungen und eine bessere *in-silico* Fragmentierung im negativen ESI-Modus würden ebenfalls zur besseren Strukturaufklärung beitragen.

Auf der Seite des Vorhersagemodelles könnte eine Gewichtung der vorhergesagten OTPs, z.B. durch Einbezug der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, zu einer Priorisierung der wahrscheinlicheren OTPs beitragen, und somit die Anzahl der falsch-positiven OTPs reduzieren. Ebenso könnte der Einbezug von neuen Erkenntnissen aus Ozonungsversuchen, insbesondere auch der entstehenden Produkte durch Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen, die Lücken in der OTP Vorhersage füllen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass mit der entwickelten Methode, welche auf Labor-experimenten und HRMS/MS-Messungen basiert, unter Zuhilfenahme von vorhergesagten OTP-Strukturen und *in silico* Strukturaufklärung, wahrscheinliche OTP-Strukturen erfolgreich und automatisiert zugeordnet werden können.

4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Dieses Projekt hatte zum Ziel, Abwasserbehandlungsstufen mit Ozon gefolgt von Aktivkohlebehandlung oder nur mit granulierter Aktivkohle-Filtration durch Non-target Analytik und Biotests zu evaluieren. Im Weiteren wurde mit einem gezielten Suspect Screening nach Ozonungs-Transformationsprodukten gesucht und deren Verhalten in der Nachbehandlung untersucht. Für die Probenbeschaffung wurden Synergien mit laufenden Projekten auf den drei Kläranlagen ProReno, Glarnerland und Altenrhein genutzt.

4.1 Evaluierung der Abwasserbehandlungsstufen mit der Non-target Analytik

Für die Evaluierung des Verhaltens der Non-target Substanzen über die verschiedenen Abwasserbehandlungsstufen wurde eine robuste, automatisierte Methode entwickelt, welche viele falsch-positive Signale und einen Teil der Signale der Matrix-Komponenten (homologe Reihen) ausschliesst. Insgesamt konnten mit dieser Methode 50'722 Non-target Substanzen in den Kläranlagen detektiert werden.

Es hat sich gezeigt, dass die Non-target Substanzen vom Zulauf der Kläranlagen während der Abwasserbehandlung stark reduziert wurden, sich aber viele neue Substanzen bildeten, die im Ablauf der Kläranlage rund die Hälfte der Non-target Substanzen ausmachten. Allerdings wiesen die neugebildeten Substanzen viel geringere Intensitäten auf und sind damit vermutlich geringer konzentriert.

Das Verhalten der Non-target Substanzen wurde mit zwei verschiedenen Auswertungsmethoden ausgewertet. Zusätzlich wurde eine Auswahl von 66 bekannten, abwasserrelevanten Mikroverunreinigungen (66MV) und die quantifizierten 12 Leitsubstanzen (12LS) untersucht und verglichen. Zuerst wurde die «durchschnittliche Elimination» berechnet. Viele Non-target Substanzen vom Zulauf wurden bereits in der Biologie sehr gut entfernt (>77%), und die verschiedenen untersuchten weitergehenden Behandlungsstufen zeigten in den vorhandenen Proben relativ kleine Unterschiede. Aussagekräftiger war die Auswertung der 66MV. Die 66MV und 12LS verhielten sich recht ähnlich, wobei die 12LS über die ganze ARA leicht besser als die 66MV entfernt wurden. In der biologischen Stufe wurden die 66MV und 12LS im Durchschnitt zu weniger als 40% eliminiert. Dies deutet darauf hin, dass viele der Non-target Substanzen matrixbezogene Verbindungen sind und/oder dass die 66MV auf Verbindungen ausgerichtet sind, die während der biologischen Behandlung persistent sind. Die Elimination beider Gruppen zeigte eine Abhängigkeit von der Ozondosierung (durchschnittliche Elimination 20-40% bei 0.2 gO₃/gDOC, ca. 60% bei 0.3 gO₃/gDOC; die Non-target Substanzen zeigten ebenfalls eine durchschnittliche Elimination von 30-40%, aber unabhängig von der Ozondosis). Die Elimination der 66MV & 12LS über den GAK-Filter nahm mit der Laufzeit ab (durchschnittliche Elimination im Bereich 90-60% bei 8'000-48'000 BV, Non-target Substanzen generell 50-70%). Der GAK-Filter nach der Ozonung eliminiert auch nach einer sehr langen Laufzeit von 48'000 BV noch eine recht grosse Anzahl von Non-target Substanzen wie auch Substanzen der 66MV & 12LS. Bei der PAK-Dosierung auf einen Sandfilter zeigte sich nur eine schwache Abhängigkeit von der PAK-Dosis (durchschnittliche Elimination der 66MV & 12LS von 60-80% mit 7.7-12.5 mg/L PAK, Non-target Substanzen generell 40-45%). Insgesamt wurde in allen Proben eine durchschnittliche Elimination von >80% über die gesamte ARA für die Non-target Substanzen und die Auswahl an MVs erreicht, ausser beim GAK-Filter ohne Vorozonung, wo die 66MV und 12LS auf der ARA Glarnerland nur bis 17'000 BV zu >80% entfernt werden konnten.

Die Auswertung der Non-target Substanzen als «durchschnittliche Elimination» kann die wahre Elimination unterschätzen, wenn eine Substanz nach der Behandlungsstufe unter die Bestimmungsgrenze fällt. Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz eine Auswertungsmethode gewählt, in welcher zwischen Substanzen unterschieden wurde, die >80% eliminiert wurden, und solchen, die zu weniger als 80% eliminiert wurden. Mit dieser Auswertungsmethode zeigte sich aber ein sehr ähnliches Bild wie mit der durchschnittlichen Auswertung. In der Biologie wurden bereits 66-81% der Non-target Substanzen >80% eliminiert (6-42% der 66MV). Es wurden ebenfalls keine grossen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen weitergehenden Behandlungen für die Non-target Substanzen beobachtet. Über die ganze ARA wurden in allen Behandlungen mehr als 80% der Non-target Substanzen und der 66MV zu >80% entfernt, ausser bei der GAK-Filtration ohne Vorozonung ab 17'000 BV.

Die Resultate zeigen, dass mit der Non-target Analytik die weitergehenden Verfahren nur bedingt evaluiert werden können, weil sich keine grossen Unterschiede in den verschiedenen Behandlungen zeigten. Aussagekräftiger war jedoch die Auswertung der 66MVs. Für diese Stoffe, die nur schlecht biologisch abgebaut wurden, erhöhte die weitergehende Behandlung die Elimination über die ganze ARA signifikant, und eine Unterscheidung der Behandlungsstufen war möglich. Deren durchschnittliche Elimination war vergleichbar mit derjenigen der 12LS. Die weitergehende Behandlung mit Vorozonung und Aktivkohle erscheint als vielversprechende Verfahrenskombination, insbesondere die Kombination mit einem GAK-Filter, der auch bei 48'000 BV noch signifikante Eliminationsleistung zeigte. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen aus den breit angelegten Pilotprojekten mit GAK-Filtern auf der ARA Furt/Bülach (Böhler et al. 2020a) und der ARA Glarnerland (McArdell et al. 2020).

Die Proben der ARA ProRhenno ermöglichten mit der Non-target Analytik die Bestimmung einiger industriell eingetragenen Substanzen. Insgesamt konnten 54 Substanzen mittels MS-Spektrenbibliotheken identifiziert werden, die in der ganzen Abwasserbehandlung zu >97% entfernt, so dass auf eine eindeutige Identifizierung mit Referenzsubstanz verzichtet wurde.

4.2 Evaluierung der Abwasserbehandlungsstufen mit Biotests

Mit den Biotests kann evaluiert werden, ob problematische Stoffe vorhanden sind oder zum Beispiel in der Ozonung entstehen und ob sie durch weitere Behandlungen wieder eliminiert werden können.

Auf den ARA ProRhenno und Altenrhein wurden beim kombinierten Algentest und beim Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen keine Auffälligkeiten beobachtet. Die Werte waren im Bereich von früheren Messungen auf kommunalen ARA.

Auf der ARA Glarnerland zeigten der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen und der Ames-Fluktuationstest keine deutliche Änderung zwischen Ablauf NKB und Ablauf der Pilotanlage nach den GAK-Filtern. Es wurde jedoch im Ablauf NKB eine aussergewöhnlich hohe Photosynthese- und Wachstumshemmung der Grünalgen gemessen, die über die Ozonung und den GAK-Filter deutlich abnahm (86-100% Elimination). Die gemessene Photosynthesehemmung korreliert sehr gut mit den gemessenen Konzentrationen an Diuron. Diese rührten von einem industriellen Betrieb her, der Zement-Produkte herstellt. Nach Kontaktaufnahme der Eawag mit dem Hersteller beschloss dieser ab etwa 2020 vollständig auf den Einsatz der Biozide zu verzichten.

Im Ames-Fluktuationstest zeigte sich nach der Ozonung in der Pilotanlage eine sehr hohe Mutagenität, die jedoch über die GAK-Filter wieder auf gleiche oder sogar tiefere Werte als vor der Ozonung reduziert wurde. Die Ursache der hohen Mutagenität nach der Ozonung konnte

nicht geklärt werden. Sie könnte im Zusammenhang mit den Industrieeinleitern im Einzugsgebiet stehen. Aufgrund dieser ungeklärten Auffälligkeit wurde, nach Diskussion mit dem BAFU, entschieden, dass die Ozonung als Verfahren für den Standort ARA Glarnerland nicht geeignet ist.

Auf der ARA Altenrhein war ebenfalls eine geringe bis mittlere Mutagenität nach der Ozonung vorhanden, diese wurde jedoch durch GAK, auch bei sehr hohen BV, wieder eliminiert.

Bei PAK+SF auf der ARA ProRheno ist die Aussage etwas schwieriger, vor allem wegen der unerwartet hohen Mutagenität im Sandfilter. Die Ursache für diese hohe Mutagenität konnte nicht gefunden werden, allerdings zeigte sich im Vergleich mit einem neuen Sandfilter, dass die Effekte auf den verwendeten Pilotsandfilter zurückzuführen sind. So zeigt das Projekt auch, dass die Messung der Toxizität wichtige zusätzliche Aspekte abdeckt. Diese sollte regelmässig einbezogen werden, da unerwartete Effekte auftreten können.

Die Identifikation der Stoffe bzw. Stoffmischungen, die für die Wirkung verantwortlich sind, ist bei *in vivo*-Biotests, wie dem Wasserfloh-Fortpflanzungstest, und auch dem Ames-Fluktuationstest schwierig. Beim kombinierten Algentest zeigten bisherige Studien eine gute Korrelation zwischen gemessenen Konzentrationen von PSII-Hemmstoffen und Effekten auf die Photosynthese (z.B. Kienle et al. 2019). Beispielsweise war auf der ARA Glarnerland ein Grossteil der gemessenen PSII-Hemmung durch die Konzentration an Diuron in den Abwasserproben erklärbar.

Die Biotests bringen wichtige zusätzliche Erkenntnisse (v.a. in Bezug auf Mutagenität und Algentoxizität), die für die Entscheidung für oder gegen die Wahl einer bestimmten Reinigungsstufe (v.a. Ozonung) zentral sind (Beispiel ARA Glarnerland).

4.3 Ozonungs-Transformationsprodukte und deren Verhalten in der Nachbehandlung

Ozonungs-Transformationsprodukte wurden mit drei verschiedenen Methoden identifiziert. Mit der Non-target Analytik wurden 1911 Non-target Substanzen identifiziert, welche den Trend einer Zunahme in der Ozonung zeigten. Davon wurden 53 auch in anderen Studien als OTPs von bekannten MVs gefunden. Unter den restlichen in der Ozonung entstandenen Non-target Substanzen sind wohl auch viele Transformationsprodukte der organischen Matrix.

In einem weiteren Ansatz wurde eine automatisierte Methode zum Auffinden von OTPs entwickelt, welche mit einem Vorhersagemodell (O3-PPD) anhand erwarteter Reaktionsmechanismen mit Ozon für eine Auswahl von MVs vorhergesagt wurden. Von den total 1857 nach der Ozonung detektierten OTPs in Batchexperimenten mit 50 dotierten MVs zeigten 167 genug gute MS/MS-Spektren für eine weitere Analyse, und davon konnten 36 möglichen OTP Kandidaten aus dem Vorhersagetool zugeordnet werden.

In einem dritten Ansatz konnten Synergien zu einem parallel laufenden Projekt (TRANSFO₃RM) genutzt werden, in welchem OTPs von 87 MVs zuerst in Laborexperimenten identifiziert werden konnten. Für 83 OTPs, die sowohl in den Laborexperimenten wie auch in Abwasserproben gefunden wurden, konnten chemische Strukturen vorgeschlagen werden.

Mit allen drei angewandten Methoden konnten bisher unbekannte OTPs detektiert werden. Diese sollten in zukünftigen Studien verwendet werden, um die Mechanismen der OTP-Bildung während der Ozonung besser zu verstehen und sowohl Ozon- als auch Hydroxylradikalreaktionen einzubeziehen. Dies wird die Vorhersagen verbessern und eröffnet die Möglichkeit, strukturelle Molekülteile (structural alerts) von OTPs zur Bewertung derer Toxizität zu nutzen (von Gunten 2018).

Der Verbleib der im Abwasser verifizierten OTPs wurde in den verschiedenen Abwasserbehandlungsstufen untersucht. Die gefundenen OTPs von 40 spezifischen MVs zeigten ein unterschiedliches Verhalten in der Nachbehandlung. Die OTPs waren mehrheitlich stabil im Sandfilter (89% stabil, 6% entfernt), zeigten eine mittlere Elimination im GAK-Filter abhängig von der Anzahl durchlaufener Bettvolumen, wobei bei 48'000 BV immer noch 23% entfernt wurden, und wiesen die beste Elimination mit einer Dosierung von 13 mg/L PAK auf einen Sandfilter auf (87%). Die Kombination einer Vorozonung mit Aktivkohlebehandlung zeigte sich als vielversprechende Abwasserbehandlungsmethode für die Entfernung von OTPs.

4.4 Probleme im Projekt und Output

Das Probenahme- und Versuchsdesign folgte den Möglichkeiten in Zusammenarbeit mit den Pilotprojekten auf den ARAs und entsprach auch dem Kenntnisstand zum Zeitpunkt des Projektvorschlags im Jahr 2016.

Grundsätzlich zeigten alle weitergehenden Behandlungsmethoden eine recht gute Eliminationsleistung der Non-target Substanzen, was es schwierig machte, (kleine) Unterschiede in den verschiedenen Behandlungen zu sehen, obwohl die entwickelte Non-target Methode sehr ausgereift ist und eine sehr grosse Robustheit aufweist.

Die Proben der ARA ProRhenon (welche im «Aktifilt Plus» Projekt genommen wurden) zeigten teilweise unerwartete Resultate, was die Interpretation schwieriger machte. Die Ozondosierung in diesen Versuchen war höher als die angepeilten 0.1-0.3 gO₃/gDOC. Dadurch waren die Konzentrationen der Substanzen nach der Ozonung relativ tief, sodass deren weitere Elimination in der Nachbehandlung mit PAK schwierig zu bewerten war. Unsere Studie stützte sich stark auf die Proben der ARA ProRhenon, weil hier verschiedenste Bedingungen (unterschiedliche Ozondosen, unterschiedliche PAK-Dosierungen) untersucht wurden. Durch die Probleme mit diesen Proben konnten wir in unserer Analyse leider nur auf eine deutlich kleinere Probenmenge als ursprünglich geplant für die Beurteilung der Verfahrensstufen zurückgreifen. Bei der Null-Dosierung von Ozon und PAK wurden sehr viele entstehende Signale beobachtet, was in dem Ausmass nicht erwartet wurde und schwierig zu interpretieren ist. Es handelt sich dabei wohl um biologische Abbauprodukte in den (mit Biofilm belegten) Ozonkolonnen und Sandfilter. Ein Teil sind eventuell auch falsch-positive Signale oder Probenahme-bedingte Abweichungen. Auf den ARA Altenrhein und Glarnerland ergaben sich bei ein paar GAK-Filtern, bedingt durch Regeneinflüsse, auch gewisse Unsicherheiten, die in die Auswertung reinspielten.

Trotz dieser «Probleme» konnten wir Schlussfolgerungen ziehen und unsere Ergebnisse sind wissenschaftlich sehr interessant. Alle Resultate der chemischen Analytik wurden bzw. werden in drei wissenschaftlichen Publikationen publiziert (Schollée et al. 2021a zur Charakterisierung des Abwassers (Ziel 1) ist in *Water Research* publiziert; Gulde et al. 2021a zum Verhalten der 84 OTPs (Ziel 2) ist in *Water Research* publiziert; Schollée et al. 2021b zum Screening nach vorhergesagten OTPs (Ziel 2) existiert in einer vollständigen Version und wird demnächst eingereicht).

Wegen der relativ kleinen Datenmenge aufgrund der aufgezeichneten Probleme und dem unerwarteten Ergebnis, dass mit der Non-target Analytik die verschiedenen Verfahren nur bedingt evaluiert werden können, ist es jedoch schwierig, einen Aqua&Gas Artikel zu schreiben, der für die Anwender und den Vollzug interessant wäre. Es ist zu diskutieren, ob Teile dieses Projektes zusammen mit anderen Ergebnissen in einem späteren Aqua&Gas Artikel publiziert werden können.

Abbildungen

- Abbildung 1** Schema der Pilotanlagen zur erweiterten Abwasserbehandlung in den vier beprobten Kläranlagen..... 6
- Abbildung 2** Durchschnittliche relative Elimination von Substanzen in den einzelnen Stufen in drei verschiedenen ARAs. Non-target Substanzen, 66 Mikroverunreinigungen, 12 Leitsubstanzen; negative Eliminationen wurden jeweils auf «0» gesetzt. GL: ARA Glarnerland ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000 BV). PR: ARA ProRhenno ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.1-0.2 gO₃/gDOC) und 7.7 – 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie). 13
- Abbildung 3** Anzahl Non-target Substanzen in der Abwasserbehandlung (INF: Zulauf, BIO: nach biologischer Behandlung, OZO: nach Ozonung, EFF: nach Nachbehandlung). Non-target Substanzen, welche zu mehr als 80% entfernt wurden (z.B. from influent, removed >80%) werden dabei von Substanzen unterschieden, die weniger als 80% entfernt wurden (z.B., from influent). Non-target Substanzen, welche nicht mehr detektiert wurden, werden nicht mehr angezeigt. GL: ARA Glarnerland ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000 BV). PR: ARA ProRhenno ohne (noO₃) und mit Vorozonung (0.1-0.2 gO₃/gDOC) und 7.7 – 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie). 15
- Abbildung 4** Verhalten und Elimination der Substanzen vom Zulauf der ARAs in jeder Stufe der Abwasserbehandlung (BIO: in biologischer Behandlung, OZO: in Ozonung, AC: in Nachbehandlung mit Aktivkohle). (a) Non-target Substanzen und (b) 66 Mikroverunreinigungen (MV). Die Farben zeigen, in welcher Stufe wieviel Prozent der Substanzen vom Zulauf der ARA zu mehr als 80% wurden, bzw. welche als persistent gelten (violett) und im Ablauf der ARA noch vorhanden waren. GL: ARA Glarnerland ohne und mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 7'500 und 32'000 Bettvolumen (BV)). AR: ARA Altenrhein mit Vorozonung (0.2 gO₃/gDOC) und GAK-Filter (bei 44'000 BV). PR: ARA ProRhenno ohne und mit Vorozonung (0.1-0.2 gO₃/gDOC) und 7.7 – 13.6 mg/L PAC (rückgeführt in Biologie). 16
- Abbildung 5** Intensitätsprofile zweier potentiellen Industrie-Chemikalien im Zulauf der ARA ProRhenno (Konfidenzniveau 2b) (a) 18β-Glycyrrhetinsäure und (b) Praziquantel. Auf der x-Achse ist das Datum der Probenahme und auf der y-Achse die absolute Intensität des Signals aufgetragen. Bei der anschließenden Abwasserbehandlung werden beide Substanzen entfernt, 18β-Glycyrrhetinsäure vollständig in der biologischen Behandlung, Praziquantel teilweise in der biologischen Behandlung (77 % Intensitätsreduktion) und vollständig bei der Behandlung mit Ozonung gefolgt von PAK+SF. 17
- Abbildung 6** Kombiniertes Algentest: Photosynthesehemmung (Diuron-Äquivalenzkonzentration, DEQ, ng/L, links) und Wachstumshemmung (Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (Basis-TEQ, mg/L), rechts). A: ARA Altenrhein (AR), B: ARA ProRhenno (PR). 18
- Abbildung 7** Kombiniertes Algentest: Photosynthesehemmung (Diuron-Äquivalenzkonzentration, DEQ, ng/L, links) und Wachstumshemmung (Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (Basis-TEQ, mg/L), rechts) auf der ARA Glarnerland..... 19
- Abbildung 8** Photosynthesehemmung nach 2 Std. (Diuron-Äquivalenzkonzentration DEQ, links) und Wachstumshemmung nach 24 Std. (Basis-TEQ, rechts) im kombinierten Algentest der sechs Proben im Ablauf Nachklärbecken (BIO) in ARA Glarnerland (GL) vom Juni 2017 im Vergleich zu BIO-Messungen aus anderen Studien in der Schweiz (Daten von 27 ARA). 19
- Abbildung 9** Vergleich der Diuron-Äquivalenz-Konzentrationen aus der Photosynthesehemmung im Algentest (DEQ_{bio}) mit der gemessenen Diuron-Konzentrationen (Diuron_{chem}) in 6 Proben auf der ARA Glarnerland..... 20

Abbildung 10	Ames-Fluktuationstest (Stamm TA98-S9) auf (A) ARA Altenrhein (AR) und (B) ProReno (PR): Mutagenität der Proben vom 5. Sept. 2018 (AR) und vom 18.-20. Juli 2017 (PR) vor der Ozonung (BIO), nach der Ozonung mit 0.3 gO ₃ /gDOC (OZO) und nach AC (AR: GAK-Filter bei ca. 48'000 BV, PR: PAK/SF).	21
Abbildung 11	Mutagenität der Proben vom 21.-22. Juni 2017 auf der ARA Glarnerland vor der Ozonung (BIO), nach der Ozonung mit 0.2 gO ₃ /gDOC (OZO) und nach AC (GAK-Filter 3a bei ca. 9'000 BV).	22
Abbildung 12	Verhalten von OTPs in verschiedenen Nachbehandlungen, die entsprechend ihrer relativen Signalreduktion drei Kategorien zugeordnet wurden: entfernt, stabil und gebildet (siehe Text für Definition). Zwei Kampagnen auf der ARA Neugut mit einem biologischen Sandfilter (SFa und SFb), drei Kampagnen auf der ARA Glarnerland mit einem GAK-Filter beprobt bei GAK1a: 16'000 Bettvolumen (BV), GAK1b: 25'000 BV, GAK1c: 35'000 BV, eine Kampagne auf der ARA Altenrhein mit einem GAK-Filter beprobt bei GAK2: 48'000 BV, und eine Kampagne auf der ARA ProReno mit 13 mg/L PAK dosiert auf einen Sandfilter (PAK).	24
Abbildung 13	Verteilung der detektierten Substrukturen in den Ausgangs-MVs und den vorhergesagten OTPs der ersten, zweiten und dritten Generation (1st Gen, 2nd Gen, 3rd Gen). Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Strukturen mit dieser Substruktur relativ zur Gesamtzahl der Verbindungen dieser Gruppe (d.h. der Ausgangs-MVs, der OTP der ersten, zweiten oder dritten Generation) aufgetragen.	26
Abbildung 14	Strukturaufklärungsnachweis für ein mögliches OTP (RP-neg_2; Profil 1183) mit m/z 189.0416 bei negativer Elektrospray-Ionisation und Retentionszeit von 13.65 Min. in der Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie. (a) Die Strukturähnlichkeit zwischen den Top 20 der vorgeschlagenen OTP-Strukturen und 85 Ausgangs-MVs (50 gespickt und 35 nicht gespickt in Laborexperimenten) wird in einem Dendrogramm sichtbar gemacht. (b) Intensitätsprofil des vorgeschlagenen Ausgangs-MV (Valsartansäure) in den Ozonungsexperimenten. (c) Intensitätsprofil des OTP-Kandidaten. (d) Struktur der wahrscheinlichen MV-Ausgangsverbindung und die vorgeschlagene OTP-Struktur.	28

Tabellen

Tabelle 1	Probenahmestandorte und -einstellungen, einschließlich der Probenahmedaten und -Kampagnen, der Zulaufmengen, des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) nach der biologischen Behandlung, der angewendeten spezifischen Ozondosis und der Einstellungen der jeweiligen Nachbehandlung, entweder Sandfilter (SF), granulierter Aktivkohlefilter (GAK) inklusiv durchlaufene Bettvolumen (BV), oder Pulver-Aktivkohle (PAK), die auf einen Sandfilter dosiert wurde.	7
Tabelle 2	Ames-Fluktuationstest auf den ARA Altenrhein und ProReno: Beurteilung der Mutagenität des biologisch behandelten (BIO), des ozonierten (OZO) und des mit Aktivkohle (AC, AR: ca. 44'000-48'000 BV, PR: PAK/SF) behandelten Abwassers auf den Pilotanlagen.	21
Tabelle 3	Ames-Fluktuationstest (Stamm TA98-S9) auf der ARA Glarnerland: Beurteilung der Mutagenität des biologisch behandelten (BIO), des ozonierten (OZO) und des mit GAK3a (bei ca. 9000 BV) behandelten Abwassers auf der Pilotanlage.	22
Tabelle 4	Zusammenfassung der Priorisierung und Strukturaufklärung der OTPs in den folgenden vier Messmodi: (1) RP-pos: Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (RPLC) und positive Elektrospray-Ionisation (ESI); (2) RP-neg: RPLC und negativer ESI; (3) HILIC-pos: Flüssigkeitschromatographie mit hydrophiler Wechselwirkung (HILIC) und positiver ESI; (4) HILIC-neg: HILIC und negativer ESI.	27

Literatur

- Abegglen, C., Siegrist, H. (2012). Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 1214: 210 S.
- AFNOR (2000). AFNOR NF T 90-376, Water quality - determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test. A.F.d. Normalisation, Saint Denis.
- Anliker, S., Loos, M., Comte, R., Ruff, M., Fenner, K. and Singer, H. (2020). Assessing Emissions from Pharmaceutical Manufacturing Based on Temporal High-Resolution Mass Spectrometry Data. *Environmental Science & Technology* 54(7), 4110-4120.
- Benstöm, F. (2017). Granulierte Aktivkohle zur Elimination organischer Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser, Fakultät für Bauingenieurwesen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, RWTH Aachen, Deutschland
- Benstöm, F., Nahrstedt, A., Böhler, M., Knopp, G., Montag, D., Siegrist, H. und Pinnekamp, J. (2016a). Leistungsfähigkeit granulierter Aktivkohle zur Entfernung organischer Spurenstoffe aus Abläufen kommunaler Kläranlagen, Ein Überblick über halbtechnischer und volltechnischer Untersuchungen – Teil 1: Veranlassung, Zielsetzung und Grundlagen, *Korrespondenz Abwasser, Abfall*, 2016 (63) – Nr. 3, S. 187 – 192.
- Benstöm, F., Nahrstedt, A., Böhler, M., Knopp, G., Montag, D., Siegrist, H. und Pinnekamp, J. (2016b). Leistungsfähigkeit granulierter Aktivkohle zur Entfernung organischer Spurenstoffe aus Abläufen kommunaler Kläranlagen, Ein Überblick über halbtechnischer und volltechnischer Untersuchungen – Teil 2: Methoden, Ergebnisse und Ausblick, *Korrespondenz Abwasser, Abfall*, 2016 (63) – Nr. 4, S. 267 – 289.
- Bourgin, M., Beck, B., Boehler, M., Borowska, E., Fleiner, J., Salhi, E., Teichler, R., von Gunten, U., Siegrist, H., McArdell, C.S. (2018). 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*, 129, 486-498, doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.036.
- Böhler, M., Blunski, M., Czekalski, N., Fleiner, J., Kienle, C., Langer, M., McArdell, C.S., Teichler, R. und Siegrist, H. (2017a). Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung - ReTREAT, Abschlussbericht für das Bundesamt für Umwelt (BAFU) im Rahmen eines Projektes der Technologieförderung, Eawag, Dübendorf.
- Böhler, M., Fleiner, J., McArdell, C.S., Teichler, R., Siegrist, H., Kienle, K., Langer, M. und Wunderlin, P. (2017b). Projekt ReTREAT – Untersuchungen zur biologischen Nachbehandlung nach Ozonung, *Aqua & Gas*, Nr. 5, 54-63.
- Böhler, M., Hernandez, A., Baggenstos, M., McArdell, C.S., Siegrist, H., Joss, A. (2020a). Elimination von Spurenstoffen durch granulierte Aktivkohle-Filtration (GAK): Grosstechnische Untersuchungen auf der ARA Furt, Bülach, Schlussbericht Eawag, Dübendorf, Schweiz. <https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag%3A21845>.
- Böhler M., Joss A., McArdell C., Meier A. (2020b). Hinweise zur Planung und Auslegung von diskontinuierlich gespülten GAK-Filtern zur Elimination organischer Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Konsenspapier zum Ergebnis eines Workshops mit Fachexperten aus der Schweiz und Deutschland, Eawag und VSA, Dübendorf. <https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag%3A21003>.
- Boehler, M., Zwickenspflug, B., Hollender, J., Ternes, J., Joss, A. and Siegrist, H. (2012). Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. *Water Science and Technology*, Vol. 66 Issue 10, 2115-21.
- Bogler, S. (2019). Abatement of organic micropollutants during ozonation and activated carbon filtration in WWTP Altenrhein, Swiss Federal Institute of Technology (ETH Zürich) and Eawag, Dübendorf, Switzerland.
- Borowska, E., Bourgin, M., Hollender, J., Kienle, C., McArdell, C.S. and von Gunten, U. (2016). Oxidation of cetirizine, fexofenadine and hydrochlorothiazide during ozonation: Kinetics and formation of transformation products. *Water Res.* 94, 350-362.

- Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J. and Tchobanoglous, G. (2005). *Water Treatment: Principles and Design*, Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.
- Escher, B. I., R. Altenburger, S. Aït-Aïssa, P. Behnisch, F. Brion, S. Buchinger, W. Busch, W. Brack, K. Hettwer, K. Hilscherová, H. Hollert, R. Kase, C. Kienle, J. Legradi, R. Schlichting, E. Vermeirssen and P. A. Neale (2018). Effect-based trigger values for in vitro bioassay supporting the environmental quality standards of the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment* 628-629, 748-765.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E.L.M. (2008). Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *Journal of Environmental Monitoring* 10(5), 612-621.
- 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 Research*, 95, 240-249. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.009>.
- Fundneider, T. (2020). „Filtration und Aktivkohleadsorption zur weitergehenden Aufbereitung von kommunalem Abwasser – Phosphor- und Spurenstoffentfernung –“. Dissertation. Technische Universität Darmstadt. Schriftenreihe IWAR (259). ISBN 978-3-940897-60-2. Verein zur Förderung des Instituts IWAR der TU Darmstadt e.V., Darmstadt.
- Fux, C., Kienle, C., Joss, A., Wittmer, A., Frei, R. (2015). Ausbau der ARA Basel mit 4. Reinigungsstufe. Pilotstudie: Elimination Mikroverunreinigungen und ökotoxikologische Wirkungen. *Aqua & Gas* 7/8:10-16.
- García, R.A., Chiaia-Hernández, A.C., Lara-Martin, P.A., Loos, M., Hollender, J., Oetjen, K., Higgins, C.P. and Field, J.A. (2019). Suspect Screening of Hydrocarbon Surfactants in AFFFs and AFFF-Contaminated Groundwater by High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology* 53(14), 8068-8077.
- Grelot, J., Wunderlin, P., Bleny, H. (2020). Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung - Erkenntnisse aus mehrjährigen Erfahrungen. *Aqua&Gas* 10.
- Gulde, R., Rutsch, M., Clerc, B., Schollée, J.E., von Gunten, U., McArdell, C.S. (2021a). Formation of transformation products during ozonation of secondary wastewater effluent and their fate in post-treatment: From laboratory- to full-scale. *Water Research*, 200, 117200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117200>.
- Gulde, R., Clerc, B., Rutsch, M., Helbing, J., McArdell, C.S. von Gunten, U. (2021b). Oxidation of micropollutants during drinking water ozonation: Formation of transformation products and their fate during biological post-filtration. In preparation.
- Hübner, U., Seiwert, B., Reemtsma, T. and Jekel, M. (2014). Ozonation products of carbamazepine and their removal from secondary effluents by soil aquifer treatment - Indications from column experiments. *Water Res.* 49, 34-43.
- International Organization for Standardization (2007). *Water quality -- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)*. ISO 15088:2007.
- International Organization for Standardization (2012). *Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and wastewater -- Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)*. ISO 11350.
- Kienle, C., Baumberger, D., Läubli, B., Schifferli, A., Werner, I. (2013). Evaluation der Ökotoxizität von Kläranlagenabwasser der ARA Basel mit Biotests vor und nach der Anwendung erweiterter Abwasserbehandlungsmethoden - Folgeprojekt. Abschlussbericht. Dübendorf: Oekotoxzentrum, Eawag/EPFL. 37 S.
- Kienle, C., Kase, R., Werner, I. (2011). Evaluation of bioassays and wastewater quality - In vitro and in vivo bioassays for the performance review in the project "Strategy Micropoll". Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kienle, C., Langer, M., Ganser, B., Gut, S., Schifferli, A., Thiemann, C., Vermeirssen, E., Werner, I. (2017). Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests. Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU). Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.

- Kienle, C., Santiago, S., Olbrich, D., Vermeirssen, E.L.M. (2020). Untersuchung von Abwasser der ARA Basel im Ames-Fluktuationstest und im Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen. Abschlussbericht. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Dübendorf.
- Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I. (2018). Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests - Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Fließgewässern. *Aqua und Gas* 4, 40-48.
- Kienle, C., Vermeirssen, E.L.M., Schifferli, A., Singer, H., Stamm, C. Werner, I. (2019). Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams – Unravelling the contribution of chemicals causing effects. *PLOS ONE* 14(12), e0226278.
- Krahnstöver, T., Wintgens, T. and Deininger, P. (2018). Spurenstoffentfernung durch die Kombination von Ozonung und Pulveraktivkohleadsorption mit anschließender Raumfiltration («Aktifilt Plus»), Fachhochschule Nordwestschweiz FHNW, Muttenz.
- Lee, M., Blum, L.C., Schmid, E., Fenner, K. and von Gunten, U. (2017). A computer-based prediction platform for the reaction of ozone with organic compounds in aqueous solution: kinetics and mechanisms. *Environ. Sci. Process. Impacts* 19, 465-476.
- Lee, M., von Gunten U. (2018). The abatements of micropollutants in comparison with indicator substances during enhanced wastewater treatment process: compilation of pilot-/full-scale campaign data for enhanced wastewater treatment process using ozonation and powdered activated carbon treatment in Switzerland. Bafu report.
- Magdeburg, A., Stalter, D., Schlusener, M., Ternes, T., Oehlmann, J. (2014). Evaluating the efficiency of advanced wastewater treatment: target analysis of organic contaminants and (geno-)toxicity assessment tell a different story. *Water Res* 50:35-47.
- Mairinger, T. (2019). Advancing a full picture on water-soluble synthetic polymers in wastewater- different ionization strategies for homologue series detection, Atlanta, GA, USA.
- Mairinger, T., Loos, M. and Hollender, J. (2021). Characterization of water-soluble synthetic polymeric substances in wastewater using LC-HRMS/MS. *Water Research* 190, 116745.
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., de Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chevre, N., Scharer, M. and Barry, D.A. (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *The Science of the total environment* 461-462, 480-498.
- McArdell, C.S., Böhler, M., Hernandez, A., Oltramare C., Büeler A., Siegrist, H. (2020). Pilotversuche zur erweiterten Abwasserbehandlung mit granulierter Aktivkohle (GAK) und kombiniert mit Teilozonung (O3/GAK) auf der ARA Glarnerland (AVG), Ergänzende Untersuchungen zur PAK-Dosierung in die biologische Stufe mit S::Select®-Verfahren in Kombination mit nachfolgender GAK. Schlussbericht Eawag, Dübendorf, Schweiz. <https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag%3A21543>.
- Oltramare, C., Hernandez, A., Mangold, S., Boehler, M. and McArdell, C.S. (2021). Abatement of micropollutants in granular activated carbon (GAC) filters with and without pre-ozonation in a pilot scale study. In preparation.
- Otto, J., Singer, H., Götz, C. (2014). Substanzen zur Überprüfung des Reinigungseffekts weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren. Fachbericht im Auftrag des Bundesamts für Umwelt, BAFU, Eawag, Dübendorf.
- Reungoat, J., Escher, B.I., Macova, M., Argand, F.X., Gernjak, W., Keller, J. (2012). Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 46 (3), 863-872.
- Schindler Wildhaber, Y., Mestankova, H., Schäfer, M., Schirmer, K., Salhi, E., von Gunten, U. (2015). Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone. *Wat. Res.* 75, 324-335.
- Schollée, J.E., Bourgin, M., von Gunten, U., McArdell, C.S. and Hollender, J. (2018). Non-target screening to trace ozonation transformation products in a wastewater treatment train including different post-treatments. *Water Res.* 142, 267-278.
- Schollée, J.E., Hollender, J. and McArdell, C.S. (2021a). Characterization of advanced wastewater treatment with ozone and activated carbon using LC-HRMS based non-target screening with automated trend assignment. *Water Research*, 209, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117209>.

- Schollée, J.E., Gulde, R., von Gunten, U. and McArdell, C.S. (2021b). High-throughput suspect screening of predicted ozonation transformation products in wastewater through in silico fragmentation. In preparation.
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P. and Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48(4), 2097-2098.
- Stalter, D., Magdeburg, A., Weil, M., Knacker, T. and Oehlmann, J. (2010). Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Res.* 44(2), 439-448.
- Verkh, Y., Rozman, M. and Petrovic, M. (2018). A non-targeted high-resolution mass spectrometry data analysis of dissolved organic matter in wastewater treatment. *Chemosphere* 200, 397-404.
- von Gunten, U. (2018). Oxidation Processes in Water Treatment: Are We on Track? *Environ. Sci. Technol.* 52, 5062-5075.
- von Sonntag, C., von Gunten, U. (2012). *Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment*. IWA Publishing, London.
- Wunderlin, P., Mestankova, H., Salhi, E., Schindler Wildhaber, Y., Schärer, M., Schirmer, K., von Gunten, U. (2015). Behandelbarkeit von Abwasser mit Ozon. *Aqua&Gas* 7/8, 28-38.
- Wunderlin, P. (2017). Abklärungen Verfahrenseignung Ozonung: Empfehlung. VSA, Dübendorf (accessed 27.9.2018).
https://www.micropoll.ch/fileadmin/user_upload/Redaktion/Dokumente/03_Vollzugshilfen/Abkl%C3%A4rungenVerfahrenseignungOzonung_DE_FINAL_20042017.pdf
- Zietzschmann, F., Mitchell, R.L., Jekel, M. (2015). Impacts of ozonation on the competition between organic micro-pollutants and effluent organic matter in powdered activated carbon adsorption. *Water Res.* 84, 153-160.
- Zietzschmann, F., Stutzer, C., Jekel, M. (2016). Granular activated carbon adsorption of organic micro-pollutants in drinking water and treated wastewater – aligning breakthrough curves and capacities. *Water Res.* 92, 180-187.
- Zimmermann, S.G., Schmukat, A., Schulz, M., Benner, J., von Gunten, U. and Ternes, T.A. (2012). Kinetic and Mechanistic Investigations of the Oxidation of Tramadol by Ferrate and Ozone. *Environ. Sci. Technol.* 46(2), 876-884.