

**Effektanalytische Untersuchungen mit Biotests und Biomarkern
zur Erfassung des Einflusses von
Kläranlagen und Regenwasserentlastungen
auf Oberflächengewässer**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Paul Thellmann

aus Mediasch (Rumänien)

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 29. Juni 2017

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Triebskorn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz-R. Köhler

Die Welt ist so schön und wert, dass man um sie kämpft.

(Ernest Hemmingway)

Inhalt

Teil 1: Zusammenfassung.....	1
1.1 Titel.....	1
1.2 Graphische Zusammenfassung.....	1
1.3 Einleitung.....	2
1.4 Inhalt der Arbeit	11
1.5 Übergeordnete Fragestellungen	15
1.6 Material und Methoden	16
1.7 Ergebnisse und Diskussion	36
1.8 Synthese	60
1.9. Literatur.....	65
Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten.....	75
Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten	80
Kapitel 1.1: Bewertung von Abwasserproben aus der Kläranlage Tübingen durch Anwendung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	80
Kapitel 1.2: Untersuchungen der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen mithilfe des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	96
Kapitel 2.1: Nachweis biologischer Wirkungen in Proben aus der Kläranlage Mannheim – <i>Ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser</i>	114
Kapitel 2.2.1: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen.....	152
Kapitel 2.2.2: Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream?	175
Kapitel 2.3.1: Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie?	201
Kapitel 2.3.2: Fish embryo tests with <i>Danio rerio</i> as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies	216
Kapitel 3.1: Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": How a case study on the impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany).....	238
Publikationsliste	275
Danksagung	277

Teil 1: Zusammenfassung

1.1 Titel

„Effektanalytische Untersuchungen mit Biotests und Biomarkern zur Erfassung des Einflusses von Kläranlagen und Regenwasserentlastungen auf Oberflächengewässer“

1.2 Graphische Zusammenfassung

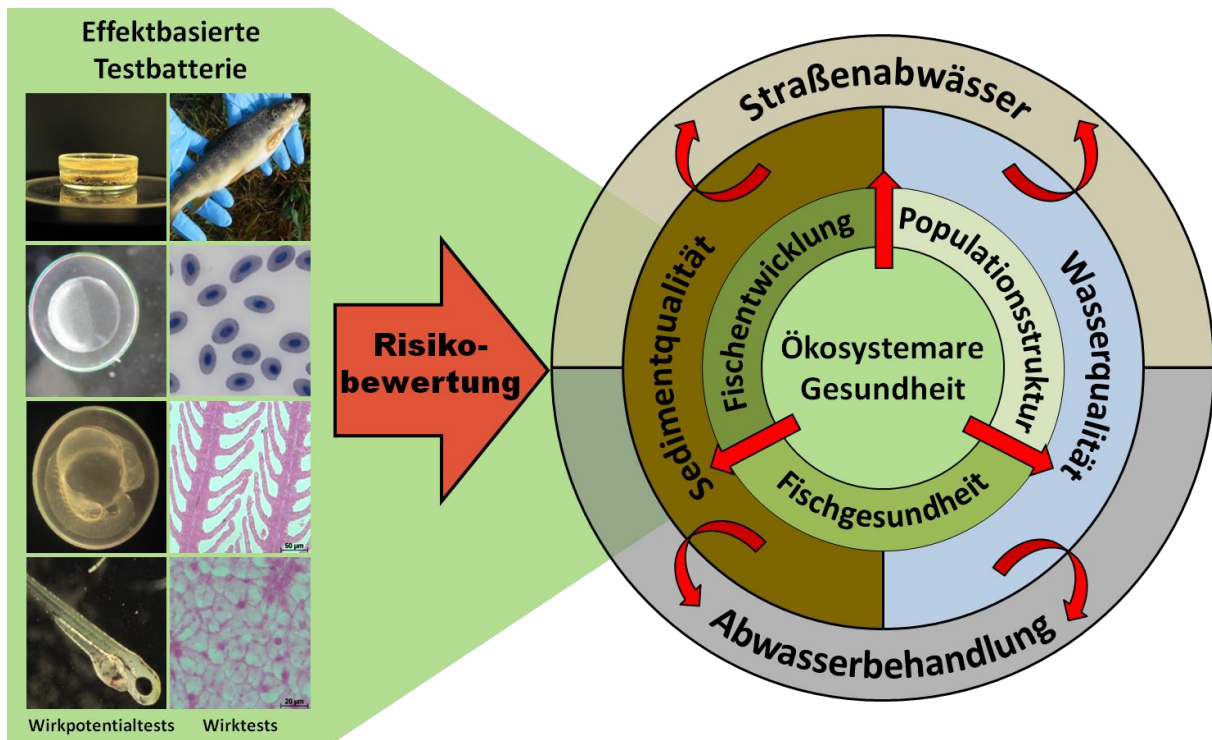


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Inhalts der Dissertation. Es wurde eine Batterie aus effektbasierten Testmethoden angewendet, um Aussagen über die Fischgesundheit, die Populationsstruktur und die Fischentwicklung in den untersuchten Gewässern bzw. Testsystemen zu treffen. Durch die gewonnenen Erkenntnisse können Rückschlüsse auf die Wasser- und Sedimentqualität der untersuchten Gewässer und Kläranlagen gezogen werden, wodurch auch eine Abschätzung des Gefahrenpotentials von kommunalen Abwässern und Straßenabwässern für Oberflächengewässer ermöglicht wird.

1.3 Einleitung

Im Jahre 2007 startete das British Medical Journal eine Umfrage, bei der die Abwasserbehandlung von der Mehrzahl der Befragten als der größte medizinische Meilenstein seit 1840 betitelt wurde (Ferriman, 2007). Abwässer wurden schon lange als potentielles Gesundheitsrisiko und Ärgernis in städtischen Ballungsräumen wahrgenommen (Henze et al., 2008). Des Weiteren stellten viele Abwässer in den Anfängen der Abwasserbehandlung eine deutliche Belastungsquelle für die aufnehmenden Oberflächengewässer dar. Mit der weitergehenden Reduzierung von Stickstoff in Form von Nitrat, Nitrit und Ammonium aus dem Abwasser, und damit auch aus den angeschlossenen Oberflächengewässern, wurde vor einigen Jahrzehnten bereits ein wichtiger Schritt in Richtung Gewässerschutz getätigt. Mithilfe der Prozesse Nitrifikation und Denitrifikation, welche heute immer noch essentielle Vorgänge im Belebtschlammverfahren zur biologischen Abwasserreinigung darstellen, war es möglich, toxische Stickstoffverbindungen wie z. B. Nitrit und Ammonium zu eliminieren sowie den biochemischen Sauerstoffbedarf (BSB₅) in den Flüssen zu senken (Henze et al., 2008). Mitte des 20. Jahrhunderts tauchte das Problem der Eutrophierung auf, unter der man ein Überangebot von Nährstoffen, in diesem Falle Stickstoff und Phosphor, versteht. Eine Eutrophierung führt zu einem explosionsartigen Wachstum von Pflanzen und Algen in aquatischen Systemen, welches durch den Abbau der Biomasse eine Sauerstoffzehrung nach sich zieht. Schnell wurde festgestellt, dass eine Stickstoffelimination allein nicht ausreicht, um eine Eutrophierung zu verhindern. Auch Phosphor, meist in Form von ortho-Phosphat, welches durch Reinigungsmittel und menschliche Ausscheidungen in hohen Konzentrationen in den Abwässern auftrat, musste eliminiert werden, da es den limitierenden Faktor der Eutrophierung darstellt (Henze et al., 2008). Als ein Beispiel wird an dieser Stelle der Bodensee genannt, der seit Anfang der 50er Jahre durch die Eutrophierung an seine Belastungsgrenzen stieß, da der Abbau der entstandenen Biomassen zu einer enormen Zehrung des Sauerstoffs im Tiefenwasser führte, was sich u. a. auch auf die Reproduktion einiger Fischarten auswirkte. Durch hohe Investitionen der Anrainerstaaten in Bau bzw. Ausbau von Abwasserreinigungsanlagen mit Phosphor-Fällung konnte die fortschreitende Eutrophierung des Bodensees in den 80er Jahren gestoppt werden (IGKB, 2013).

Abhängig von der Nutzung bzw. vom Verbleib der gereinigten Abwässer erfolgt die Phosphorelimination in biologischen Prozessen oder mithilfe der Fällung durch Metallsalze, z. B. Eisenchlorid. Durch den Einsatz des Belebtschlammverfahrens sowie der Phosphorelimination bzw. der chemischen Reinigung war es im Laufe der vergangenen Jahrzehnte möglich, die Nährstoffbelastungen in den Oberflächengewässern deutlich zu senken und die Wasserqualität zu verbessern. Des Weiteren wurden auch andere Stoffe anthropogenen Ursprungs, wie z. B. durch Mikroorganismen, Adsorption an den Klärschlamm sowie durch zusätzliche Klärstufen, wie der Sandfiltration dem Abwasser entzogen. Auch die steigende Anzahl an Gemeinden mit Anschluss an

kommunale Abwassernetze trug zur Verbesserung der Gewässerqualität bei. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes werden in Deutschland pro Jahr mehr als 10 Mrd. m³ Abwasser (Stand 2010) in insgesamt 9.632 kommunalen Kläranlagen gereinigt. Der Anschlussgrad der Bevölkerung an die öffentlichen Kläranlagen betrug im selben Jahr bereits 96,6 % (UBA, 2014). In Baden-Württemberg sind mehr als 99 % der Einwohner an öffentliche Kläranlagen angeschlossen. Die regelmäßig durchgeführten Verbesserungen der Kläranlagen führten zu einer stetigen Steigerung der Reinigungs- und Energieeffizienz, sodass bereits heute alle in Baden-Württemberg betriebenen Kläranlagen zu 100 % den Anforderungen der kommunalen Abwasserverordnung entsprechen (Meinel und Lehmann, 2016).

Jedoch wurde die Abwasserreinigung in Folge der immer weiter fortschreitenden Industrialisierung sowie der steigenden Nachfrage an Medikamenten vor neue Herausforderungen gestellt. Trotz des hohen technologischen Standards der heutigen Kläranlagen in Zentraleuropa können viele Stoffe, wie sie beispielsweise in Medikamenten, Reinigungsmitteln und Körperpflegeprodukten zu finden sind, nur unzureichend in der „konventionellen“ Abwasserreinigung entfernt werden (Luo et al., 2014; Mousel et al., 2017). Folglich werden diese unzureichend eliminierten Spurenstoffe sowie deren Transformationsprodukte kontinuierlich in Oberflächengewässer eingetragen (da Silva et al., 2011; Vieno und Sillanpää, 2014). Da durch den demographischen Wandel und das Populationswachstum auch mit einem steigenden Konsumverhalten der Bevölkerung zu rechnen ist, ist davon auszugehen, dass Spurenstoffeinträge über Abwässer in der Zukunft zunehmen werden. Neben Kläranlagen, die kontinuierliche Punktquellen repräsentieren, stellen auch temporäre Punktquellen wie Regenentlastungssysteme (z. B. Regenüberlauf- und Regenklärbecken) eine Belastung für Fließgewässer dar. Während Regenereignissen können über diese Mischwasserentlastungen große Mengen an unbehandeltem Abwasser in die Fließgewässer eingeleitet werden, wodurch neben Schadstoffen und Keimen auch verkehrsbürtige Stoffe ihren Weg in die angeschlossenen aquatischen Systeme finden. Diese Straßenabwässer können durch ihre Gehalte an Salzen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, (Schwer-)Metallen und Dioxinen zu Beeinträchtigungen der aquatischen Fauna beitragen (Maltby et al., 1995; Beasley und Kneale, 2002; Meland et al., 2010). Weitere Eintragungspfade von Schadstoffen in aquatische Ökosysteme stellen diffuse Quellen wie Abschwemmungen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen, atmosphärische Depositionen sowie Abflüsse von versiegelten Flächen urbaner Räume dar. Dabei bilden Acker- bzw. Anbauflächen die Haupteintragsquellen von Herbiziden, Insektiziden und Fungiziden.

Derzeit ist davon auszugehen, dass mehrere Tausend der fast 130 Millionen registrierten chemischen Stoffe aus der CAS-Datenbank (cas.org; Stand April 2017) in geringen Konzentrationen (ng/L bis µg/L) im Wasserkreislauf nachgewiesen werden können. Die meisten dieser Substanzen sind Bestandteile

von Pharmazeutika, Pflanzenschutzmitteln, Körperpflegeprodukten, Reinigungsmitteln, Lebensmitteln (z. B. Koffein und Süßstoffe) und Industriechemikalien (Triebskorn, 2017). Das Schicksal dieser organischen Spurenstoffe ist dabei von den physiko-chemischen Eigenschaften derselbigen sowie von biotischen und abiotischen Faktoren, z. B. dem mikrobiellen Abbau oder der Photodegradation, abhängig (Andreozzi et al., 2003). Während die Konzentrationen einiger Substanzen durch die oben genannten Prozesse nach einer gewissen Zeit reduziert oder zumindest auf einem sehr niedrigen Niveau gehalten werden können, kommt es bei anderen Substanzen durch ihre schlechte Abbaubarkeit und/oder durch ihren kontinuierlichen Eintrag in die Gewässer (u. a. über Kläranlagen) zur Anreicherung und Verteilung im Wasserkreislauf. So sind persistente Stoffe wie z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Metalle oder schon längst verbotene Stoffe wie PCBs (polychlorierte Biphenyle) oder DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) weit verbreitet und als Hintergrundbelastung, vor allem in Sedimenten, nachweisbar (Triebskorn, 2016). Zu den häufig in Gewässern nachweisbaren abwasserbürtigen Stoffen gehören unter anderem das Korrosionsschutzmittel Benzotriazol, Moschverbindungen, die als Duftstoffe in Körperpflege- und Reinigungsmitteln Verwendung finden, Röntgenkontrastmittel sowie eine Vielzahl an Human- und Veterinärpharmazeutika. Benzotriazol sowie die Moschusverbindungen AHTN und HHCb sind in vielen Gewässern in verhältnismäßig hohen Konzentrationen nachweisbar und neigen zur Akkumulation in Biota (Gatermann et al., 2002; Giger et al., 2006). Darüber hinaus konnten Luckenbach et al. (2004, 2005) zeigen, dass polyzyklische Moschusverbindungen zur Inhibition von Schutzmechanismen führen, welche für den Ausschluss von Schadstoffen aus den Zellen verantwortlich sind. Wesentlich weitreichendere Auswirkungen wurden bei vielen Humanpharmazeutika beobachtet. Durch ihre spezifische Wirkung greifen Arzneimittel gezielt in physiologische Mechanismen ein, durch die sie Effekte hervorrufen können (UBA, 2015). Daneben besitzen die meisten Pharmazeutika auch Nebenwirkungen, die auch bei aquatischen Nichtzielarten auftreten können, sobald die Konzentrationen die Wirkungsschwelle überschreiten (Triebskorn, 2016). So können bereits geringe und umweltrelevante Konzentrationen des Analgetikums Diclofenac zu Schädigungen der Nieren- und Kiemengewebe bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) führen (Mehinto et al., 2010; Schwaiger et al., 2004). Aufgrund seiner häufigen Anwendung und seines ubiquitären Auftretens in nahezu allen abwasserbeeinträchtigten Oberflächengewässern wurde Diclofenac im Rahmen der EU-Richtlinie 2012/39/EU (Directive 2013/39/EU, 2013) auf eine Beobachtungsliste („Watch List“) gesetzt. Auch beim Anti-Epileptikum Carbamazepin, welches nur sehr schlecht in der konventionellen Abwasserreinigung eliminiert wird, können umweltrelevante Konzentrationen zu lebertoxischen Effekten sowie zu Beeinträchtigungen der Genexpression bei Fischen führen (Triebskorn et al., 2007; Qiang et al., 2016). Das synthetische Östrogen 17 α -Ethinylestradiol (EE2), welches ein Bestandteil von Empfängnisverhütungsmitteln ist, wird in Kläranlagen sehr gut abgebaut. Dennoch reichen die geringen von Kläranlagen emittierten

Mengen aus, um Effekte bei aquatischen Organismen hervorzurufen. Ein konkretes Beispiel hierfür ist die Studie von Kidd et al. (2007), die zeigt, dass eine chronische Exposition von Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) gegenüber niedrigen und umweltrelevanten Konzentrationen von 17 α -Ethinylestradiol zu einer Feminisierung der Männchen (Intersex-Gonaden) und zu einer veränderten Oogenese bei Weibchen führte. In einer anderen Studie konnten schwedische Wissenschaftler nachweisen, dass der Tranquilizer Oxazepam zu einer Veränderung des Fress- und Sozialverhaltens bei Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) führt (Brodin et al., 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Oxazepam mehrere Jahrzehnte in seiner aktiven Form in Seesedimenten überdauern kann (Klaminder et al., 2015).

Trotz umfangreicher Forschung sind die Auswirkungen vieler Stoffe und ihrer Metaboliten bisher unzureichend bekannt oder sogar unbekannt. Auch ist die Frage der chronischen Wirkungen bei vielen Stoffen noch immer nicht geklärt. Des Weiteren gibt es erhebliche Wissenslücken bzgl. der additiven (aufsummierenden), synergistischen (verstärkenden) oder antagonistischen (aufhebenden) Wirkungen der in der Umwelt vorkommenden anthropogenen Stoffe. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die festgelegten Umweltqualitätsnormen nicht ausreichen, um Mischungseffekte zu verhindern (Carvalho et al., 2014). Zum Schutz der aquatischen Flora und Fauna sowie zur nachhaltigen Nutzung der Ressource Wasser ist es deshalb notwendig, entsprechende Maßnahmen zu ergreifen. Diese können durch gesetzliche Vorgaben wie der REACH-Verordnung, dem Pflanzenschutzgesetz oder der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) als auch durch die Produktion umweltverträglicherer Stoffe sowie dem Einsatz neuer Technologien zur Abwasser- und Mischwasserbehandlung („end-of-pipe“-Ansatz) erfolgen (Triebkorn, 2017). Nach den Vorgaben von REACH (Regulation (EC) No. 1907/2006, 2006) und des Pflanzenschutzgesetzes (PflSchG, 2012) dürfen nur noch Stoffe in Umlauf gebracht werden, die zuvor registriert, in Bezug auf ihr Risiko für Mensch und Umwelt bewertet bzw. zugelassen wurden. Wird bei Stoffen bspw. ein erhöhtes Umweltrisiko ermittelt, so können Zulassung und Anwendung von behördlicher Seite entzogen bzw. verboten werden. Während durch REACH und das Pflanzenschutzgesetz bezüglich des Risikos für Mensch und Umwelt präventiv gehandelt wird, verfolgt die Europäische Wasserrahmenrichtlinie (Directive 2000/60/EC, 2000) konkrete Umweltziele zur Verbesserung der Gewässerqualität. Laut ihren Vorgaben müssen Flüsse, Seen, Übergangsgewässer, Küstengewässer und auch das Grundwasser bis zum Jahre 2027 einen guten ökologischen sowie chemischen Zustand aufweisen. Hierfür sollen bspw. die Struktur und die Durchgängigkeit von Gewässern durch Renaturierungsmaßnahmen und der Entfernung von Staustufen oder Wehren verbessert werden. Ein weiteres Ziel ist es, den Eintrag von anthropogenen Stoffen in den Wasserkreislauf zu reduzieren. Hierfür soll auch die Abwasserbehandlung durch die besten verfügbaren Technologien erfolgen. Um die Vorgaben und Ziele der WRRL zu erfüllen, wurden auf der Basis von Bestandsaufnahmen und Gewässerüberwachungen Bewirtschaftungspläne und

Maßnahmenprogramme für jedes Flussgebiet in Europa erstellt. Zur Umsetzung der Maßnahmenprogramme und Bewirtschaftungspläne wurde den EU-Mitgliedsstaaten ein definierter Zeitplan vorgelegt, welcher drei sechsjährige Bewirtschaftungszyklen beinhaltet. Ursprünglich sollten die Ziele der WRRL bis 2015, also bis zum Ende des ersten Bewirtschaftungszyklus, erreicht worden sein. Gewässer, welche die Vorgaben der WRRL nicht bis 2015 erfüllten, müssen spätestens bis zum Ende des dritten Bewirtschaftungszyklus (2027) alle Umweltziele erreicht haben (BMUB, 2012; BMUB/UBA, 2016).

Einen bedeutenden Beitrag zur Minimierung der Schadstoffeinträge in Oberflächengewässer, und damit auch zur Erfüllung der Forderungen der WRRL, leisten Technologien zur weitergehenden Abwasserreinigung („4. Reinigungsstufe“). Hierzu gehören Verfahren wie die Adsorption an pulverisierte oder granuliert Aktivkohle, die Ozonung, die Oxidation durch UV-Bestrahlung und die Umkehrosmose (Plakas et al., 2016). Die am besten untersuchten sowie am häufigsten verwendeten Technologien stellen hierbei die Ozonung und die Aktivkohlefilterung dar (z. B. Altmann et al., 2014; Bonvin et al., 2016; Lüddeke et al., 2015; Molinos-Senante et al., 2013; Meinel et al., 2014; Triebskorn, 2017). Das Prinzip dieser Reinigungsstufen beruht auf der Transformation bzw. der Adsorption von Stoffen im Abwasser. Sowohl die Ozonung als auch die Adsorption an Pulveraktivkohle weisen in der Summe sehr gute Eliminationsraten von schwer abbaubaren Substanzen auf (Altmann et al., 2014; Mailler et al., 2015; Margot et al., 2013). Welche Technologie jedoch in der routinemäßigen Abwasserbehandlung Anwendung findet, muss anhand der im Abwasser befindlichen Spurenstoffe und Keime entschieden werden. Die Ozonung bietet den Vorteil, dass sie neben Schadstoffen auch Keime effektiv reduziert. Weiterhin ist diese Technologie kostengünstiger als die Behandlung mit Pulveraktivkohle (Joss et al., 2008). Der Nachteil ist jedoch, dass die Ozonung die Entstehung möglicherweise toxischer Transformationsprodukte, welche man jedoch vielfach überhaupt nicht kennt bzw. analysieren kann, und die Selektion robuster Keime begünstigen kann (Alexander et al., 2016; Joss et al., 2008; Stalter et al., 2010). Daher muss hier immer eine weitere Stufe nachgeschaltet werden (z. B. Sandfilter, Aktivkohlefilter), um die entstandenen Transformationsprodukte aus dem Abwasser zu entfernen (Stalter et al., 2010). Die Adsorption an Aktivkohle bietet den Vorteil, dass sie ein breiteres Spektrum an Spurenstoffen eliminiert (Margot et al., 2013; Snyder et al., 2007), ohne dass dabei gefährliche Nebenprodukte entstehen. In den letzten Jahren wurde in einigen Kläranlagen Deutschlands, hierbei vor allem in Baden-Württemberg, auf freiwilliger Basis eine 4. Reinigungsstufe installiert. Jedoch besitzt die Mehrzahl der Kläranlagen in Deutschland das konventionelle zwei- oder dreistufige Reinigungsverfahren, da Technologien zur weitergehenden Abwasserreinigung nicht gesetzlich vorgeschrieben sind. Die verpflichtende Inbetriebnahme einer solchen 4. Stufe ist derzeit Gegenstand politischer und wissenschaftlicher Diskussionen. Da die weitergehende Abwasserreinigung mit Pulveraktivkohle, abhängig von der Dosierung, schätzungsweise zwischen 0,05

und 0,20 €/m³ kostet, ist sie nicht nur technisch, sondern auch finanziell realisierbar (Joss et al., 2008). Vor allem in Oberflächengewässern mit geringer Wasserführung und der damit verbundenen geringen Verdünnung des Abwassers sowie in Regionen, in denen Oberflächenwasser zur Trinkwassergewinnung genutzt wird, stellt diese Technologie eine sinnvolle Reinigungsstufe dar (Joss et al., 2005; 2008).

Die Reinigungsleistungen von Kläranlagen bzw. die Toxizität von Abwässern und deren Auswirkungen auf Biota können mithilfe ökotoxikologischer Testverfahren (Biotests oder Biomarker) untersucht werden. Als Test- oder Monitororganismen dienen in der aquatischen Ökotoxikologie bspw. Fische wie der Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) oder die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*), Invertebraten wie der Große Wasserfloh (*Daphnia magna*), Zuckmücken (z. B. *Chironomus riparius*) und Bachflohkrebse (z. B. *Gammarus pulex*), aber auch Wasserpflanzen wie die kleine Wasserlinse (*Lemna minor*). Als Biotests, mit denen Wirkpotentiale in Umweltmatrices nachgewiesen werden können, dienen z.B. zellbasierte *in vitro* Testsysteme wie der E-Screen mit humanen Brustkrebszellen oder der YES-Assay (Yeast Estrogen Assay) mit modifizierten Hefezellkulturen, zur Ermittlung östrogenener Effekte. Um Reaktionen von Organismen auf Schadstoffe, Umwelteinflüsse oder auch Abwässer zu erfassen, werden in der Ökotoxikologie Biomarker verwendet. Per Definition stellt ein Biomarker eine biologische Antwort oder Reaktion dar, die durch Umweltveränderungen oder allgemein durch einen Stressor induziert werden kann (Adams, 2000; Depledge und Fossi, 1994; van Gestel und van Brummelen, 1996). Man unterscheidet dabei zwischen den „*biomarkers of exposure*“, welche eine eindeutige Reaktion auf eine bestimmte Exposition anzeigen, und den „*biomarkers of effect*“, welche die Effekte bzw. Wirkungen aller auftretenden Einflüsse integrieren. Zu Biomarkern gehören u. a. zelluläre bzw. histopathologische Reaktionen, biochemische Veränderungen, Verhaltensveränderungen oder Störungen in der Embryonalentwicklung. Nach der Definition von Fent (2007) reagieren Biomarker auf niedriger biologischer Ebene sensibler und schneller als jene, die auf hoher biologischer Ebene anzuordnen sind. Im Gegenzug besitzen Biomarker auf höherer biologischer Ebene auch eine erhöhte ökologische Relevanz (Fent, 2007).

Als Biomarker, der repräsentativ für eine niedrige biologische Ebene steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Stressproteingehalt in wildlebenden Fischen gemessen. Stressproteine sind ein essenzieller Bestandteil des Chaperonsystems, welches u. a. die Faltung neusynthetisierter Proteine sowie deren Transport zu den Zielorganellen unterstützt (Kiang und Tsokos, 1998). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stressproteinanalysen wird die Induktion des Stressproteins Hsp70 (engl. heat shock protein) gemessen. Die Familie der Hsp70-Moleküle (mit einem Molekulargewicht von 68-74 kD) besteht aus einer Vielzahl hochkonservierter Proteine. Zu ihren allgemeinen Aufgaben gehören u.a. die Reparatur von fehlgefalteten Proteinen, der transmembrane Transport von Proteinen in andere

Zellorganellen, die Assistenz bei der Faltung neuer Proteine sowie die Beteiligung am nicht-lysosomalen Abbau cytoplasmatischer Proteine und der Autophagozytose, die der Entfernung zerstörten Zellmaterials dient (Sanders und Martin, 1993). Unter dem Einfluss von externen Stressoren (z. B. Schadstoffe, Temperatur, Viren sowie physiologischer Stress) kann es zur Schädigung von Proteinen sowie zu einer Störung der Proteinfaltung kommen (Feder und Hofmann, 1999). Zur Kompensation des entstandenen Schadens reagieren betroffene Organismen mit einer verstärkten Bildung von Stressproteinen (Köhler et al., 1999), wodurch Rückschlüsse auf den Gesundheits- bzw. Belastungszustand der Testorganismen gezogen werden können. Somit deutet ein erhöhter Hsp70-Level in den untersuchten Monitororganismen auf das Vorhandensein von proteotoxisch wirkenden Substanzen oder Stressoren in den untersuchten Proben oder in der Umwelt hin. In der Ökotoxikologie werden Stressproteine sowohl zur Untersuchung von Einzelsubstanzen als auch zur Untersuchung komplexer Umweltbelastungen sowie Umweltbedingungen in Freilandstudien herangezogen (Dieterich et al., 2013; Eder et al., 2007; Köhler et al., 1996; Vincze et al., 2015).

Auf einer biologisch höheren Ebene ist der Mikrokerntest angesiedelt. Dieser wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Erythrozyten wildlebender Fische aus abwasserbeeinträchtigten Oberflächengewässern angewendet. Mithilfe dieses Tests lassen sich gentoxische Effekte, also Schädigungen des Erbguts, in Form sogenannter Mikrokerne nachweisen.

Dabei handelt es sich um DNA-haltige Fragmente, die außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma liegen. Die Chromosomenfragmente können während der Mitose aufgrund von Defekten des Spindelapparates nicht an die Spindelpole gezogen werden und verbleiben deshalb im Zytoplasma, wo sie kondensieren und Mikrokerne bilden (Heddle et al., 1978). Eine hohe bzw. erhöhte Anzahl an Mikrokerneln kann daher als Indikator für einen gentoxischen Einfluss angesehen werden (Al-Sabti und Metcalfe, 1995). Die Eignung des Mikrokerntests als Methode zur Erfassung gentoxischer Effekte wurde bereits durch Bolognesi & Hayashi (2011) beschrieben. Auch im Bereich des Gewässermonitorings wird der Test weltweit angewendet (Gernhöfer et al., 2001; Pinkney et al., 2017; Poleksic et al., 2010).

Zelluläre Veränderungen stellen Biomarker dar, die eine noch höhere biologische Ebene repräsentieren. Da sie ein geeignetes Mittel zur Charakterisierung des Gesundheitszustandes beeinträchtigter Organismen darstellen, werden sie im englischsprachigen Raum „*biomarkers of effect*“ genannt. Mithilfe histopathologischer Untersuchungen von Organgeweben können sowohl toxische Wirkungen einzelner Chemikalien (z. B. Schwaiger et al., 2004) als auch Auswirkungen von komplexen Umweltbelastungen (z. B. Grund et al., 2010; Triebkorn et al., 2008) erfasst werden. Im Gewässermonitoring ist die Histopathologie eine etablierte Methode zur Untersuchung der Fischgesundheit (Schmidt et al., 1999; Schwaiger, 2001; Triebkorn et al., 2008), welche eine

Information über den Belastungszustand von Gewässern liefern kann und somit hilft, diesen zu bewerten (Bernet, 2003). Ein Vorteil von histologischen Untersuchungen ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Biomarkern sowohl Informationen über das Ausmaß als auch über den Ort der Schädigung liefern (Triebskorn et al., 2002). Darüber hinaus können sie als Interpretationshilfe biochemischer Messdaten herangezogen werden, da diese allein oftmals keine exakten Informationen über den Gesundheitszustand der untersuchten Organismen geben. In den vergangenen Jahren wurden histopathologische Methoden mehrfach erfolgreich eingesetzt, um den Gesundheitszustand von Fischen in mit Spurenstoffen belasteten Fließgewässern zu beschreiben (Schwaiger et al., 1997; Triebskorn et al., 2014; Vincze et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden histopathologische Untersuchungen an Fischen aus durch Abwasser beeinträchtigten Fließgewässern durchgeführt. Dabei sollte durch die Untersuchung der Organe Kieme, Leber und Niere festgestellt werden, ob der Gesundheitszustand der Fische durch die Einleitung kommunaler Abwässer bzw. durch die Einleitung von Straßenabwässern beeinträchtigt wird.

Physiologische Veränderungen oder Störungen in der Entwicklung eines Organismus stellen Biomarker dar, welche auf einer sehr hohen biologischen Ebene anzuordnen sind und daher auch eine hohe ökologische Relevanz besitzen. So können z. B. embryonale Stadien besonders sensibel auf belastete Umweltproben und Schadstoffe reagieren (Osterauer und Köhler, 2008; Luckenbach et al., 2001). Eine geeignete Methode, um embryotoxische Wirkungen von Stoffen oder embryotoxische Potentiale in Umweltproben nachzuweisen, ist der Fischembryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*). Im Gegensatz zu Testsystemen, die Reaktionen auf Zellen oder Enzyme erfassen, werden mit diesem Test mögliche Auswirkungen auf die frühe Embryogenese des Zebrafisches sowie die frühen Larvalstadien (nach Verlassen der Eihülle) untersucht. Der Test wurde ursprünglich von Nagel (2002) als DarT für die Anwendung auf wässrige Proben entwickelt. Er sollte als Alternative zu akuten Fischtests dienen, da akute Konzentrationen schädlicher Substanzen in der Umwelt nur in Störfällen auftreten und daher nur bedingt die vorherrschenden Belastungen in der Umwelt widerspiegeln. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Fischembryotest erfolgte in Anlehnung an den „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ der OECD (OECD, 2013). Hierbei wurden Abwasserproben unterschiedlich ausgerüsteter Kläranlagen sowie Sediment- und Oberflächenwasserproben von durch Abwasser beeinträchtigten Flüssen hinsichtlich ihres embryotoxischen Potentials analysiert. Anders als der DarT nach Nagel (2002), bei dem lediglich eine Exposition über 48 h erfolgt, sieht der im Rahmen der vorliegenden Dissertation angewandte Test eine 96-stündige Exposition der Embryonen vor. Durch diese verlängerte Expositionszeit lassen sich auch Reaktionen bzw. Effekte erfassen, welche erst nach dem Schlupf der Tiere, also ohne den protektiven Schutz der Eihülle (Chorion), stattfinden. Ein bedeutender Vorteil dieses Tests ist, dass embryonale Stadien sehr sensibel auf Einwirkungen von Umweltproben und Schadstoffen reagieren können (Luckenbach et al., 2001; McKim et al., 1975),

wodurch Aussagen zum Gefährdungspotential einzelner Schadstoffe bzw. Aussagen zum entwicklungstoxischen Potential von Abwasser- und Umweltproben gemacht werden können. Zu definierten Zeitpunkten wurden neben der Mortalität auch subletale Endpunkte wie die Herzschlagrate, die Schlupfrate oder die Rate an Fehlbildungen ermittelt. Während bei den Untersuchungen der Fischgesundheit mithilfe der Stressproteinanalytik, des Mikrokerntests und der Histopathologie tatsächliche Wirkungen im Freiland ermittelt wurden, wurden mit dem FET im vorliegenden Fall „lediglich“ Wirkpotentiale in den Abwasserproben sowie in den Sediment- und Oberflächenwasserproben der untersuchten Fließgewässer ermittelt. Der Unterschied zur tatsächlichen Wirkung ist darin begründet, dass die auftretenden Effekte nur unter Laborbedingungen und nicht im Freiland beobachtet werden, wo auch andere Faktoren wie bspw. schwankende Tagestemperaturen, Niederschläge und Sonneneinstrahlung von Bedeutung für den auftretenden Effekt sind. Aus diesem Grund werden die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Effekte im FET als potentiell auftretende Wirkungen bzw. als Wirkpotentiale definiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Einflüsse von Kläranlagen und Regenwasserentlastungen auf Oberflächengewässer sowie die Reinigungseffizienz unterschiedlicher Abwasserreinigungstechniken mithilfe des FET bzw. mithilfe einer effektbasierten Testbatterie zu untersuchen. Durch den kombinierten Einsatz von Effektuntersuchungen, Wirkpotentialtests und chemischer Analytik ist es möglich, die Belastungssituation in Oberflächengewässern sowie das Gefahrenpotential von Abwässern komplementär und umfassend zu beurteilen. Bei diesem Untersuchungsansatz können die Ergebnisse der einzelnen Analysen jeweils als Interpretationshilfe der jeweils anderen Ergebnisse herangezogen werden. Während die chemische Analytik die Frage nach der Präsenz bestimmter Stoffe in der Umwelt beantworten kann, stößt sie bei der Frage nach der Gesamtheit an Stoffen in der Umwelt sowie deren ökologischer Relevanz an ihre Grenzen. Ergänzend hierzu stehen die biologischen Untersuchungen, welche die Gesamtheit aller Belastungen integrieren, meist jedoch keine Information über potentielle Verursacher der beobachteten Wirkungen liefern. Im Zentrum dieser Arbeit steht der Fischembryotest mit *Danio rerio*, welcher Bestandteil aller durchgeführten Untersuchungen war. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Projekte und Analysen ist in Kapitel 1.4 gegeben.

1.4 Inhalt der Arbeit

1.4.1 Übersicht der durchgeführten Projekte und Studien

In der vorliegenden Arbeit wurden ökotoxikologische Analysen mit Sediment- und Oberflächenwasserproben, Abwasserproben und Fischen durchgeführt, um

in Kapitel 1: die Reinigungsleistung von konventionell ausgestatteten Kläranlagen hinsichtlich der Reduktion embryotoxischer Potentiale im Abwasser mithilfe des Fischembryotests (FET) zu bewerten;

in Kapitel 2: die Reinigungsleistung von Kläranlagen sowie die Belastung in den angeschlossenen Fließgewässern (Vorflutern) mithilfe des Fischembryotests (FET) und parallel durchgeführten Wirkuntersuchungen zu bewerten;

in Kapitel 3: den Einfluss von Straßenabwässern auf das aufnehmende Gewässer (in diesem Fall die Argen) mithilfe ökotoxikologischer Untersuchungen auf unterschiedlichen Ebenen zu erfassen.

Zu Kapitel 1: Die Projekte „Kläranlage Tübingen“ und „Kläranlage Göppingen“

Für die Bewertung der Reinigungseffizienz konventionell ausgestatteter Kläranlagen der Städte Tübingen (Kapitel 1.1) und Göppingen (Kapitel 1.2) wurden 24 h Sammelproben der Zu- und Abläufe mithilfe des Fischembryotests (FET) auf embryotoxische Potentiale hin untersucht. Ziel war es festzustellen, ob eine konventionelle Behandlung (mit mechanischer und biologischer Klärung sowie chemischer Fällung) des Abwassers zu einer ausreichenden Elimination der im Rohabwasser befindlichen embryotoxischen Potentiale führt, bzw. um zu prüfen, ob die Einleitung gereinigter Abwässer der oben genannten Anlagen ein Gefahrenpotential für die Embryonalentwicklung von Fischen in den entsprechenden Vorflutern darstellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Kapitel 1 zusammengefasst.

Zu Kapitel 2: Die Projekte „Kläranlage Mannheim“, „SchussenAktiv“, „SchussenAktivplus“ und „Kläranlage Albstadt“

In Kapitel 2 stehen umfassende biologische Untersuchungen („Biotestbatterien“, inklusive des FET) im Fokus. Hierbei sollten, sowohl die Abwasserqualität, als auch die Beeinflussung der Vorfluter durch Einträge aus den untersuchten Kläranlagen mithilfe des Einsatzes eines breiten Spektrums an biologischen und chemischen Analysen erforscht werden. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung von Kläranlagen, welche über eine 4. Reinigungsstufe zur weitergehenden Abwasserreinigung verfügen. Die Bewertung einer zusätzlichen Reinigungsstufe mit Pulveraktivkohle (PAK) erfolgte im Rahmen von drei Projekten, in denen sowohl die Kurzzeiteffekte („KA Mannheim“

und „SchussenAktiv*plus*“) als auch die Langzeiteffekte („KA Albstadt“) der adsorptiven Stufe untersucht wurden.

Ziel des in Kapitel 2.1 vorgestellten Projekts „KA Mannheim“ war es, mithilfe verschiedener Testmethoden auf unterschiedlichen biologischen Ebenen festzustellen, ob durch eine zusätzlich installierte adsorptive Stufe mit Pulveraktivkohle (PAK) eine weitere Reduktion von Schadstoffen bzw. eine Reduktion von biologischen Reaktionen im behandelten Abwasser erfolgt.

Die in Kapitel 2.2.1 vorgestellten Untersuchungen der KA Langwiese (Ravensburg) und ihres Vorfluters Schussen erfolgten im Rahmen des Projekts SchussenAktiv (Triebskorn et al., 2013b). Ziel dieses Verbundprojekts war es, die Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese mit einer PAK-Stufe im Rahmen einer Vorher-Nachher-Studie zu untersuchen. Durch Verzögerungen in der Fertigstellung der zusätzlichen adsorptiven Stufe wurde der Ausbau der KA Langwiese jedoch erst im Herbst 2013 beendet, wodurch im Projekt „SchussenAktiv“ zunächst nur die Erfassung des ökotoxikologischen Zustands der Schussen vor dem Ausbau der KA Langwiese sowie die Untersuchung der konventionellen Reinigung im Fokus standen. Die Untersuchungen der mit einer PAK-Stufe aufgerüsteten Anlage sowie deren Effekte auf das aufnehmende Gewässer Schussen wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektverbundes „SchussenAktiv*plus*“ weitergeführt (Triebskorn et al., 2013a), worauf auch in Kapitel 2.2.2 Bezug genommen wird.

Im Verbundprojekt SchussenAktiv*plus* (Kapitel 2.2.2) wurden die Untersuchungen an der mit einer PAK-Stufe aufgerüsteten Kläranlage Langwiese (Ravensburg) sowie deren Effekte auf das aufnehmende Gewässer Schussen weitergeführt. Des Weiteren wurde die Effizienz anderer weiterführender Abwassertechniken, wie der Ozonung (KA Merklingen) und der Adsorption an granulierten Aktivkohle (GAK, KA Eriskirch) untersucht. Die Untersuchung der weiterführenden Behandlung von Mischwasser aus Regenentlastungssystemen durch Lamellenfilter und Retentionsbodenfilter (Retentionsbodenfilter in Tettngang; Regenüberlaufbecken Mariatal) stellte ein weiteres Ziel des Verbundprojektes dar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Abwasserproben aus der KA Langwiese sowie Sediment- und Oberflächenwasserproben der Flüsse Schussen und Argen (Referenzgewässer) mit dem Fischembryotest untersucht, um die Auswirkungen des Ausbaus in der KA Langwiese mit einer PAK-Stufe zu erfassen. Zudem erfolgte ein Vergleich mit Daten aus Untersuchungen der Verbundpartner. Eine detailliertere Beschreibung des Projekts SchussenAktiv*plus* erfolgt in Kapitel 2.2.1

Die Langzeiteffekte einer weiterführenden Abwasserreinigung mit Pulveraktivkohle waren Gegenstand der Untersuchungen im Projekt „KA Albstadt-Ebingen“ (siehe Kapitel 2.3.1). Die Kläranlage

Ebingen auf der Schwäbischen Alb wurde bereits 1992 mit einer PAK-Stufe ausgestattet, um die aus der lokalen Textilindustrie stammenden Farbstoffe zu eliminieren und dadurch auch die Entfärbung des aufnehmenden Gewässers, der Schmiecha, zu ermöglichen. Da durch neue Erkenntnisse in der Forschung heute davon auszugehen ist, dass durch die zusätzliche adsorptive Stufe auch weitere Spurenstoffe eliminiert werden, können die Kläranlage Albstadt-Ebingen und das angeschlossene Gewässer Schmiecha als Langzeitkontrolle für die Effizienz der vierten Reinigungsstufe in kommunalen Kläranlagen herangezogen werden. Im Fokus dieses Projekts standen die Auswirkungen der vierten Stufe auf das aufnehmende Fließgewässer Schmiecha. Durch das breite Untersuchungsspektrum, welches Analysen der Fischgesundheit, der Fischpopulation, der Makrozoobenthospopulation sowie Wirkpotentialtests (Fischembryotests) beinhaltete, konnten klare Aussagen zur Effizienz der PAK als 4. Reinigungsstufe gemacht werden.

In Kapitel 2.3.2 wird ein Vergleich zwischen der KA Langwiese (vor dem Ausbau mit einer Pulveraktivkohlestufe) und den Kläranlagen in Albstadt-Ebingen und Albstadt Lautlingen gezogen, welche seit mehr als 20 Jahren über eine weitergehende Reinigungsstufe auf der Basis von Pulveraktivkohle verfügen. Im Rahmen dieses Vergleichs wurden Sediment- und Oberflächenwasserproben der angeschlossenen Fließgewässer mithilfe des Fischembryotests untersucht. Durch die Untersuchung von Probestellen ober- und unterhalb der Abwassereinleitungen wurde eine Belastungscharakterisierung der Flüsse durchgeführt, welche wiederum einen Aufschluss über die Auswirkungen und die Reinigungsleistung der unterschiedlichen Abwasserreinigungstechniken gibt. Die verwendeten Daten aus der Untersuchung der KA Langwiese (Ravensburg) wurden im Rahmen des Projekts SchussenAktiv (Tribskorn et al., 2013b) erhoben, welches nachfolgend in Kapitel 2.2.1 vorgestellt wird.

Zu Kapitel 3: Das Projekt „RKB Dürren“

Im Fokus des in Kapitel 3.1 vorgestellten Projekts steht der Einfluss des Klär- und Rückhaltebeckens (RKB) Dürren auf das angeschlossene Fließgewässer, die Argen. Im Zuge von Regenereignissen werden Straßenabwässer der Autobahn A96 über das RKB Dürren in die Argen geleitet. Ziel des Projekts war es, im Rahmen eines gerichtlichen Streitfalls, mithilfe umfassender biologischer und ökotoxikologischer Untersuchungen sowie begleitender chemischer Analytik zu prüfen, ob Schutzgüter nach FFH Richtlinie (Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie; Directive 92/43/EEC, 1992), wie z. B. die Groppe (*Cottus gobio*) in der Argen durch Einträge aus dem o. g. Regenklärbecken Schaden nehmen.

1.4.2 Übersicht der durchgeführten praktischen Arbeiten

Die nachfolgende Tabelle 1 stellt eine Zusammenfassung aller durchgeführten Studien sowie den darin durchgeführten Analysen dar. Da einige der vorgestellten Studien in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern durchgeführt wurden, wird in Tabelle 1 veranschaulicht, welche der durchgeführten Analysen in Eigenarbeit erfolgten.

Tabelle 1: Übersicht, über die im Rahmen der vorgestellten Studien durchgeführten Analysen; X = durchgeführt; – = nicht durchgeführt

Projekt	Fisch-embryotest (FET)	Eigens durchgeführte Wirkstudien	Von Projektpartnern durchgeführte Wirkstudien	Limnochemische Messungen	Chemische Analytik
KA Tübingen	X	–	–	–	–
KA Göppingen	X	–	–	–	–
KA Mannheim	X	–	X	–	–
SchussenAktiv	X	–	X	X	X
SchussenAktiv <i>plus</i>	X	–	X	X	X
KA Albstadt	X	X	X	X	X
RKB Dürren	X	x	X	X	X

1.5 Übergeordnete Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Ist der Fischembryotest (FET) mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) ein adäquates Mittel zur Bewertung von Abwasserproben?
2. Wie ist die Reinigungsleistung von konventionellen Abwasserreinigungstechniken mithilfe des FET zu bewerten?
3. Führt die 4. Reinigungsstufe in Kläranlagen zu einer weiteren Reduktion von toxischen Potentialen und Effekten bei Fischen?
4. In welchem Zusammenhang stehen die gewonnenen Ergebnisse mit in anderen Tests erzielten Ergebnissen?
5. Kann durch die vierte Reinigungsstufe in Kläranlagen eine Verbesserung im Ökosystem des aufnehmenden Gewässers erreicht werden?
6. Welchen Langzeiteffekt hat der Ausbau einer Kläranlage mit der 4. Reinigungsstufe?
7. Welche Vorteile bietet das adsorptive Verfahren mit Pulveraktivkohle?
8. Welchen Einfluss können Straßenabwässer auf das aufnehmende Gewässer ausüben?

1.6 Material und Methoden

1.6.1 Testorganismen

Der Zebrabärbling

Der Zebrabärbling (*Danio rerio*; 1822 Hamilton) ist ein Süßwasserfisch aus der Familie der Karpfenartigen (Cyprinidae) und gehört innerhalb dieser zur Unterfamilie der Bärblinge (Danioninae). Er besitzt einen spindelförmigen sowie lateral abgeflachten Körper. An der Oberlippe seines leicht oberständigen Mauls befinden sich zwei Paar Bartfäden. Weiterhin zeichnet sich *Danio rerio* durch seine charakteristische Färbung aus (Abbildung 2), welcher er auch den Namen „Zebrabärbling“ zu verdanken hat (Spence et al., 2008; Vobach und Kammann, 2003). An den Flanken verlaufen bis zu sechs dunkelblaue Längsstreifen vom Operculum bis hin zum Ende der Schwanzflosse (Spence et al., 2008). Dazwischen befinden sich die silbrig bis goldgelb glänzenden Längsbinden (Vobach und Kammann, 2003). Während die Afterflosse eine ähnliche Streifung aufweist, ist die Rückenflosse lediglich mit einem weißen Saum versehen. Die Durchschnittslänge beträgt in etwa 40 mm und wird nur selten überschritten (Spence et al., 2008). Beheimatet ist *Danio rerio* in Süd- und Südost-Asien. Sein Verbreitungsgebiet erstreckt sich über den Ganges und den Bramaputra sowie deren gesamte Einzugsgebiete (Spence et al., 2008; Vobach und Kammann, 2003). Hierbei bevorzugt er strömungsarme Bereiche wie Überschwemmungsgebiete, Seen, Teiche und Reisfelder mit üppiger Vegetation (Spence et al., 2008). Zebrabärblinge sind omnivor und ernähren sich in ihrer natürlichen Umgebung hauptsächlich von Zooplankton und Insekten. Die Geschlechtsreife wird nach circa drei Monaten erreicht (Nagel, 2002). Unter optimalen Bedingungen können sich Zebrabärblinge das ganze Jahr in regelmäßigen Intervallen von 1 bis 6 Tagen fortpflanzen (Spence und Smith, 2006). Stimuliert wird die Fortpflanzung durch Licht, Laichsubstrat und die Wahrnehmung von Pheromonen andersgeschlechtlicher Artgenossen. Bei domestizierten Tieren ist die Fortpflanzung stark von der Licht-Dunkel-Periode abhängig. Einzelne gesetzte Paare können Gelege produzieren, die bis zu mehrere Hundert Eier umfassen. Der Zebrabärbling ist einer der wichtigsten Modellorganismen in Naturwissenschaften wie der Ökotoxikologie, der Verhaltensbiologie oder der Genetik. Seine Robustheit, seine vergleichsweise einfache Haltung, seine kurze Generationszeit sowie die verhältnismäßig großen und transparenten Eier sind nur einige der Vorteile, die ihn zu einem beliebten Testorganismus gemacht haben. In der vorliegenden Arbeit wurden befruchtete Eier des Zebrabärblings im Fischembryotest zur Untersuchung von Proben aus den Anlagen KA Ravensburg, KA Tübingen, KA Göppingen, KA Mannheim, KA Albstadt und RKB Dürren sowie zur Untersuchung von Proben aus den Flüssen Schussen, Schmiecha und Argen verwendet.

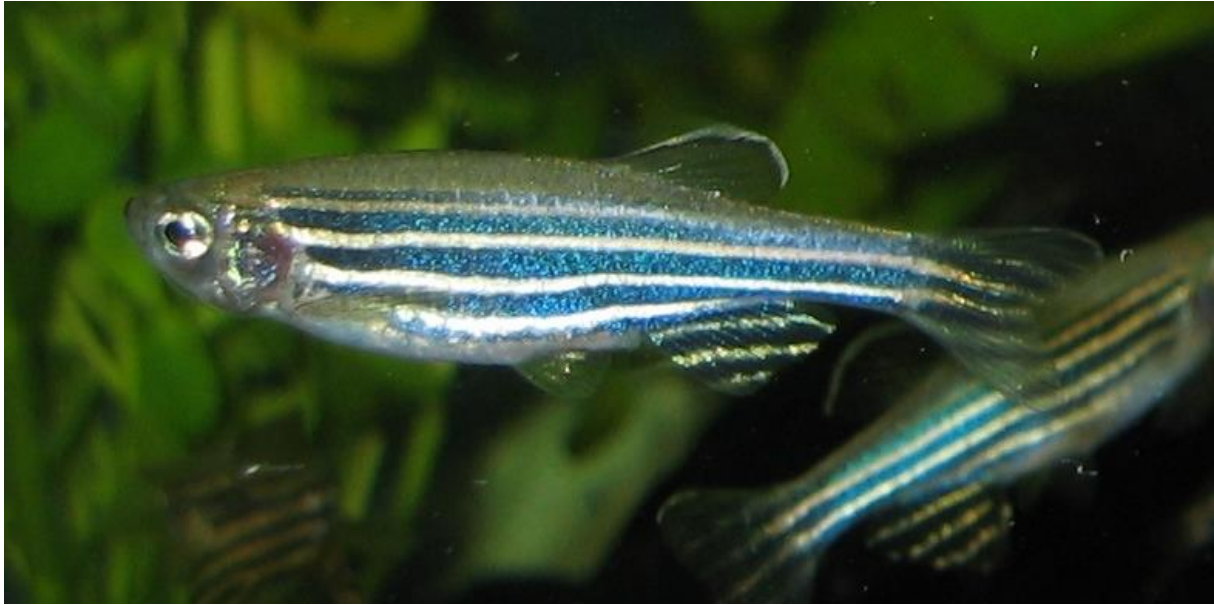


Abbildung 2: Zebrabärbling (*Danio rerio*; 1822 Hamilton); Quelle: <https://www.goodfreephotos.com/>

Die Bachforelle

Die Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*; Linnaeus 1758) gehört zur Familie der Lachsfische (Salmonidae) und stellt neben der Meerforelle (*Salmo trutta trutta*) und der Seeforelle (*Salmo trutta* f. *lacustris*) eine von drei Formen der Art *Salmo trutta* dar (Abbildung 3). Zu erkennen ist sie zum einen an dem für ihre Gattung typischen torpedoförmigen Körper sowie dem an Stiel und Platte bezahnten Pflugscharbein (Dußling und Berg, 2001). Zum anderen besitzt die Bachforelle bräunlich bis grünlich gefärbte Flanken, welche meist mit dunklen sowie roten hell umrandeten Flecken versehen sind (Vilcinskas, 2004). Der Bauch der Fische weist eine weiße Färbung auf. Im Durchschnitt erreichen Bachforellen eine Länge von 30 bis 50 cm, welche jedoch in größeren Fließgewässern mit ausreichendem Nahrungsangebot übertroffen werden können (Dußling und Berg, 2001; Vilcinskas, 2004). Die natürliche Verbreitung der Bachforelle erstreckt sich über Europa, Westasien und Nordafrika. Als Leitfisch der Forellenregion bewohnt sie kühle, sauerstoffreiche sowie strukturreiche Fließgewässer mit Kies- oder Geröllgrund (Dußling und Berg, 2001; Vilcinskas, 2004). Sie lebt räuberisch und ernährt sich überwiegend von Invertebraten, Fischen und Amphibien (Vilcinskas, 2004). Als sogenannte Winterlaicher pflanzen sich Bachforellen zwischen Oktober und Januar fort, wobei im Durchschnitt 500 bis 1500 Eier (pro Weibchen) in selbst angelegte kiesige Laichgruben gelegt werden. Nach der Eiablage erfolgt die Befruchtung der Eier durch das Männchen. Die Untersuchung von Bachforellen erfolgte im Rahmen des in Kapitel 2.3 vorgestellten Projektes.



Abbildung 3: Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*; Linnaeus 1758); Quelle: Peter Rey; Hydra Institut

Die Regenbogenforelle

Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*; Walbaum, 1792), welche nachfolgend in Abbildung 4 dargestellt ist, gehört ebenfalls zur Familie der Lachsfische (Salmonidae). Anders als die Bachforelle stellt Sie eine nicht-heimische Art dar, welche Ende des 18. Jahrhunderts als begehrter Speisefisch von Nordamerika nach Europa eingeschleppt wurde und heute durch Besatzmaßnahmen in vielen Teilen der Welt verbreitet ist. Sie weist einen langgestreckten und seitlich abgeflachten Körper, einen braun bis olivgrün gefärbten Rücken sowie grünlich bis silbrig gefärbte Flanken auf. Ein weiteres charakteristisches Merkmal stellt das rosafarbene Band dar, welches sich an den Flanken auf Höhe der Seitenlinie vom Kiemendeckel bis hin zum Ansatz der Schwanzflosse erstreckt. Weiterhin weist sie eine ausgeprägte dunkle Punktierung des Körpers auf, welche sich auch auf der Schwanz- sowie der Rückenflosse wiederfindet (Dußling und Berg, 2001). Im Durchschnitt erreicht *Oncorhynchus mykiss* Längen zwischen 35 und 50 cm, jedoch sind auch Maximallängen von mehr als 70 cm möglich (Vilcinskas, 2004). Durch Besatzmaßnahmen ist sie nicht nur in kühlen und sauerstoffreichen Fließgewässern, sondern auch in Seen und Teichen zu finden. Das Nahrungsspektrum ist dem der Bachforelle ähnlich. Abhängig vom Gewässertyp und den vorherrschenden Bedingungen (z. B. der Temperatur) erstreckt sich die Laichzeit von Oktober bis Mai (Vilcinskas, 2004). Da bei der Fortpflanzung dieselben Laichplätze wie bei den heimischen Salmoniden favorisiert werden, kann es zu einer Verdrängung der selbigen kommen (Dußling und Berg, 2001). Aus diesem Grund ist ein Besatz mit Regenbogenforellen heute in vielen Fließgewässern untersagt. Ein Paragraph der Landesfischereiverordnung (LFischVO, 1998) verbietet das Aussetzen von Regenbogenforellen in den Bodenseezuflüssen. Die Analysen von Regenbogenforellen erfolgten im Rahmen der Untersuchung am Regen- und Klärbecken Dürren bzw. an der Argen (Kapitel 3.1).



Abbildung 4: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*; Walbaum, 1792); Quelle: Alexander Elsässer

Die Bachschmerle

Die Bachschmerle (*Barbatula barbatula*; Linnaeus 1758) aus der Familie der Plattschmerlen (Balitoridae) ist ein kleiner, standorttreuer und nachtaktiver Bodenfisch (Abbildung 5). Sie besitzt einen drehrunden, langgestreckten Körper, der im Schwanzteil seitlich abgeflacht ist. Der abgeflachte Kopf weist ein unterständiges Maul sowie sechs Bartfäden an der Oberlippe auf. Weiterhin befindet sich unterhalb des Auges ein aufrichtbarer Dorn. Die Schuppen sind wie bei den meisten Plattschmerlen sehr klein und fehlen bei dieser Art am Vorderrücken sowie auf der Brust. Mit Ausnahme des weißen Bauches weist die Bachschmerle am gesamten Körper eine gräulich bis bräunliche Färbung mit dunkler Marmorierung auf. Im Durchschnitt erreicht Sie eine Länge von ca. 12 cm. Als rheophile Art ist *Barbatula barbatula* in west- und mitteleuropäischen sowie in sibirischen Fließgewässern anzutreffen. Dabei bevorzugt sie steinige oder kiesige flache Abschnitte in der Forellen-, Äschen- und Barbenregion. Sie ernährt sich überwiegend von Insektenlarven, Würmern und Kleinkrebsen. In der Laichzeit (April bis Mai) werden die Eier vom Weibchen nachts an Steine geheftet und nach der Befruchtung durch das Männchen von demselbigen bewacht. Trotz ihres zahlreichen Vorkommens in manchen Regionen gilt diese Art aufgrund der Verschmutzung und Verschlammung einiger Gewässer sowie dem Verlust geeigneter Gewässerstrukturen als gefährdet (Vilcinskas, 2004). Die Untersuchung wildlebender Schmerlen erfolgte im Rahmen des Projekts am Regen- und Klärbecken Dürren bzw. an der Argen (Kapitel 3.1).



Abbildung 5: Bachschmerle (*Barbatula barbatula*; Linnaeus 1758); Quelle: Peter Rey; Hydra Institut

Die Groppe

Die zur Familie der Gropfen (Cottidae) zählende Groppe (*Cottus gobio*; Linnaeus 1758), selten auch Koppe oder Mühlkoppe genannt, ist ebenfalls ein nachtaktiver, bodenlebender Süßwasserfisch (Abbildung 6). Sie besitzt einen keulenförmigen und schuppenlosen Körper sowie einen für diese Familie typischen großen und breiten abgeflachten Kopf mit endständigem Maul. Weitere charakteristische Merkmale stellen die mit Dornen versetzten Kiemendeckel sowie die auffällig großen Brustflossen dar. Die Bauchflossen sind bei dieser Art brustständig und unterhalb der großen Brustflossen zu finden. Bis auf ihre weiße Unterseite besitzen Gropfen eine variable, dem Untergrund angepasste Färbung. Der Körper weist meist eine gräulich bis bräunliche Färbung mit dunkler Marmorierung auf. Im adulten Zustand erreicht *Cottus gobio* Längen von 10 bis 18 cm. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Westeuropa über Mittel- und Osteuropa bis nach Sibirien. Auch in England und im Süden Skandinaviens ist die Art vorzufinden (Vilcinskas, 2004). Sie bevorzugt sommerkühle sowie sauerstoffreiche Fließgewässer mit sandigem, kiesigem und/oder steinigem Grund, wie sie häufig in der Forellen- und Äschenregion zu finden sind. Unter geeigneten Bedingungen kommt sie auch gelegentlich in brackigen Mündungsbereichen vor (Dußling und Berg, 2001). Aufgrund des Fehlens einer Schwimmblase ist die Groppe eine vergleichsweise schlechte Schwimmerin, welche sich nur ruckartig fortbewegen und nur kurze Strecken bewältigen kann. Sie ernährt sich überwiegend von Insektenlarven und Kleinkrebsen. Abhängig von der Wassertemperatur findet die Fortpflanzung der Gropfen zwischen März und Mai statt. Dabei bereitet das Männchen eine Laichgrube zwischen Steinen vor, in die das Weibchen die Eier (bis zu 1000) ablegt. Als verschmutzungssensitive Art reagiert die Groppe äußerst empfindlich auf die Verunreinigung, Verschlammung sowie Versauerungen ihres Lebensraums. Auch die mangelnde Durchgängigkeit vieler Gewässer stellt für die Groppe ein großes

Problem dar, da aufwärts gerichtete Kompensationswanderungen - und dadurch auch der genetischen Austausch zwischen Teilpopulationen eines Fließgewässers – unmöglich werden (Vilcinskas, 2004). Die Untersuchung des Gesundheitszustands wildlebender Groppen erfolgte im Rahmen des Projekts am Regen- und Klärbecken Dürren bzw. an der Argen (Kapitel 3.1).



Abbildung 6: Groppe (*Cottus gobio*; Linnaeus 1758); Quelle: Peter Rey; Hydra Institut

Die Barbe

Die Barbe (*Barbus barbus*; Linnaeus 1758) ist ein bodenorientierter Schwarmfisch aus der Familie der Karpfenfische (Cyprinidae). Sie besitzt einen langgestreckten und am Rücken leicht gewölbten Körper, der an der Bauchseite abgeflacht ist (Abbildung 7). Der Kopf weist ein spitz zulaufendes unterständiges Maul auf, welches rüsselartig verlängert werden kann. Die Oberlippe ist mit vier Barteln versehen. Der Rücken ist meist braun oder in einem olivähnlichen Ton gehalten, während die Flanken eine grünlich goldene und glänzende Farbe aufweisen. Die Flossen besitzen meist eine bräunliche bis gräuliche Färbung, haben in manchen Gewässern jedoch auch einen rötlichen Schimmer. Barben erreichen im Schnitt Längen von 30 bis 60 cm. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Westeuropa bis hin zum Schwarzen Meer, jedoch sind sie nicht südlich der Alpen und der Pyrenäen anzutreffen. Ebenso sind sie nicht in Nordeuropa und Skandinavien vertreten. Als rheophile Art bevorzugen Barben struktur- und sauerstoffreiche Fließgewässerabschnitte mit Kies- und Sandgrund, wie sie häufig im Mittellauf vieler Flüsse zu finden sind. Als Nahrung dienen kleine Invertebraten wie Insektenlarven, Würmer und Schnecken, aber auch kleine Fische und gelegentlich Fischlaich. Von Mai bis Juli wandern die Barben stromaufwärts, um auf flachen Kiesbänken zu laichen (Vilcinskas, 2004). Die Untersuchung des Gesundheitszustands juveniler Barben erfolgte im Rahmen des Projekts am Regen- und Klärbecken Dürren bzw. an der Argen (Kapitel 3.1).



Abbildung 7: Barbe (*Barbus barbus*; Linnaeus 1758); Quelle: Peter Rey

1.6.2 Untersuchte Testsysteme (Kläranlagen, Regenklärbecken) und Gewässer

Im Folgenden werden die im Rahmen der Promotion untersuchten Testsysteme und Gewässer vorgestellt.

Kläranlage Langwiese (Ravensburg)

Die Kläranlage Langwiese (Abbildung 8) reinigt die Abwässer der Gemeinden Berg und Baienfurt sowie der Städte Ravensburg und Weingarten und stellt mit einer Ausbaugröße von 170.000 Einwohnerwerten die größte Abwassereinigungsanlage im nördlichen Schusseneinzugsgebiet dar. Neben der mechanischen und einer biologischen Stufe besitzt diese Anlage einen Sandfilter (Flockungsfilter) als dritte Reinigungsstufe. Im Herbst 2013 wurde sie mit einer zusätzlichen Verfahrensstufe (Adsorptionsstufe mit Pulveraktivkohle) zur Elimination von Spurenstoffen aufgerüstet, welche sich zwischen der biologischen Stufe und dem Sandfilter befindet. Die Adsorption an die Pulveraktivkohle erfolgt dabei in einem Kontaktbecken mit nachgeschaltetem Sedimentationsbecken. Nach Passage des Flockungsfilters (Sandfilter) wird das gereinigte Abwasser über die Schussen in den Bodensee eingeleitet. Die Kläranlage Langwiese wurde sowohl vor als auch nach dem Ausbau mit einer vierten Stufe untersucht. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Projekte SchussenAktiv und SchussenAktivplus.



Abbildung 8: Kläranlage Langwiese (Ravensburg), Abwasserzweckverband Mariatal; Quelle: Triebkorn (2017)

Kläranlage Tübingen

Das Klärwerk Tübingen behandelt das Abwasser der Stadt Tübingen, des Abwasserzweckverbandes Ammertal sowie von zwei Ortsteilen der Gemeinde Kusterdingen und besitzt eine Ausbaugröße von ca. 100.000 Einwohnerwerten. Das Klärwerk stellt eine konventionelle, zweistufige Abwasserreinigungsanlage dar, welche mit einer mechanischen Reinigungsstufe und einer biologischen Reinigungsstufe ausgestattet ist. Nach erfolgter Klärung wird das behandelte Abwasser in den Neckar bei Tübingen-Lustnau eingeleitet.

Kläranlage Göppingen

Das Klärwerk Göppingen besitzt eine Ausbaugröße von 330.000 Einwohnerwerten und reinigt das Abwasser von neun Städten und Gemeinden. Es stellt, wie die KA Tübingen, ebenfalls eine konventionelle Abwasserreinigungsanlage mit mechanischer Reinigung und nachgeschalteter Biologie (in Kombination mit Phosphatfällung) dar. Als Vorfluter dient die Fils.

Die Kläranlagen Albstadt-Ebingen und Albstadt-Lautlingen

Beide in Albstadt befindlichen Kläranlagen wurden ursprünglich als konventionelle biologische Abwasserreinigungsanlagen in Betrieb genommen und wurden in den 1990er Jahren mit einer weitergehenden Reinigungsstufe ausgestattet. Das ursprüngliche Ziel der weitergehenden Behandlung war eine Elimination der aus Textilfabriken stammenden Farbstoffe und dadurch auch eine Entfärbung der Flüsse Schmiecha und Eyach. Durch die angewandte Technik findet jedoch auch eine Entnahme von Spurenstoffen statt. Heute, 25 Jahre später, ist davon auszugehen, dass auch schwer abbaubare Substanzen wie z. B. Diclofenac ausreichend eliminiert werden. Stellvertretend für beide Anlagen wird im Folgenden nur die Kläranlage Albstadt-Ebingen beschrieben.

Die Kläranlage Albstadt-Ebingen (125.000 Einwohnerwerte) galt bis 1992 hinsichtlich ihrer Ausstattung als eine konventionelle, biologische Abwasserreinigungsanlage, bestehend aus einer einstufigen Belebungsanlage mit Vorklärung, Denitrifikation und Nitrifikation (Wave, 2001). Bereits 1992 wurde sie mit einer weitergehenden Reinigungsstufe ausgestattet, welche sich aus einer adsorptiven Stufe mit Pulveraktivkohle (PAK; 4. Reinigungsstufe) sowie einer chemischen Flockung und einer Filtrationsstufe zusammensetzt. Die weitergehende Behandlung des Abwassers mit PAK nach biologischer Reinigung erfolgt hierbei in einer separaten Verfahrensstufe, bestehend aus einem Kontaktbecken sowie einem nachgeschalteten Sedimentationsbecken, dem Fällmittel hinzugegeben werden. Im Anschluss daran erfolgen eine Filtration des behandelten Abwassers und schließlich die Entlassung des geklärten Abwassers in den Vorfluter, die Schmiecha.

Kläranlage Mannheim

Mit einer Ausbaugröße von 725.000 Einwohnerwerten stellt die Kläranlage Mannheim eine große Abwasserreinigungsanlage dar. Sie besitzt vier Reinigungsstufen. Nach der mechanischen und der biologischen Stufe wird das behandelte Abwasser über einen Zweischichtfilter in den Vorfluter, den Rhein, geleitet. Des Weiteren wird bei niedrigen Temperaturen eine chemische Elimination von Phosphor durch die Zugabe von Eisensalzen durchgeführt. Im Juli 2016 wurde die KA Mannheim mit einer Pulveraktivkohlestufe ausgestattet, bei der ca. 90 % der Jahresabwassermenge behandelt werden. Innerhalb der adsorptiven Stufe erfolgt eine Kreislaufführung der PAK. Zum Zeitpunkt der Untersuchung erfolgte in der KA Mannheim nur in einer von insgesamt fünf Reinigungsstraßen eine weitergehende Behandlung des Abwassers mit Pulveraktivkohle (PAK). Während der adsorptiven Behandlung des Abwassers erfolgte eine Dosierung von 10 mg/L Pulveraktivkohle

Klär- und Rückhaltebecken (RKB) Dürren

Das Klär- und Rückhaltebecken (RKB) Dürren (Abbildung 9) an der Anschlussstelle Wangen-Nord bei Dürren (Kißlegg, Baden-Württemberg, Deutschland) ist ein Regenklärbecken, das während Regenereignissen Straßenabwässer der benachbarten Autobahn (A96) erhält. Es stellt ein isoliertes Absatzbecken zur Behandlung von durch Straßenverkehr verunreinigtem Regenwasser dar und besitzt keine Verbindung zu kommunalen Abwassernetzen und Kläranlagen. Seine Aufgabe besteht darin, die von der A96 eingeleiteten Wasserfrachten durch Sedimentation der gelösten Partikel und verkehrsbürtigen Schadstoffe zu klären. Die oberen Wasserschichten werden durch einen Auslass am Ende des RKB in die Argen, einem Bodenseezufluss, entlassen. Ziel der Untersuchung war es, mithilfe biologischer Untersuchungen zu prüfen, ob durch die Einleitung des RKB Dürren in die Argen Schutzgüter nach FFH-Richtlinie (Fauna und Flora-Habitat-Richtlinie; Directive 92/43/EEC, 1992) Schaden nehmen, bzw., ob durch die Einleitung Risiken für Flora und Fauna im betroffenen

Landschaftsschutzgebiet bestehen. Zur Untersuchung des Einflusses der Einleitung aus dem RKB Dürren wurden zwei Probestrecken ober- und unterhalb der Einleitungsstelle untersucht.



Abbildung 9: RKB Dürren an der A96, Anschlussstelle Wangen-Nord bei Dürren (links); Auslauf des RKB Dürren (rechts)

Schussen

Mit einem Einzugsgebiet von 815 km² ist die Schussen (Abbildung 10) der größte Bodenseezufluss Deutschlands. Sie entspringt nördlich von Bad Schussenried (577 m ü. NN) an der europäischen Wasserscheide und mündet nach einer Fließstrecke von ca. 60 km bei Eriskirch in den Bodensee (395 m ü. NN) (Güde et al., 2010). Bereits in ihrem Oberlauf gilt sie als morphologisch verändertes Gewässer (Regierungspräsidium Tübingen, Begleitdokumentation Schussen, 2008). Ihre charakteristische Färbung erhält die Schussen durch Huminstoffe aus einigen Seen und Mooren, welche sie in der Nähe der Stadt Aulendorf passiert (LUBW, 2010). Insgesamt leiten 19 Kläranlagen ihre gereinigten Abwässer in die Schussen ein. Es handelt sich überwiegend um häusliche Abwässer, jedoch besteht auch ein geringer Teil aus industriellen Abwässern. Hinzu kommen über hundert Regenüberlaufbecken, die bei Starkregenereignissen ungeklärtes Mischwasser einleiten, wodurch die Schussen im Vergleich zu anderen Bodenseezuflüssen als relativ stark belastet gilt (Triebskorn und Hetzenauer, 2012). Die größte Kläranlage an der Schussen ist die Kläranlage Langwiese bei Ravensburg. Sie trägt in etwa 50 % zu der in die Schussen eingeleiteten Gesamtabwasserfracht bei. Sowohl die Schussen als auch die Kläranlage Langwiese standen im Fokus der Projekte SchussenAktiv und SchussenAktiv*plus*.



Abbildung 10: Schussen an bei Baumgarten (PS3; links) und bei Eriskirch (PS6; rechts)

Argen

Die Argen (Abbildung 11) ist der drittgrößte Bodenseezufluss und besitzt ein Einzugsgebiet von 653 km². Sie entsteht östlich von Neukirch durch den Zusammenfluss von Oberer und Unterer Argen. Die Untere Argen entspringt im Allgäu (860 m ü. NN) und besitzt eine Fließstrecke von 69 km. Die Obere Argen wird durch den Zusammenfluss von Seelesgraben und Schwarzenbach (ca. 790 m ü. NN) im Allgäu gebildet und legt bis zum Zusammenfluss mit der Unteren Argen eine Strecke von ca. 50 km zurück. Die vereinigte Argen mündet nach 23 km zwischen Kressbronn und Langenargen in den Bodensee. Insgesamt befinden sich nur 8 Kläranlagen im Argen-Einzugsgebiet. In Kombination mit dem hohen mittleren Abfluss der Argen (20 m³/s) kommt es durch Verdünnungseffekte zu deutlich geringeren Schadstoffkonzentrationen als in der Schussen (Triebskorn und Hetzenauer, 2012). In den Studien SchussenAktiv und SchussenAktivplus wurde die Untere Argen als Referenzgewässer herangezogen. Im Projekt RKB Dürren (siehe Kapitel 3.1) wurde der Argenabschnitt bei Dürren (Kißlegg) untersucht, um eventuell auftretende Belastungen durch das angeschlossenen Klär- und Rückhaltebecken (RKB) Dürren zu erfassen.



Abbildung 11: Argen unterhalb des RKB Dürren (links); Argen an PS 4 (Projekt SchussenAktivplus, rechts)

Die Schmiecha

Die Schmiecha (ab der Gemarkungsgrenze Straßberg auch Schmeie genannt) ist ein Zufluss der Donau und entspringt auf der Schwäbischen Alb. Ihre Quelle liegt nahe der Europäischen Wasserscheide in Albstadt-Onstmettingen. Auf ihrem Weg zur Donau fließt sie durch die Gemeinden Onstmettingen, Tailfingen, Truchtelfingen, Ebingen (Abbildung 12) und Straßberg. Bis auf ihren Oberlauf nahe der Quelle ist sie vielerorts stark verbaut. In manchen Gemeinden wurde sie auch unter die Erde gelegt. Im Stadtteil Truchtelfingen versickert ein Teil ihres Wassers im Karstsystem und tritt in Albstadt-Ebingen wieder zu Tage. Durch die Verbauung der Schmiecha sowie die Einflüsse aus der Textilindustrie galt dieser Fluss als stark anthropogen beeinträchtigt. Der Rückgang der Textilindustrie, die verbesserte Abwasserreinigung sowie diverse Renaturierungsmaßnahmen führten in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der Gewässergüte und der Gewässerdurchgängigkeit.



Abbildung 12: Schmiecha unterhalb der Kläranlage Albstadt-Ebingen

Eyach

Die Eyach (Abbildung 13) ist ein Zufluss des Neckars und entspringt - nahe der Europäischen Wasserscheide - auf der Schwäbischen Alb bei Albstadt-Pfeffingen. Auf Ihrem Weg in Richtung Neckar durchquert sie die Städte Lautlinge, Balingen, Haigerloch und Horb um schließlich in der Nähe von Börstingen in den Neckar zu münden. Wie die Schmiecha, galt auch die Eyach durch die Einflüsse aus der Textilindustrie galt dieser Fluss als stark anthropogen beeinträchtigt. Der Rückgang der Textilindustrie und die verbesserte Abwasserreinigung führten auch hier in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der Gewässergüte und der Gewässerdurchgängigkeit.



Abbildung 13: Eyach oberhalb (links) und unterhalb (rechts) der der Kläranlage Albsatdt-Lautlingen

1.6.3 Angewandte Methoden

Limnologische Untersuchungen

Begleitend zu den ökotoxikologischen Analysen wurden bei allen durchgeführten Freilanduntersuchungen limnologische Messungen bzw. Tests durchgeführt. Die Parameter Leitfähigkeit, Temperatur, pH-Wert sowie Sauerstoffsättigung und Sauerstoffgehalt wurden mithilfe geeigneter Messgeräte (Hach-Lange GmbH, Deutschland) vor Ort in der Strömung gemessen. Für weitere limnologische Untersuchungen wurden Wasserproben aus den untersuchten Fließgewässern entnommen, unter Kühlung transportiert und nach Ankunft im Labor umgehend analysiert. Die Ermittlung der Gehalte an Chlorid, Ortho-Phosphat-Phosphor, Nitrat-Stickstoff, Nitrit-Stickstoff und Ammonium-Stickstoff wurden mithilfe von Küvettentests (*NANOCOLOR*[®] Rundküvettentests; Macherey-Nagel; Deutschland) und eines Kompaktphotometers (Kompaktphotometer PF-12; Macherey-Nagel; Deutschland) durchgeführt. Die Carbonat- und Gesamthärte-Messungen erfolgten mithilfe von Tröpfchentests (MColortest[™]) der Firma Merck. Die Einstufung der Messwerte erfolgte anhand der von der LAWA (Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser) vorgegebenen Orientierungswerte aus dem Jahre 2008 (LUBW, 2008) sowie der Oberflächengewässerverordnung von 2011 (OGewV, 2011).

Der Fischembryotest

Der Fischembryotest mit dem Zebraabräbling (*Danio rerio*) ist ein etablierter und weltweit angewandter Test, mit dem entwicklungstoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben detektiert werden können. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation angewandten Fischembryotests erfolgten in Anlehnung an den „Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ (OECD, 2013). Die Anwendung des Test auf Sedimentproben erfolgte in Anlehnung an die Modifikation von Hollert et al. (2003). Die verwendeten Zebraabräblingseier wurden unmittelbar nach der Befruchtung gegenüber Proben der

untersuchten Anlagen bzw. gegenüber Sediment- und Oberflächenwasserproben der untersuchten Fließgewässer exponiert. Als Negativkontrolle diente Kunstwasser nach ISO 7346-3 (DIN EN ISO 7346-3:1998-03, 1998). Die Exposition der befruchteten Eier (je fünf pro Schale) erfolgte in kleinen Glaspetrischalen (n = 5). Bei der Untersuchung von Sediment- und Oberflächenwasserproben wurden die Glaspetrischalen (30 mm Durchmesser, Schott Duran) mit 2,5 g des entsprechenden Sediments gefüllt und mit dem dazugehörigen Oberflächenwasser überschichtet. Jede Probe wurde in drei unabhängigen Testdurchläufen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Während des Untersuchungszeitraums von 96 Stunden wurden zu definierten Zeitpunkten subletale und letale Endpunkte festgehalten (siehe Tabelle 2). Die Beobachtung der Embryonalentwicklung (Abbildung 14) sowie die Bestimmung der Endpunkte wurden an einem Binokular (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Während des Experiments wurden die Eier bei 26 ± 1 °C im Wärmeschrank bei einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h Licht /12 h Dunkelheit gehältert.

Der für die Untersuchungen von Abwasserproben aus den Kläranlagen sowie Sediment- und Oberflächenwasserproben aus den Fließgewässern eingesetzte Fischembryotest stellt einen sogenannten Wirkpotentialtest dar, bei dem potentiell im Freiland auftretende Wirkungen im Labor untersucht werden. Im Gegensatz hierzu stehen die Untersuchungen im Freiland (Fließgewässern), bei denen tatsächliche Effekte in freilebenden Biota nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Beobachtete Endpunkte im Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

Endpunkte	Stunden nach Befruchtung							
	8 h	12 h	24 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h
Koagulation (Mortalität)	X	X	X	X	X	X	X	X
Schlupfrate					X	X	X	X
Entwicklungsverzögerungen								
Epibolie	X							
Gastrulation		X						
Somitenbildung			X					
Schwanzablösung			X					
Spontane Kontraktionen			X					
Augenbildung			X					
Herzschlagrate (Schläge/min)				X				
Otolithenbildung					X			
Melanozytenbildung					X			
Fehlbildungen								
Ödeme (an Herz/Dottersack)					X			
Fehlbildung der Augen					X	X	X	X
Schwanzdeformationen					X	X	X	X
Deformation der Wirbelsäule					X	X	X	X
Schwache/fehlerhafte Pigmentierung					X	X	X	X

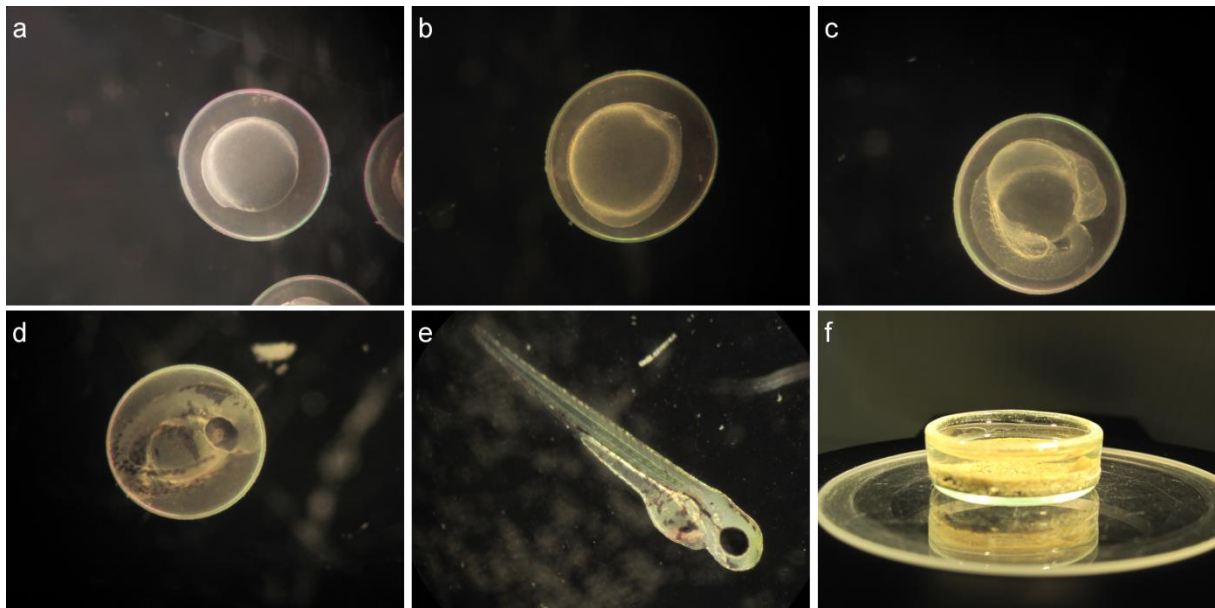


Abbildung 14: Embryonalstadien von *Danio rerio*; a) 8 h, b) 12 h, c) 24 h, d) 60 h und e) 96 h nach Befruchtung; f) Expositionsgesäß mit Sediment- und Oberflächenwasserprobe

Histopathologische Untersuchungen

Mithilfe histopathologischer Methoden können Organe auf Gewebe- bzw. Zellschäden untersucht werden. Zelluläre Biomarker dienen hierbei der Charakterisierung des Gesundheitszustandes beeinträchtigter Organismen, in diesem Fall von Fischen. Die Präparation der untersuchten Fische erfolgte während den Probenahmen im Freiland nach Betäubung und Tötung mittels einer Überdosis MS-222 (Ethyl-3-Aminobenzoat-Methansulfonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und anschließendem Genickschnitt. Dabei wurden Gewebeproben von Kiemen, Niere und Leber entnommen und umgehend in eine Fixierlösung überführt (2 % Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylat-Pufferlösung; pH 7,6). Nach mehrtägiger Fixierung bei 4 °C wurden die Präparate in Cacodylatpuffer gewaschen und, falls notwendig, in einem Gemisch (1:2) aus Ameisensäure (98 %) und Ethanol (70 %) entkalkt. Im Anschluss wurden die Proben in einem Einbettautomaten (Model TP 1020; Leica Biosystems; Deutschland) mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Modell SM 2000 R; Leica Biosystems; Deutschland) wurden histologische Schnitte (Schnittdicke 2 µm) aus den in Paraffin eingebetteten Proben hergestellt. Diese wurden auf Objektträger überführt und mittels einer Hämatoxylin-Eosin- bzw. in einer Alcianblau-PAS-Färbereihe angefärbt.

Die lichtmikroskopische Auswertung der angefertigten Gewebedünnschnitte wurde an einem Fotomikroskop der Firma Zeiss (Modell: Axioskop2; Zeiss; Deutschland) durchgeführt. Fotografien der Schnitte wurden mit einer Mikroskopkamera (AxioCam MRC) sowie der *AxioVision* LE-Software erstellt und bearbeitet. Der Zustand der Gewebe wurde nach der von Triebkorn et al. (2007, 2008)

beschriebenen Methode qualitativ sowie semi-quantitativ bewertet. Die Auswertung der Schnitte erfolgte blind (Blindauswertung) und auf der Basis einer fünfstufigen Skala. Die Klasse 1 steht hierbei für den Kontrollzustand der Gewebe, die Klasse 3 für einen Reaktionszustand und die Klasse 5 für den Destruktionszustand. Die Klassen 2 und 4 stellen Zwischenstufen dar. Die Abbildungen 15 bis 17 zeigen Beispiele histologischer Schnitte der untersuchten Organe sowie einige pathologische Befunde.

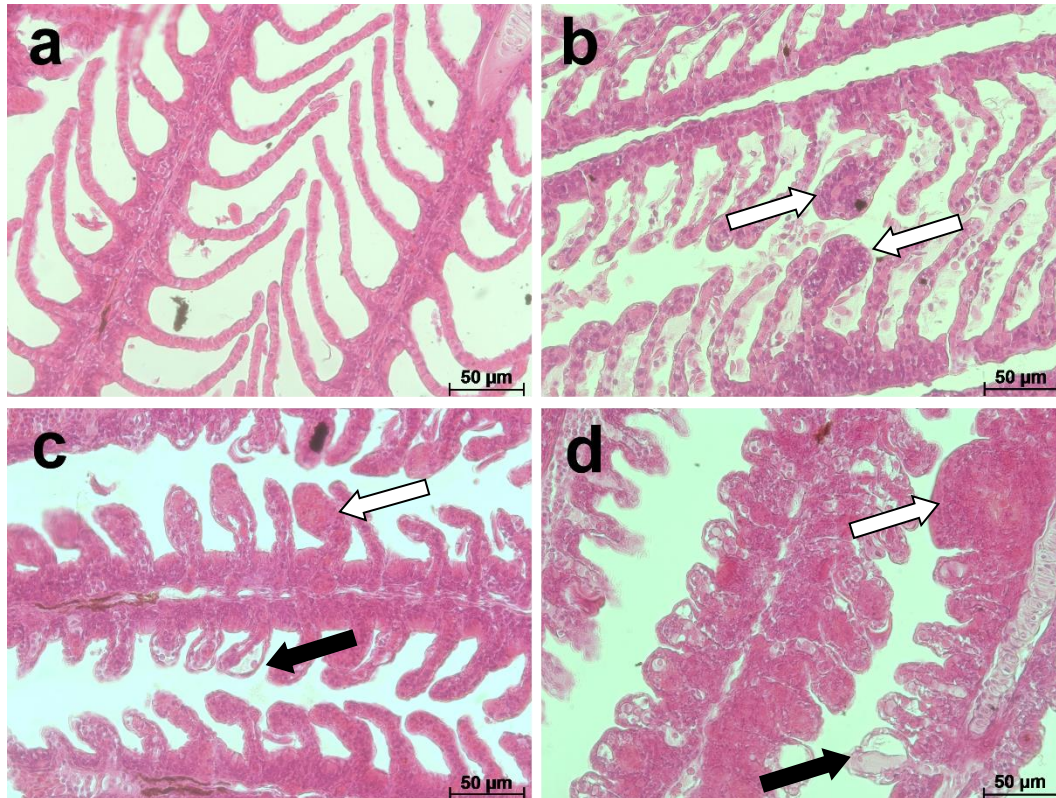


Abbildung 15: Histologische Schnitte einer Kieme; a) Kontrollzustand; b) Hyperplasie von Epithelzellen; c) erweiterte Bluträume (Aneurysmen, weißer Pfeil), Epithel-Lifting (schwarzer Pfeil); d) Fusion von Sekundärlamellen (weißer Pfeil), Epithelzell- und Pfeilerzellnekrosen (schwarzer Pfeil)

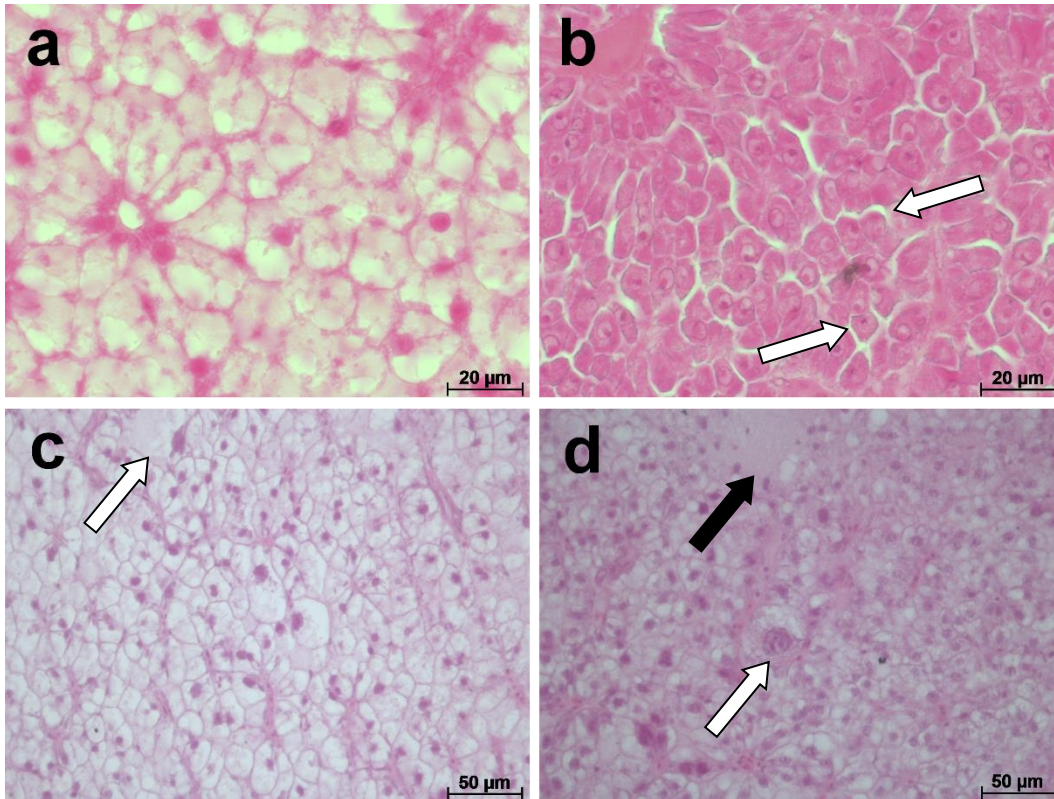


Abbildung 16: a) Kontrollzustand Leber; b) Erweiterte Interzellularräume; c) starke Hypertrophie einer Leberzelle, d) Hypertropher Zellkern (weißer Pfeil), nekrotisches Areal (schwarzer Pfeil)

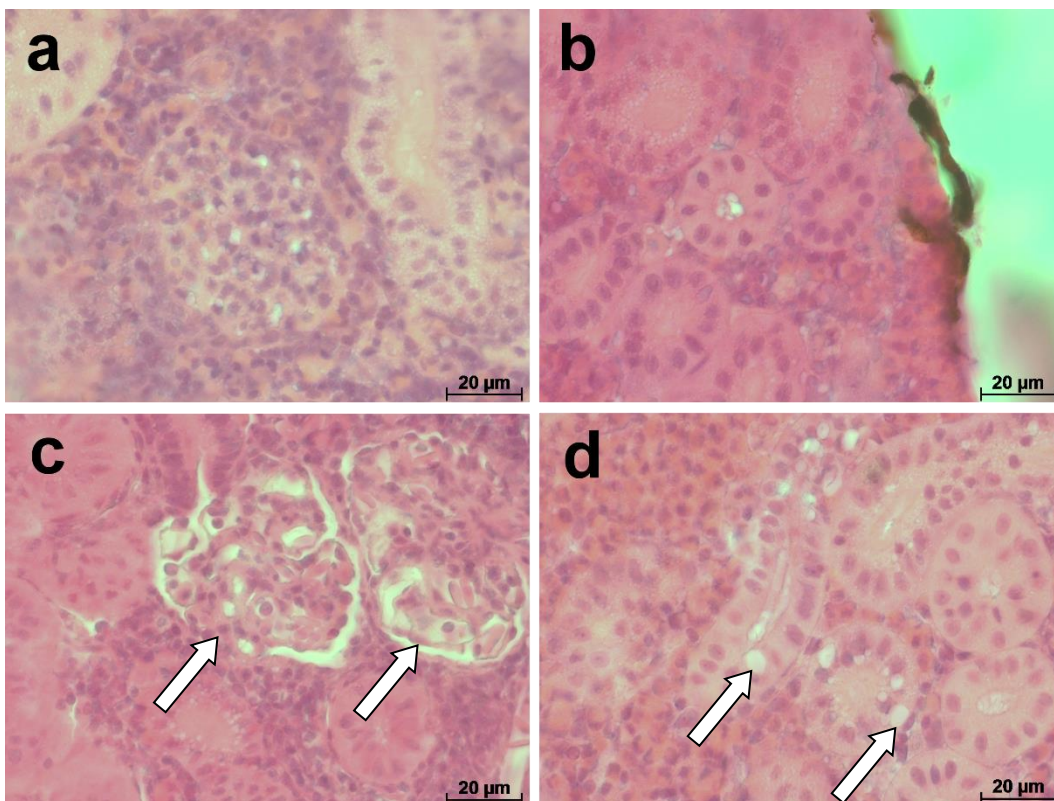


Abbildung 17: a) Kontrollzustand Glomerulus; b) Kontrollzustand Nierentubuli; c) degenerierte Glomeruli; d) Starke Vakuolisierungen in Tubuluszellen

Mikrokerntest

Zur Untersuchung von genotoxischen Einflüssen wurden den Fischen während den Probenahmen Blutproben entnommen. Im Anschluss wurde das Blut auf einen mit Ethanol entfetteten Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden angelehnt an die Arbeit von Rocha et al. (2009) für eine Minute in einer Küvette mit Methanol fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die so fixierten Blutausrich wurden bis zur Färbung gekühlt aufbewahrt. Die Färbung der Blutausrich erfolgte mit Giemsa-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Labor. Während des Färbvorgangs kommt es zu einer Komplexbildung zwischen DNA und Farbstoffen, wodurch Zell- und Mikrokerne sichtbar gemacht werden. Die Auswertung der Blutausrich erfolgte in Anlehnung an Rocha et al. (2009) unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops (Fa. Zeiss) bei hundertfacher Vergrößerung. Pro Blutausrich wurden 2000 Erythrozyten mit einem Handzähler ausgezählt und der prozentuale Anteil an Erythrozyten mit Mikrokerne ermittelt.

Stressproteinanalyse

Durch Stressproteinanalysen können proteotoxische Effekte in Organismen nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hsp70-Analysen wurden in den zentralen Stoffwechselorganen Kieme, Leber und Niere der Fische durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Gewebeprobe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Messung der relativen Hsp70-Gehalte erfolgte mit einem etablierten und gut reproduzierbaren Immunoblotting-Verfahren. Hierzu werden die Proben zunächst homogenisiert (Extraktionspuffer: 80mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 20 mM Hepes) und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (20000 g). Im Anschluss erfolgte eine Quantifizierung des Proteingehalts im Überstand der Probe nach Bradford (1976), um in den späteren Schritten für alle Proben dieselbe Menge an Gesamtprotein auftragen zu können. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Proteine über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und daraufhin in einem Semi-dry-blotting Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Hsp70-Moleküle konnten dann mittels Antikörperreaktionen detektiert werden. Hierbei ist der Zweitantikörper an ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt, mit dem die Detektion der Hsp70-Proteine auf der Nitrocellulosemembran ermöglicht wird. Durch die Zugabe von 4-Chlor(1)Naphthol, einem Farbstoff, katalysiert die an den Antikörper gebundene Peroxidase eine Färbereaktion, durch die die Hsp70-Proteine auf der Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung der erhaltenen Signale erfolgte durch die Bestimmung des optischen Volumens. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden alle Signale in Relation zu einem Hsp70-Standard (*Danio rerio*, Ganzkörperhomogenat) gesetzt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel und JMP 11.0 (SAS Institute GmbH, Deutschland).

Beim Fischembryotest wurden die Mortalitätsraten und die Schlupfraten mithilfe einer Cox Regression (Regressionsanalyse) ausgewertet. Bei der Fehlbildungsrate sowie der Rate der Entwicklungsdefizite wurde der Likelihood-Ratio-Test mit anschließender sequentieller Bonferroni-Holm Anpassung. Die Analyse der Herzschlagraten startete mit einem d'Agostino–Pearson Omnibus Test zur Analyse der Normalverteilung, gefolgt von einem Levene's Test zur Prüfung der Varianzhomogenität. Abhängig vom Vorhandensein einer Normalverteilung und Varianzhomogenität wurde entweder eine ANOVA (parametrisch), gefolgt von einem Post-Hoc Tukey-Kramer HSD-Test, oder ein Kruskal–Wallis Test (nicht-parametrisch) mit anschließendem Steel–Dwass Post Hoc Test durchgeführt. Bei der Auswertung der Daten aus den histopathologischen Untersuchungen erfolgte die Anwendung des Likelihood-Ratio- χ^2 -Tests. Zur statistischen Auswertung der Daten aus dem Mikrokerntest wurde ein gepaarter t-Test (Zweistichproben-Test) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde in allen Tests auf 5 % ($\alpha = 0,05$) festgesetzt.

1.6.4 Zusätzlich erfolgte Untersuchungen

Im diesem Abschnitt erfolgt eine Methodenvorstellung begleitender Analysen, welche von Kooperationspartnern durchgeführt wurden. Die von den Kooperationspartnern erhobenen Daten ergänzen die im Rahmen der Promotion durchgeführten Untersuchungen und dienen der Interpretation der Ergebnisse.

Chemische Analytik

Das TZW (Technologiezentrum Wasser) Karlsruhe führte die chemischen Analysen der Sediment- und Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Schussen, Argen und Schmiecha sowie die Analysen der Proben aus der Kläranlage Langwiese durch (siehe auch Kapitel 1.3, 1.4 und 2.2). Alle analytischen Messungen erfolgten auf der Basis einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC Serie 1200 oder 1290, Agilent Technologies, Deutschland) in Verbindung mit einer Tandem-Massenspektrometrie (API Serie 4000, 4500 und 5500, AB Sciex, USA). Das Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Universität Stuttgart analysierte die Fisch- und Sedimentproben im Projekt „RKB Dürren“ (siehe Kapitel 3.1). Die hier durchgeführten chemischen Analysen wurden mithilfe einer Gaschromatographie (HRGC Agilent 6890N) mit gekoppelter Massenspektrometrie (LRMS Agilent 5975N) durchgeführt.

Untersuchung des Makrozoobenthos

Die Untersuchung des Makrozoobenthos der in den Kapiteln 2.2. und 3.1. vorgestellten Projekte erfolgte durch das Gewässerökologische Labor Starzach (GÖL Starzach; Deutschland) gemäß des Moduls Makrozoobenthos der WRRL. Die Beprobung des Makrozoobenthos erfolgte nach dem Multi-Habitat-Sampling-Verfahren (Aquem-Star), bei dem 20 Teilproben (Fläche: 25 x 25 cm) mithilfe eines Surber-Samplers (500 µm Maschenweite; ISO 8265) entnommen und zu einer Gesamtprobe vereinigt wurden. Die Auswertung, die Ermittlung der Gewässergüte sowie die Ermittlung weiterer ökologischer Indices erfolgte nach dem „Perlodes“-Bewertungssystem unter Zuhilfenahme der Auswertungs-Software „ASTERICS“ (AQEM/STAR Ecological River Classification System 4.04).

1.7 Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 1: Bewertung der Reinigungsleistung von konventionell ausgestatteten Kläranlagen hinsichtlich der Reduktion embryotoxischer Potentiale im Abwasser mithilfe des Fischembryotests (FET)

Kapitel 1.1:

Bewertung von Abwasserproben aus der Kläranlage Tübingen durch Anwendung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) (unveröffentlicht)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH

Thellmann, P. und Triebkorn, R. (2014)

Zur Bewertung der Reinigungseffizienz des Klärwerks Tübingen, welches eine konventionelle zweistufige Abwasserreinigungsanlage darstellt, wurden ökotoxikologische Untersuchungen mit Zulauf- sowie Ablaufproben von sieben aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Ziel war es, die Reinigungseffizienz mithilfe der angewandten Tests zu bewerten. Weiterhin sollte durch den Vergleich von Proben, die am mehreren aufeinander folgenden Tagen entnommen wurden, die Reinigungseffizienz bei unterschiedlichen Witterungsverhältnissen analysiert werden. Die Daten wurden gemeinsam mit Ergebnissen anderer biologischer Untersuchungen zur Gesamtbewertung der Anlage herangezogen und dienten als Grundlage für die Entscheidung über eine Aufrüstung mit einer zusätzlichen Stufe zur weitergehenden Abwasserreinigung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fischembryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) angewendet. Durch diesen Wirkpotentialtest ist es möglich, embryotoxische Potentiale in Abwasserproben zu detektieren und dadurch das Gefahrenpotential der jeweiligen Proben sowie das Risiko für die Fauna im aufnehmenden Gewässer, in diesem Fall dem Neckar, abzuschätzen. Durch den Vergleich zwischen Zu- und Ablaufproben sollte die Reduktion der embryotoxischen Effekte bzw. Potentiale während der Abwasserreinigung in der KA Tübingen erfasst werden. Der Einsatz von befruchteten Zebrafisch-Eiern zur Abwasserbewertung und -überwachung ist durch das Abwassergesetz (Deutsche Bundesregierung, 2004) vorgeschrieben. Der dabei angewendete Fischembryotest (DIN EN ISO 15088:2007, 2009) sieht eine 48-stündige Expositionszeit vor, in der unterschiedliche letale Endpunkte dokumentiert werden. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fischembryotest wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden durchgeführt, wodurch auch Reaktionen erfasst werden können, die erst nach dem Schlupf der exponierten Tiere stattfinden. Des Weiteren

werden bei diesem Test neben letalen auch subletale Parameter wie die Schlupf- und Fehlbildungsrate festgehalten.

Die erhobenen Daten aus der Untersuchung der KA Tübingen deuten auf eine effektive Reduktion der embryotoxischen Potentiale im gereinigten Abwasser hin. In Bezug auf die Parameter Mortalität, Schlupfrate, Fehlbildungsrate sowie die Rate an Entwicklungsverzögerungen zeigten die im Ablauf exponierten Tiere nur geringe Reaktionen, welche sich im Bereich der biologischen Variabilität bewegen, und daher nicht als Effekte des gereinigten Abwassers einordnen lassen. Die hohe Relevanz des verlängerten Fischembryotests (Expositionszeit von 96 h) wurde durch die Exposition von Zebraablarblingseiern gegenüber den mechanisch geklärten Zulaufproben der KA Tübingen deutlich. Die hier exponierten Embryonen zeigten bis zum Verlassen des Chorions (ca. 60 h nach Befruchtung) eine normale, der Kontrolle ähnliche Entwicklung. Erst nach dem Verlassen der protektiven Eihülle wurden erhöhte Fehlbildungs- und Mortalitätsraten dokumentiert, welche durch den im Abwassergesetz vorgeschriebenen Fischeitest (DIN EN ISO 15088:2007) infolge der kurzen Expositionszeit vermutlich nicht hätten detektiert werden können. In zwei der insgesamt drei durchgeführten Testdurchläufe zeigten einige der gegenüber dem geklärten Abwasser exponierten Tiere eine reduzierte Herzschlagrate, welche auf eine Beeinträchtigung des Kreislaufsystems durch eventuell vorhandene Schadstoffe hindeutet. Chemische Stressoren können für eine Reduktion der Herzschlagrate verantwortlich sein. Durch Entgiftungsvorgänge kann es zu einer Senkung der Stoffwechselrate kommen, um ausreichend Energie für die Metabolisierung des Schadstoffes bzw. des Stressors bereitzustellen (Strmac et al., 2002). Die Senkung der Metabolismusrate kann schließlich auch zur Reduktion der Herzschlagrate führen.

Zusammenfassung: Es hat sich gezeigt, dass die Reinigungseffizienz der KA Tübingen auf der Basis von Untersuchungen mit dem Fischembryotest als gut eingestuft werden kann, da eine deutliche Reduktion der Effekte in den Abwässern beobachtet wurde. Da jedoch immer noch leichte Reaktionen beim Parameter Herzschlagrate zu beobachten waren, ist eine negative Langzeitwirkung nicht auszuschließen. Eine Langzeitexposition von Versuchstieren gegenüber Abwasserproben könnte eventuell zu anderen oder deutlicheren Ergebnissen führen.

Kapitel 1.2:

Untersuchungen der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen mithilfe des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) (unveröffentlicht)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH

Theilmann, P. und Triebkorn, R. (2015)

Die Bewertung der Reinigungseffizienz der Kläranlage Göppingen erfolgte in Anlehnung an der in Kapitel 1.1 beschriebenen Untersuchung des Klärwerks Tübingen. In diesem Projekt wurden ebenfalls Zulauf- sowie Ablaufproben von sieben aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Fischembryotest im Rahmen einer gesetzlich vorgeschriebenen Abwasseruntersuchung analysiert, um Schwankungen bezüglich der Reinigungseffizienz im Wochenverlauf zu erfassen. Der Vergleich zwischen Zu- und Ablaufproben eines jeden Probenahmetages ermöglichte es, die Reduktion an embryotoxischen Potentialen in den Abwasserproben zu ermitteln und die Reinigungseffizienz bezüglich der Effekte bei Fischen zu bewerten. Hierdurch wurde eine Abschätzung des Gefahrenpotentials für die Fische im aufnehmenden Gewässer Fils ermöglicht. Des Weiteren wurden die Ergebnisse für die Entscheidung über eine Aufrüstung mit einer zusätzlichen Reinigungsstufe zur weitergehenden Abwasserreinigung herangezogen.

Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Reduktion der embryotoxischen Effekte bzw. Potentiale in der KA Göppingen hin. Die gegenüber den Proben des Kläranlagenablaufs exponierten Embryonen zeigten bezüglich der letalen Endpunkte sowie den Parametern Herzschlagrate und Fehlbildungsrate nur schwache Reaktionen, wie sie auch teilweise bei Kontrolltieren und damit auch im Rahmen der biologischen Variabilität auftreten. Jedoch wurde beim subletalen Parameter Schlupfrate eine deutliche Beeinträchtigung (reduzierte Schlupfrate) der in den Ablaufproben exponierten Embryonen festgestellt, weshalb das gereinigte Abwasser der KA Göppingen nicht als vollkommen unbedenklich eingestuft werden konnte. Da der hier durchgeführte Test nur eine Expositionszeit von 96 Stunden vorsieht, jedoch heimische Fischarten im Fließgewässer eine kontinuierliche Exposition mit gereinigtem Abwasser erfahren, ist eine Beeinträchtigung der Fischentwicklung bei heimischen Fischarten im aufnehmenden Gewässer (Fils) nicht auszuschließen. Hinzu kommt, dass einheimische Fischarten wie die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und die Groppe (*Cottus gobio*) sensitiver als der Zebrafisch auf Abwasser reagieren können (Bucher et al., 1992; Escher et al., 1999). Weiterhin zeigte das behandelte Abwasser der KA Göppingen einen vergleichsweise hohen Gehalt an Schwebstoffen, welcher bei den Untersuchungen der gereinigten Abwässer aus den Kläranlagen Tübingen, Langwiese, Albstadt-Ebingen und Mannheim nicht zu beobachten war. Da Schwebstoffe oftmals auch organische Bestandteile und Schadstoffe enthalten, ist ein Eintrag derselbigen in das

aufnehmende Gewässer nicht auszuschließen. Eine begleitende chemische Analyse der Ablaufproben in Verbindung mit weiteren biologischen Testverfahren auf unterschiedlichen biologischen Ebenen würde hier zu einem deutlicheren Bild des Belastungszustandes der Ablaufproben in der KA Göppingen führen.

Zusammenfassung: Die Ergebnisse deuten auf eine deutliche Reduktion embryotoxischer Schadstoffen in der KA Göppingen hin. Jedoch zeigte die Beeinflussung der Schlupfrate in den mit Ablaufproben durchgeführten Tests, dass negative Effekte bei einer Langzeitexposition von sensitiveren Organismen im Gewässer nicht auszuschließen sind. Auch sollte vor einer abschließenden Bewertung der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen eine weitere Analysekampagne zu einer anderen Jahreszeit in Erwägung gezogen werden, da in den Wintermonaten andere Bedingungen (geringerer Niederschlag, Salzung der Straßen, höherer Konsum von Arzneimitteln) herrschen als im Sommer.

Kapitel 2: Bewertung der Reinigungsleistung von Kläranlagen sowie der Belastung in den angeschlossenen Fließgewässern (Vorflutern) mithilfe des Fischembryotests (FET) und parallel durchgeführten Wirkuntersuchungen

Kapitel 2.1

Nachweis biologischer Wirkungen in Proben aus der Kläranlage Mannheim – *Ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser*

Im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg (unveröffentlicht)

Triebskorn R., Thellmann P., Escher B., Gartiser S., Knauer M., Kuch B., Wagner M. (2015)

Die diesem Kapitel zugrunde liegenden Untersuchungen sind Teil eines Verbundprojektes, im Rahmen dessen unterschiedlich behandelte Abwasserproben aus der Kläranlage (KA) Mannheim parallel mit verschiedenen Biotests untersucht wurden. In Tabelle 3 sind die Kooperationspartner sowie die eingesetzten Testverfahren zusammengefasst. Durch die Untersuchung von Proben aus dem Ablauf eines Zweischichtfilters nach konventioneller Abwasserbehandlung (F_b) sowie der Untersuchung von Ablaufproben eines Zweischichtfilters nach zusätzlicher Behandlung mit Pulveraktivkohle (F_a) wurde ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser möglich. Zum Zeitpunkt der Untersuchung erfolgte in der KA Mannheim nur in einer von fünf Reinigungsstraßen eine weitergehende Behandlung des Abwassers mit Pulveraktivkohle (PAK). Ziel dieses Vergleichs war es, festzustellen, ob durch die zusätzlich installierte adsorptive Stufe eine weitere Reduktion von

biologischen Reaktionen im behandelten Abwasser erfolgt. Die Ergebnisse der biologischen Analysen wurden zusammen mit Messdaten aus der chemischen Analytik zur Gesamtbewertung der PAK-Stufe herangezogen und dienten als Grundlage für die Entscheidung über einen weitergehenden Ausbau der KA Mannheim mit einer adsorptiven Stufe. Ein weiteres Ziel stellte die Entwicklung einer für die Abwasseruntersuchung routinemäßig einsetzbaren Testbatterie („Ökotox-Box“) dar, welche sich aus *in vivo*- und *in vitro*-Testsystemen zusammensetzt und so Reaktionen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen erfassen kann.

Für die Untersuchung der KA Mannheim wurde zu drei ausgewählten Zeitpunkten eine 24-h-Sammelprobe (bei Trockenwetter) an den drei Probestellen NKB (Ablauf Nachklärung), F_b (Ablauf Zweischichtfilter nach herkömmlicher Behandlung) und F_a (Ablauf Zweischichtfilter nach weitergehender Behandlung mit PAK) entnommen. Durch den Vergleich mehrerer Probenahmetage sollten Schwankungen bezüglich der Reinigungseffizienz erfasst werden. Weiterhin erfolgte auch ein Vergleich zwischen nativen und angereicherten Proben.

Tabelle 3: Untersuchte Endpunkte, Testsysteme und Projektpartner

Endpunkt	Test	Testsystem	Labor/Kooperationspartner
Dioxinähnliche Toxizität	AhR-CAFLUX	Rattenleberzellen	UFZ Leipzig/ Escher
Gentoxizität	Ames Fluktuationstest	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i>	Hydrotox GmbH Freiburg / Gartiser, Knauer
Gentoxizität/Zytotoxizität	P53-BLA	humane Darmkrebszellen	UFZ Leipzig/ Escher
Oxidativer Stress/ Zytotoxizität	ARE-c32	Humane Brustkrebszellen	UFZ Leipzig/ Escher
Entzündung/ Immuntoxizität/Zytotoxizität	nfKappaB-BLA	Humane Blutzellen	UFZ Leipzig/ Escher
Östrogenität	E-Screen	Brustkrebszellen	Uni Stuttgart / Kuch
Östrogenität	YES	Hefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Anti-Östrogenität	YAES	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Androgenität	YAS	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Anti-Androgenität	YAAS	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Reproduktionstoxizität	Chronischer Daphnientest	<i>In vivo: Daphnia magna</i>	Hydrotox GmbH Freiburg / Gartiser, Knauer
Entwicklungstoxizität	Fischembryotest	<i>In vivo: Danio rerio</i>	Uni Tübingen/ Thellmann, Tribskorn

Die im Rahmen dieses Verbundprojektes in Eigenarbeit durchgeführten Arbeiten betreffen den Fischembryotest (FET) mit dem Zebraabärbling. Die im FET beobachteten Effekte lagen sowohl für die nativen als auch für die angereicherten Proben (4-fach konzentriert) im Bereich der biologischen Variabilität und können daher nicht als Effekt der KA Mannheim gewertet werden. Diese Ergebnisse

deuten auf eine bereits gute Reinigungsleistung in den konventionellen Reinigungsstufen der KA Mannheim hin. Im Daphnien-Reproduktionstest zeigten die untersuchten Proben sogar deutliche Fördereffekte. Obwohl durch diese beiden *in vivo*-Testsysteme im Gegensatz zu den *in vitro*-Tests keine negative Effekte festgestellt werden konnten und diese somit insensitiver reagierten, stellen sie für die Abwasserbewertung zwei unverzichtbare Testmethoden dar. Da Daphnien und Zebraquärlinge zwei wichtige Repräsentanten von Invertebraten und Fischen darstellen, sind sie bezüglich der Risikoabschätzung für das aufnehmende Gewässer von hoher Relevanz. Zusätzlich muss an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass die konventionellen Reinigungsstufen der KA Mannheim bereits ein sehr gute Elimination von Spurenstoffen zeigten, wodurch die Erfassung der Eliminationsrate der PAK mithilfe von *in vivo*-Testsystemen erschwert wurde.

Auch bei der Untersuchung der Endpunkte Genotoxizität und Zytotoxizität mit den Testsystemen Ames Fluktuationstest, P53-BLA und ARE-c32 konnten keine Unterschiede zwischen dem konventionell behandelten und dem adsorptiv behandelten Abwasser festgestellt werden. Weiterhin stellte sich das zelluläre Testsystem P53-BLA, mit dem genotoxische und zytotoxische Effekte erfasst werden können, für die Abwasserbewertung als ungeeignet heraus, da die genotoxischen Effekte von zytotoxischen Effekten überlagert wurden. Auch der κ B-BLA-Test zur Erfassung immuntoxischer und zytotoxischer Effekte erwies sich durch seine hohe Variabilität als ungeeignet. Der AhR-CAFLUX-Test und der ARE-c32-Test zeigten bezüglich ihrer Endpunkte „dioxinähnliche Toxizität“ bzw. „oxidativer Stress“ eine weitere Reduktion der Effekte im adsorptiv behandelten Abwasser an. Die Testsysteme zur Untersuchung der endokrinen Wirkungen erwiesen sich alle als robust und zur Abwasserbewertung geeignet. Sowohl beim E-Screen als auch bei den auf Hefezellen basierenden Testsystemen YES und YAAS konnten im konventionell behandeltem Abwasser hohe östrogene bzw. anti-androgene Wirkungen nachgewiesen werden, welche jedoch durch die Pulveraktivkohlestufe deutlich reduziert werden konnten. Androgene Wirkungen wurden hingegen im YAS-Assay nicht detektiert. Beim YAES-Assay wurde ein Anstieg der Anti-Östrogenität im mit Pulveraktivkohle behandelten Abwasser festgestellt. Dieser Anstieg ist auf die effektive Reduktion von östrogenen Substanzen durch die PAK zurückzuführen, welche wiederum zu einer „Demaskierung“ der anti-östrogenen Effekte führte.

In der Summe zeigen die Daten aus den biologischen Untersuchungen und der chemischen Analytik eine deutliche Reduktion von Effekten und Spurenstoffen durch die weitergehende Abwasserbehandlung mit PAK in der KA Mannheim an. Aufgrund der gewonnenen Daten konnte daher eine Empfehlung für einen weiteren Ausbau der KA Mannheim mit einer adsorptiven Stufe ausgesprochen werden. Weiterhin wurde für die routinemäßige Evaluierung von Abwasserproben eine Testbatterie (Ökotox-Box) bestehend aus zwei *in vivo*- und sieben *in vitro*-Testsystemen vorgeschlagen, welche nachfolgend in Abbildung 18 dargestellt sind.

Ökotox-Box für die Abwasserbewertung				
Art der Testsysteme	Art der Wirkung	Wirkendpunkt	Empfohlener Test nach Anreicherung	Begründung
In vitro- Tests	Spezifische Wirkung	Genotoxizität	Umu-c	Kürzer als Ames-Fluktuations-Test (1-2 Tage statt 3-4 Tage)
		Östrogenität	E-Screen, YES	E-Screen mit höherer Sensitivität
		Anti-Östrogenität, Anti-Androgenität	YAES, YAS, YAAS	Einzigste Testsysteme, robust
		Dioxinähnliche Wirkung	AhR-CAFLUX	Sensitiv und robust
	Adaptive Stressantwort	Oxidativer Stress	ARE-c32	Sensitiv und robust; Antwort klar von Zytotoxizität abzugrenzen
In vivo - Testsysteme	Organismische Wirkung	Reproduktion	Test mit Ceriodaphnia dubia	Logistisch einfacher als Test mit Daphnia magna (teuer)
		Entwicklung	Fisch-Embryotest mit Zebraquarienfisch (auch native Proben)	Robust, logistisch einfach, indiziert starke Wirkungen

Abbildung 18: Empfohlene Testbatterie („Ökotox-Box“), welche routinemäßig zur Abwasserbewertung eingesetzt werden kann.

Kapitel 2.2

Untersuchungen an der Kläranlage Langwiese (Ravensburg) und dem Bodenseezufluss Schussen im Rahmen der Verbundprojekte SchussenAktiv und SchussenAktivplus

In den hier vorgestellten Studien wurden ökotoxikologische, chemische und limnologische Untersuchungen an der Kläranlage (KA) Langwiese und an der Schussen im Rahmen der Verbundprojekte SchussenAktiv und SchussenAktivplus durchgeführt. Ziel dieser Projekte war es, die Auswirkungen einer Pulveraktivkohlestufe, welche zur weitergehenden Abwasserreinigung in der KA Langwiese installiert wurde, im Rahmen einer Vorher-Nachher-Studie zu erfassen. Die im Zuge dieser Studien durchgeführten Fischembryotests mit Abwasserproben der Kläranlage (KA) Langwiese sowie mit nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben des angeschlossenen Fließgewässers Schussen sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

Kapitel 2.2.1:

SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen

Korrespondenz Wasserwirtschaft; DOI: 10.3243/kwe2013.08.001

Triebskorn R., Blaha L., Engesser B., Güde H., Hetzenauer H., Henneberg A., Köhler H.-R., Kraus S., Maier D., Peschke K., Thellmann P., Vogel H.-J., Kuch B., Oehlmann J., Rault M., Suchail S., Rey P., Richter D., Sacher F., Weyhmüller M. und Wurm K. (2013)

Im Jahr 2009 beschloss das Land Baden-Württemberg, im Rahmen eines Konjunkturprogramms, einige Kläranlagen im Bodenseeeinzugsgebiet bei der Nachrüstung mit einem Aktivkohlefilter finanziell zu fördern. Im Vordergrund für das Land standen hierbei eine Minderung der Spurenstoffeinträge in die Fließgewässer sowie der Schutz des Trinkwasserspeichers Bodensee. Eine der betroffenen Anlagen war die Kläranlage Langwiese des Abwasserzweckverbandes (AZV) Mariatal bei Ravensburg.

In diesem Kapitel werden die Ziele und Ergebnisse des Verbundprojekts SchussenAktiv zusammenfassend dargestellt. Das übergeordnete Ziel der Studie war es, die Auswirkungen einer zusätzlichen adsorptiven Stufe mit Pulveraktivkohle in der Kläranlage (KA) Langwiese im Rahmen einer Vorher-Nachher-Studie zu erfassen. Die neue Technologie zielte auf eine weitere Reduktion der Spurenstoffe im Gewässer Schussen ab, welche der KA Langwiese als Vorfluter dient (Triebskorn und Hetzenauer, 2012). Dabei sollte durch Untersuchungen an der Kläranlage selbst die Effizienz der weitergehenden Reinigungsstufe analysiert werden. Des Weiteren sollte der ökologische und

ökotoxikologische Zustand der Schussen mithilfe einer breitgefächerten Testbatterie vor und nach dem Ausbau der KA Langwiese erfasst werden. Durch Verzögerungen in der Fertigstellung der zusätzlichen adsorptiven Stufe wurde der Ausbau der Kläranlage jedoch erst im Herbst 2013 vollendet, wodurch im Projekt „SchussenAktiv“ zunächst nur die Erfassung des ökotoxikologischen Zustands der Schussen vor dem Ausbau der KA Langwiese sowie die Untersuchung der konventionellen Reinigung im Fokus standen. Um den ökotoxikologischen Zustand der Schussen zu ermitteln, wurden vier Probestellen ober- und unterhalb verschiedener Abwassereinleitungen untersucht. Als Referenzgewässer diente der nahegelegene Bodenseezufluss Argen. Durch die kombinierte Anwendung von chemischen Analysen, ökotoxikologischen und mikrobiologischen Untersuchungen sowie limnologischen Methoden wurde ein innovatives Untersuchungskonzept umgesetzt. Hierdurch war es nicht nur möglich, die Belastungen von Biota sowie Abwasser- und Umweltproben (Sedimente, Wasserproben) zu untersuchen, sondern auch das toxische und endokrine Potential in den untersuchten Proben zu detektieren bzw. zu charakterisieren. Durch die Untersuchung von wildlebenden Fischen und Invertebraten sowie der aktiven Exposition von Fischen und Fischeiern konnten tatsächliche, im Ökosystem auftretende toxische und endokrine Effekte erfasst werden. Die kombinierte Anwendung der unterschiedlichen Methoden ermöglichte daher eine komplementäre und umfassende Bewertung der Belastungssituation in Schussen und Argen.

Eigene im Rahmen des Projekts geleistete Arbeiten betreffen die Durchführung und Betreuung von Fischembryotests mit Abwasserproben der KA Langwiese sowie mit Sediment- und Oberflächenwasserproben der Schussen und des Referenzgewässers Argen. Bei der Untersuchung des Ablaufs aus der KA Langwiese konnten in den FET meist nur schwache Effekte beobachtet werden, wie sie auch häufig im Bereich der biologischen Variabilität auftreten können. Jedoch waren zu manchen Zeitpunkten reduzierte Schlupfraten der exponierten Embryonen zu beobachten, welche auf einen negativen Einfluss der KA Langwiese hindeuten. Im Gegensatz hierzu konnten im Freiland vor allem an den Probestellen 1 (unterhalb des Regenüberlaufbeckens Mariatal), 3 (unterhalb der KA Langwiese) und 6 (unterhalb der KA Eriskirch) stärkere Effekte beobachtet werden, die sich u. a. in einer erhöhten Mortalität, einer reduzierten Schlupf- und Herzschlagrate sowie in Fehlbildungen der exponierten Embryonen äußerten. Zusammenfassend waren in Bezug auf die toxischen Potentiale mithilfe der Reporterassays (*in vitro*) und dem Fischembryotest (*in vivo*) im Ablauf der Kläranlage sowie an den untersuchten Freilandstellen schwache bis mäßig starke Effekte zu beobachten.

Zur Untersuchung der endokrinen Potentiale wurden *in vitro*- und *in vivo*-Testsysteme eingesetzt. Mithilfe des E-Screens, einem Proliferationstest auf der Basis von menschlichen Brustkrebszellen, war es möglich östrogene Potentiale im Abwasser der KA Langwiese sowie im Oberflächenwasser der Schussen nachzuweisen. In den Sedimenten der Schussen konnten durch Reporterassays östrogene und anti-östrogene Potentiale detektiert werden. Bei den mit Zwergdeckelschnecken

(*Potamopyrgus antipodarum*) und Sedimenten durchgeführten Wirkpotentialtests, wiesen sowohl Proben der Schussen als auch Proben der Argen ein hohes östrogenähnliches Potential auf. Ergänzend zu den Wirkpotentialtests wurden auch tatsächliche Wirkungen bei Organismen im Freiland untersucht. Zum einen erfolgte dies durch Wildfänge aus den Flüssen (Döbel, Schneider und Gammariden), zum anderen durch eine aktive Exposition in Bypass-Systemen (juvenile Regen- und Bachforellen und befruchtete Forelleneier). Bei den aus der Schussen gefangenen Schneidern (*Alburnoides bipunctatus*) und Gammariden (*Gammarus pulex*) war eine höhere Anzahl an weiblichen Tieren unterhalb der Einleitung der KA Langwiese zu beobachten, was auf einen östrogenen Einfluss derselben schließen lässt. Auch bei juvenilen Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und Döbeln (*Leuciscus cephalus*) wurden Reaktionen beobachtet, die auf endokrin wirksame Substanzen in der Schussen hindeuten. Neben den endokrinen Wirkungen wurden auch toxische Wirkungen in Tieren der Schussen erfasst. In der Summe waren an der Schussen stärkere Effekte zu verzeichnen als an der Argen. Insbesondere der Gesundheitszustand der Fische sowie der Zustand des Makrozoobenthos zeigten deutliche Beeinträchtigungen. So waren in der Leber der untersuchten Döbel zelluläre Veränderungen und ein signifikant reduzierter Glykogengehalt feststellbar. Bei den in den Bypass-Systemen durchgeführten Embryotests mit befruchteten Forelleneiern konnten sowohl an der Schussen als auch an der Argen Effekte mittleren Ausmaßes (erhöhte Mortalität, verzögerter Schlupf) beobachtet werden, welche in etwa die Daten aus den Wirkpotentialtests mit *Danio rerio* widerspiegeln. Die schwächeren Effekte im FET mit *Danio rerio* sind vermutlich auf die kürzere Expositionszeit von 96 Stunden zurückzuführen, wohingegen befruchtete Forelleneier in den Bypass-Systemen über mehrere Wochen exponiert wurden. In weiteren Analysen wiesen die Blutproben der gefangenen Döbel eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten mit Mikrokernen auf, welche auf gentoxische Wirkungen hindeuten. Auch auf der Ebene der Lebensgemeinschaft der Invertebraten war ein Einfluss der KA Langwiese in Form einer reduzierten Artenanzahl und Individuendichte – insbesondere bei den sensitiven Taxa – erkennbar.

Mithilfe der chemischen Analytik konnten im Ablauf der KA Langwiese 75 Verbindungen nachgewiesen werden. Davon waren 21 Verbindungen auch im Oberflächenwasser der Schussen wiederzufinden. Insgesamt traten in Proben der Schussen (Oberflächenwasser, Sediment, Fische) im Vergleich zur Argen deutlich mehr Verbindungen in meist höheren Konzentrationen auf. Für einige Stoffe, wie bspw. Carbamazepin und Benzotriazol, war ein Eintrag über die KA Langwiese belegbar. In den untersuchten Fischproben aus Döbeln und Schneidern konnten 22 Spurenstoffe nachgewiesen werden. Die Analyse der Fischgewebe ergab eine teils hohe Belastung mit Stoffen wie Schwermetallen (Kupfer, Zink, Quecksilber), polychlorierten Biphenylen (PCBs), polybromierten Diphenylethern (PBDEs) und Methyltriclosan, einem Metabolit des Desinfektionsmittels Triclosan. Hervorzuheben sind an dieser Stelle die Schwermetallbelastungen der Fischgewebe an Schussen und Argen. Die gemessenen

Quecksilberkonzentrationen lagen deutlich über der Umweltqualitätsnorm für Schwermetalle (20 µg/kg) der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Endokrin wirksame Verbindungen waren meist nicht messbar bzw. nachweisbar.

Durch die Kombination von Wirkpotentialtests, Effektuntersuchungen, chemischer Analytik und der Untersuchung von Lebensgemeinschaften war es möglich, den Belastungszustand der untersuchten Flüsse Schussen und Argen zu erfassen. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass an der Schussen sowohl toxisch als auch endokrin wirkende Substanzen für die beobachteten Effekte in den Organismen und Wirkpotentialtests verantwortlich sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Wirkpotential- und Effekttests die Gesamtheit an in der Umwelt bzw. in Umweltproben auftretenden Belastungen integrieren. Hierdurch werden auch Effekte von Stoffen und Metaboliten detektiert, die durch die chemische Analytik nicht oder nur in geringem Maße erfasst werden können.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass das Referenzgewässer Argen, vor allem in den mit dem FET untersuchten Sedimenten, in der Summe eine deutlich geringere Belastung als die Schussen aufweist. Jedoch deuten auch hier einige Ergebnisse auf eine Beeinträchtigung der Fauna hin. Die Untersuchungen an der mit einer PAK-Stufe aufgerüsteten Anlage sowie deren Effekte auf das aufnehmende Gewässer Schussen wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektverbundes „SchussenAktiv*plus*“ fortgeführt. Die mit dem Fischembryotest durchgeführten Analysen der Sediment- und Oberflächenwasserproben wurden ebenfalls im Rahmen des Projekts SchussenAktiv*plus*“ fortgesetzt. Begleitend erfolgten auch weiterhin Untersuchungen der Abwässer aus der KA Langwiese, bei denen neben den Ablaufproben auch Proben der unterschiedlichen Reinigungsstufen mit dem Fischembryotest untersucht wurden.

Kapitel 2.2.2

Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream?

International Journal of Water and Wastewater Treatment; Doi: <http://dx.doi.org/10.16966/2381-5299.1>

Thellmann P., Greiner-Perth K., Jacob S., Knoll K., Schäfer M., Stängle M., Ziegler M., Scheurer M., Köhler H.-R., Triebkorn R. (2017)

Alle in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse sind ebenfalls Bestandteil des von Triebkorn (2017) herausgegebenen gemeinsamen Schlussberichts zu den Projekten SchussenAktiv; SchussenAktiv*plus* und SchussenAktiv*plus*+, welcher unter dem Titel „Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames

und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf“ (ISBN: 978-3-946552-10-9) erschienen ist.

Die hier vorgestellte Studie wurde im Rahmen des Verbundprojekts SchussenAktiv*plus* durchgeführt. Im Herbst 2013 wurde die KA Langwiese mit einer adsorptiven Reinigungsstufe (auf der Basis von Pulveraktivkohle) zur weitergehenden Abwasserreinigung ausgestattet (Tribskorn et al., 2013a). Die im Verbundprojekt SchussenAktiv*plus* durchgeführten Analysen erfolgten im Zuge einer Vorher-Nachher-Studie. Hierbei wurden zum einen Untersuchungen an der Kläranlage Langwiese durchgeführt, um die Effizienz der weitergehenden Reinigungsstufe zu erfassen. Zum anderen wurde der ökologische und ökotoxikologische Zustand der Schussen mithilfe einer breit gefächerten Testbatterie vor und nach dem Ausbau der KA Langwiese erfasst. Im Rahmen dieser Vorher-Nachher-Studie wurden auch Abwasserproben der KA Langwiese sowie Sediment- und Oberflächenwasserproben des Vorfluters Schussen hinsichtlich ihres embryotoxischen Potentials mit dem Fischembryotest (FET) analysiert. In der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums wurde der Zustand vor dem Ausbau erfasst, wohingegen die zweite Hälfte des Untersuchungszeitraums den Zeitraum nach dem Ausbau der KA Langwiese mit einer adsorptiven Stufe repräsentiert. Die gewonnenen Ergebnisse aus dem FET sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Alle Analysen mit dem FET wurden in Eigenarbeit durchgeführt oder betreut. Die Analyse und Interpretation der Ergebnisse erfolgten ebenfalls in Eigenarbeit.

Um die Auswirkungen der Pulveraktivkohlestufe (PAK-Stufe) auf die Wasser- und Sedimentqualität der Schussen zu erfassen, wurden entlang der Schussen vier Probestellen ober- und unterhalb verschiedener Abwassereinleitungen untersucht. Die Probestellen S0 und S1 befinden sich ca. 2,9 bzw. 2,2 km oberhalb des Ablaufs der KA Langwiese. Die Probestelle S0 befindet sich zudem oberhalb des Regenüberlaufbeckens (RÜB) Mariatal (bei Ravensburg-Weißenau), welches an die KA Langwiese angeschlossen ist. Die Probestelle S1 ist unterhalb des RÜB Mariatal lokalisiert. Die Probestellen S3 und S6 liegen 5 bzw. 17 km flussabwärts der KA Langwiese. Die Probestelle S6 befindet sich zudem direkt unterhalb der KA Eriskirch, nahe der Schussenmündung in den Bodensee. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Referenzstelle S4 am Bodenseezufluss Argen, da dieser Fluss nach Tribskorn & Hetzenauer (2012) eine deutlich geringere Belastung als die Schussen aufweist und daher ein adäquates Vergleichsgewässer darstellt. Innerhalb der KA Langwiese wurden die Abläufe folgender Reinigungsstufen mit dem FET untersucht: a) Zulauf nach mechanischer Vorklärung; b) Ablauf der biologischen Reinigung; c) Ablauf des Sandfilters nach konventioneller Reinigung; d) Ablauf der PAK-Stufe; e) Ablauf des Sandfilters nach weitergehender Reinigung mit PAK-Stufe.

Bei der Untersuchung der Abwasserproben mit dem FET wurden sowohl vor als auch nach dem Ausbau der KA Langwiese nur schwache Effekte, wie bspw. leicht erhöhte Mortalitäts- und Fehlbildungsraten

($\leq 10\%$), beobachtet. Bezüglich der Mortalität, der Fehlbildungsrate und der Rate an Entwicklungsverzögerungen konnten zwischen den untersuchten Abläufen und der Kontrolle keine Unterschiede festgestellt werden. Die deutlichsten Unterschiede waren bei den dokumentierten Schlupfraten zu beobachten. Fischembryonen, die gegenüber Ablaufproben der mit PAK aufgerüsteten Anlage exponiert wurden, zeigten in allen durchgeführten Testdurchläufen Schlupfraten von 100 %. Im Gegensatz hierzu wurden bei Fischembryonen aus den Expositionen mit konventionell behandeltem Abwasser niedrigere Schlupfraten beobachtet. Dieses Ergebnis deutet auf eine weitere Reduktion embryotoxischer Effekte durch die adsorptive Reinigungsstufe hin, deren Ausmaß jedoch aufgrund der bereits guten konventionellen Reinigung eher gering ausfällt. Weiterhin war in den mit PAK behandelten Abwässern eine deutliche Abnahme in der Variabilität der Reaktionen zu erkennen. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass die hier untersuchte konventionelle Reinigung (biologische Behandlung mit nachgeschalteter Sandfiltration und kombinierter Flockung), welche international betrachtet ein hohes technologisches Niveau aufweist, bereits zu einer deutlichen Reduktion der embryotoxischen Effekte geführt hat. Dennoch konnte mit den erhobenen Daten gezeigt werden, dass selbst auf einem hohen technologischen Niveau eine Steigerung der Reinigungseffizienz durch eine adsorptive Stufe aus PAK erreicht werden kann. Die Analyse der nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben führte hinsichtlich der Effizienz der Pulveraktivkohle zu deutlicheren Ergebnissen. Sowohl bei der Schlupf- als auch bei der Mortalitätsrate konnte nach dem Ausbau der KA Langwiese eine signifikante Verbesserung in den Proben der Probestellen S3 und S6 festgestellt werden. Ein gegenläufiger Trend war in den Proben der Probestellen S0, S1 und S4 zu erkennen. In diesem Fall führten die Sediment- und Oberflächenwasserproben dieser Stellen, welche nach dem Ausbau der KA Langwiese gesammelt wurden, zu signifikant erhöhten Mortalitäten sowie signifikant reduzierten Schlupfraten der exponierten Zebrabärblingsembryonen. Die Daten zeigen daher eindeutig, dass die Verbesserungen an den Probestellen S3 und S6 auf den Ausbau mit einer adsorptiven Stufe in der KA Langwiese zurückzuführen sind und nicht mit einer generellen Veränderung von Umweltparametern zusammenhängen. Da Sedimente aufgrund ihrer organischen und anorganischen Bestandteile Schadstoffe langfristig binden (Gerbersdorf et al., 2011; Hollert et al., 2009), können sie Belastungen des Fließgewässers über einen längeren Zeitraum integrieren. Sie stellen daher bei der Bewertung des längerfristigen Einflusses von Kläranlagen ein geeigneteres Mittel dar als Wasser- oder Abwasserproben. Welche Stoffe jedoch für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, bzw. waren, kann durch die vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass die Effekte bzw. Reaktionen durch die Gesamtheit an Stressoren im Oberflächenwasser und im Sediment verursacht wurden. Die Kläranlage Langwiese ist die größte Abwasserreinigungsanlage im Einzugsgebiet der Schussen und ihre Abwasserfrachten stellen 50 % der Gesamtabwasserfracht in der Schussen dar. Außergewöhnlich hierbei ist, dass trotz der Präsenz von

17 weiteren Kläranlagen oberhalb der KA Langwiese eine signifikante Reduktion embryotoxischer Effekte in Proben der Probestellen S3 und S6 beobachtet werden konnte.

Begleitend zu den in Eigenarbeit durchgeführten Untersuchungen mit dem FET wurden chemische Analysen mit Abwasser- und Oberflächenwasserproben von Kooperationspartnern durchgeführt. Insgesamt wurden im Projekt SchussenAktivplus durch chemische Analysen mehr als 100 Stoffe identifiziert. In dieser Studie wurden jedoch nur die Konzentrationen von sechs häufig auftretenden und durch die PAK gut eliminierbaren Substanzen für die Interpretation der Resultate herangezogen. Weiterhin dienen sie an dieser Stelle als Repräsentanten aller anthropogenen Substanzen, die durch Abwässer in aquatische Ökosysteme eingetragen werden. Die Daten aus der chemischen Analytik zeigen eindeutig, dass der Einsatz einer adsorptiven Stufe mit PAK zu einer deutlichen Reduktion der Stoffe (1H-Benzotriazol, 4-Methyl-benzotriazol, 5-Methyl-benzotriazol, Carbamazepin und Diclofenac) im Ablauf der KA Langwiese führte. Abhängig von der Substanz variierten die Eliminationsraten zwischen 59 % und 91 %. Auch in Oberflächenwasserproben der Probestellen S3 und S6 war eine Abnahme der Stoffkonzentrationen nach dem Ausbau der KA Langwiese zu erkennen. An der Probestelle S6 wurden nach dem Ausbau der KA Langwiese für einige Stoffe erhöhte Konzentrationen gemessen, welche auf den Ablauf der KA Eriskirch zurückzuführen sind, da diese über keine vierte Reinigungsstufe verfügt.

Aus den Ergebnissen geht klar hervor, dass eine zusätzliche adsorptive Reinigungsstufe auf der Basis von Pulveraktivkohle eine effiziente und adäquate Technologie darstellt, um die Konzentrationen an Spurenstoffen in Abwässern zu reduzieren und dadurch die Belastung für die aufnehmenden Gewässer zu minimieren. Die positiven Auswirkungen der zusätzlichen PAK-Stufe der KA Langwiese auf Fische und Invertebraten wurden bereits durch Maier et al. (2016) und Peschke et al. (2016) beschrieben. In diesen Studien wurden nach dem Ausbau der KA Langwiese eine Reduktion der Dioxin-ähnlichen Potentiale im Kläranlagenablauf sowie eine Verbesserung der Invertebratengesundheit und der Invertebratendiversität in der Schussen nachgewiesen. Die positiven Langzeiteffekte einer weitergehenden Abwasserreinigung mit PAK wurden in den Arbeiten von Triebkorn et al. (2014) und Thellmann et al. (2015) dargestellt, welche nachfolgend in Kapitel 2.3 behandelt werden. Weiterhin konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass der FET mit nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben ein geeignetes Instrument darstellt, um die Belastungssituation von Fließgewässern abzubilden sowie die Auswirkungen von Abwassereinleitungen bzw. zusätzlicher Abwasserreinigungstechniken zu erfassen. In Bezug auf die Ziele der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie stellt die Abwasserbehandlung mit PAK eine effiziente Technologie für den nachhaltigen Schutz von aquatischen Biota und Oberflächengewässern dar. Abschließend bleibt zu erwähnen, dass diese zusätzliche Reinigungsstufe nicht nur für den nachhaltigen Schutz aquatischer

Biota, sondern auch für den Schutz des Menschen von hoher Relevanz ist. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn Oberflächengewässer zur Trinkwassergewinnung herangezogen werden (Joss et al., 2005).

Kapitel 2.3

In den in Kapitel 2.3 vorgestellten Studien wurden ökotoxikologische und ökologische Untersuchungen an den Flüssen Schmiecha und Eyach durchgeführt. Beide Flüsse entspringen nahe der Europäischen Wasserscheide auf der Schwäbischen Alb. Die an die beiden Fließgewässer angeschlossenen Kläranlagen Albstadt-Ebingen (Schmiecha) und Albstadt-Lautlingen (Eyach) wurden bereits vor mehr als 20 Jahren mit einer adsorptiven Stufe auf der Basis von Pulveraktivkohle ausgestattet um die aus der Textilindustrie stammenden Farbstoffe aus dem Abwasser zu entfernen. Ziel dieser Projekte war es, die langfristigen Auswirkungen der Pulveraktivkohlestufe mit Hilfe von Wirkpotentialtests und Wirkuntersuchungen zu erfassen. In Kapitel 2.3.1 folgt die Vorstellung der Untersuchungen am Fluss Schmiecha und der KA Albstadt-Ebingen. In Kapitel 2.3.2 wurden die Sediment- und Oberflächenwasserqualität von drei Flüssen Schussen, Schmiecha und Eyach mithilfe des Fischembryotests analysiert. Dabei wurde ein Vergleich zwischen dem Einfluss konventionell behandelte Abwässer (KA Langwiese und KA Eriskirch an der Schussen) und den langfristigen Auswirkungen einer Pulveraktivkohlestufe (KA Albstadt-Ebingen und KA Albstadt-Lautlingen) getätigt.

Kapitel 2.3.1

Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie?

Korrespondenz Wasserwirtschaft; DOI: 10.3242/kwe2014.10.004

Triebskorn R., Thellmann P., Vogel H.-J., Wurm K. (2014)

Die Kläranlage Albstadt-Ebingen stellte ursprünglich eine konventionelle, biologische Abwasserreinigungsanlage dar, welche über eine einstufige Belebungsanlage mit Vorklärung, Denitrifikation und Nitrifikation verfügte (Wave, 2001). Im Jahr 1992 wurde sie mit einer weiteren Reinigungsstufe bestehend aus Pulveraktivkohleadsorption, chemischer Flockung und Filtration aufgerüstet. Ziel der weitergehenden Abwasserreinigung war die Elimination von aus Textilfabriken stammenden Farbstoffen sowie eine Verbesserung der Wasserqualität im aufnehmenden Gewässer

Schmiecha. Die Schmiecha sowie ihre Flora und Fauna galten in den 1960er bis hin zu den späten 1980er Jahren als stark anthropogen belastet bzw. beeinträchtigt. Aufgrund der adsorptiven Stufe werden heute auch andere Spurenstoffe, wie bspw. schwer abbaubare Arzneimittel (z. B. Diclofenac) oder Biozide dem Abwasser entzogen bzw. stärker eliminiert. Durch die gesteigerte Reinigungseffizienz der KA Albstadt-Ebingen, mit der auch eine deutliche Verbesserung der Gewässergüte einherging, kann daher heute im aufnehmenden Gewässer Schmiecha von einer niedrigeren Belastung der Organismen ausgegangen werden als in Vorflutern von konventionell ausgestatteten Kläranlagen.

Im Rahmen dieser Studie wurden ökologische sowie ökotoxikologische Untersuchungen an der Schmiecha durchgeführt, um den ökologischen Zustand der Schmiecha, den Zustand der Fisch- und Makrozoobenthospopulationen sowie den Gesundheitszustand von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) zu bewerten. Alle durchgeführten Analysen erfolgten ober- und unterhalb der Abwassereinleitung durch die KA Albstadt-Ebingen sowie an einer von Abwässern unbeeinträchtigten Referenzstelle im Oberlauf der Schmiecha. Die Ermittlung der Gewässergüte und weiterer ökologischer Indices wurde durch die Aufnahme des Makrozoobenthos sowie der Messung von chemisch-physikalischen Gewässerparametern realisiert. Die Untersuchung der Fischpopulation erfolgte mittels Elektrofischerei. Der Gesundheitszustand der Fische wurde mithilfe histopathologischer Untersuchungen, Stressproteinanalysen sowie Mikrokernanalysen erfasst. Zusätzlich wurden im Labor Sediment- und Oberflächenwasserproben aller Probestellen hinsichtlich ihres embryotoxischen Potentials mit dem Fischembryotest (FET) untersucht.

Die im Rahmen dieser Studie eigens durchgeführten Arbeiten betreffen die Untersuchungen der Fischgesundheit, die Fischembryotests mit Sediment- und Oberflächenwasserproben sowie die Messung der limnochemischen Parameter.

Bei der Untersuchung des Gesundheitszustands von Bachforellen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probestellen erkennbar. Die histopathologische Analyse der Lebern und Kiemen zeigte an allen untersuchten Probestellen meist leichte, selten mäßige Veränderungen auf. Solche zellulären Reaktionen können auch im Rahmen der natürlichen Variabilität oder durch Hintergrundbelastungen aus diffusen Quellen auftreten. Daher sind diese zellulären Veränderungen nicht auf einen Einfluss der Kläranlage zurückzuführen. In den Stressprotein- und Mikrokernanalysen war eine gesundheitliche Beeinträchtigung der untersuchten Bachforellen ebenfalls nicht festzustellen. In den durchgeführten Fischembryotests war bei keinem der untersuchten Endpunkte eine relevante Beeinträchtigung der exponierten Zebraquellensalmlerembryonen festzustellen. Auch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Probestellen beobachtet, sodass die Schmiecha und damit auch das Abwasser der KA Ebingen hinsichtlich der Embryotoxizität bei Fischen als unbedenklich eingestuft werden können.

Auch die limnochemischen Gewässerparameter und die Untersuchungen des Makrozoobenthos wiesen in den untersuchten Abschnitten einen guten bis sehr guten ökologischen bzw. saprobiellen Zustand auf. Während bei der Gesamtartenanzahl an Makroinvertebraten entlang des Untersuchungsabschnitts ein Anstieg beobachtet werden konnte, zeigten die sensitiven Arten (nach der Austria-Liste) eine leichte Abnahme an. Diese Abnahme ist jedoch eher auf eine Belastung durch diffuse Quellen aus der Landwirtschaft und dem Straßen- bzw. Stadtverkehr zurückzuführen als auf die kommunalen Abwässer der KA Ebingen. Während der Referenzabschnitt im Oberlauf der Schmiecha einen natürlichen, seiner Gewässergröße entsprechenden Bestand an Groppen (*Cottus gobio*) und Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) aufwies, setzte sich der Fischbestand an der Probestelle oberhalb der KA Ebingen überwiegend aus zweisömmrigen Bachforellen und nur sehr wenigen Groppen zusammen. Das geringe Vorkommen an einsömmrigen Bachforellen, Groppen sowie größeren Fischen ist auf strukturelle Mängel sowie auf Stoßbelastungen aus der Regenwasserbehandlung unmittelbar oberhalb der KA Ebingen zurückzuführen. Unterhalb der Kläranlage war wieder eine deutliche Verbesserung bezüglich der Bestandsdichte sowie der Altersstruktur der Fischpopulation zu beobachten. Hierdurch kann eine Beeinträchtigung der natürlichen Reproduktion durch die KA Ebingen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse aus dem FET mit Sediment- und Oberflächenwasserproben untermauern diese Schlussfolgerung.

Die im Rahmen dieses Projekts gewonnenen Ergebnisse belegen, dass der Einsatz einer adsorptiven Stufe mit Pulveraktivkohle zu einer Erholung der Fauna im aufnehmenden Gewässer führt und dadurch auch zum Erreichen der Ziele der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie beitragen kann. Demnach können die KA Albstadt-Ebingen sowie das Fließgewässer Schmiecha als Langzeitkontrollen für die Effizienz der vierten Reinigungsstufe in kommunalen Kläranlagen betrachtet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der FET ein sinnvolles Mittel darstellt, um Belastungssituationen in Fließgewässern abzubilden und damit auch die Auswirkungen von Abwässern zu erfassen.

Kapitel 2.3.2

Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies

Environmental Science and Pollution Research; DOI: 10.1007/s11356-014-3785-8

Thellmann P., Köhler H.-R., Rößler A., Scheurer M., Schwarz S., Vogel H.-J., Triebkorn R. (2015)

Im Rahmen dieser Studie wurden die Sediment- und Oberflächenwasserqualität von drei durch Abwasser beeinträchtigten Flüssen – Schussen, Schmiecha und Eyach – mithilfe des Fischembryotests bewertet. Der Fokus lag hierbei auf den unterschiedlichen Technologien der an die Fließgewässer

angeschlossenen Kläranlagen Langwiese, Eriskirch, Albstadt-Ebingen und Albstadt-Lautlingen. Ziel der Studie war es, durch die Untersuchung von Probestellen ober- und unterhalb der Abwassereinleitungen eine Belastungscharakterisierung der Flüsse zu erstellen und dadurch auch die Auswirkung bzw. die Reinigungsleistung der unterschiedlichen Abwasserreinigungstechniken zu erfassen.

Embryotoxische Effekte, welche durch Spurenstoff- bzw. Abwasseremissionen in Oberflächengewässer verursacht werden können, sind für den Schutz der endemischen Fischfauna von hoher Relevanz. Der Fischembryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) stellt daher ein geeignetes Werkzeug dar, um das embryotoxische Potential im Oberflächenwasser und in Flusssedimenten zu erfassen (Hollert et al., 2003). Da Flusssedimente durch ihre organischen und anorganischen Komponenten eine Vielzahl an Bindungsstellen für Schadstoffe bereithalten (Gerbersdorf et al., 2011; Hollert et al., 2009), können sie Belastungen über einen sehr langen Zeitraum integrieren und sind daher für die Belastungscharakterisierung von Gewässern von hoher Bedeutung. Des Weiteren wurden an allen untersuchten Probestellen in Eigenarbeit Messungen von physikalisch-chemischen Gewässerparametern (z. B. Temperatur, Sauerstoffgehalt sowie Nitrit- und Nitratgehalt) durchgeführt. Begleitend erfolgten hierzu chemische Analysen mit den Abläufen der Kläranlagen Langwiese (Ravensburg), Eriskirch und Albstadt-Ebingen, um die Konzentrationen an neun häufig verwendeten Pharmazeutika und eines Korrosionsmittels zu messen und dadurch die in die Fließgewässer eingeleiteten Frachten abzuschätzen.

Die Untersuchungen am Bodenseezufluss Schussen erfolgten ober- und unterhalb der einleitenden Kläranlagen Langwiese und Eriskirch. Beide Anlagen stellten während des Untersuchungszeitraums eine nach deutschem Standard konventionelle Kläranlage dar, welche über eine mechanische und eine biologische Reinigungsstufe sowie über einen Sandfilter mit kombinierter Flockung verfügt. Des Weiteren wurde der Einfluss des Regenüberlaufbeckens (RÜB) Mariatal, welches seine Abwässer ebenfalls in die Schussen einleitet, untersucht. Die an der Schussen durchgeführten Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Projekts SchussenAktivplus.

Auf der Schwäbischen Alb wurden Untersuchungen an den Flüssen Schmiecha und Eyach durchgeführt. Die Untersuchung an der Schmiecha erfolgte ober- und unterhalb der einleitenden Kläranlage Albstadt-Ebingen sowie an einer von Abwässern unbeeinträchtigten Referenzstelle. An der Eyach wurden ebenfalls zwei Probestellen ober- und unterhalb der einleitenden Kläranlage Albstadt-Lautlingen sowie eine unbeeinträchtigte naturnahe Referenzstelle untersucht. Beide in Albstadt befindlichen Kläranlagen sind seit mehr als 20 Jahren mit einer adsorptiven Stufe auf der Basis von Pulveraktivkohle (PAK) zur weitergehenden Abwasserreinigung ausgestattet. Diese zusätzliche Reinigungsstufe diente ursprünglich der Elimination der aus Textilfabriken stammenden Farbstoffe

und dadurch auch einer Entfärbung der aufnehmenden Gewässer Schmiecha und Eyach. Durch Erkenntnisse aus der Forschung (z. B. Nowotny et al., 2007; Snyder et al., 2007; Ternes et al., 2002) ist durch die vierte Reinigungsstufe mit PAK inzwischen auch von einer stärkeren Elimination schwer abbaubarer Substanzen bzw. einer reduzierten Entlassung von Spurenstoffen in die Umwelt auszugehen.

Die Untersuchung zu embryotoxischen Potentialen in den Proben der Flüsse Schussen, Schmiecha und Eyach führte hinsichtlich der Embryotoxizität bei Zebrafischembryonen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Sediment- und Oberflächenwasserproben aus der Schussen verursachten die stärksten embryotoxischen Effekte. Vor allem die Proben der Probestellen unterhalb des RÜB Mariatal sowie unterhalb der KA Eriskirch führten zu erhöhten Mortalitätsraten, reduzierten Schlupf- und Herzschlagraten sowie zu einer erhöhten Fehlbildungsrate (Wirbelsäulendeformationen, Dottersack- und Perikardödeme, fehlerhafte oder ausbleibende Pigmentierung). Die Bedeutung von Regenüberlaufbecken als potentielle Punktquellen wird durch dieses Ergebnis klar ersichtlich. Im Gegensatz dazu verursachten die Proben der Flüsse Schmiecha und Eyach hinsichtlich aller untersuchten Parameter nur schwache Reaktionen, wie sie auch im Bereich der biologischen Variabilität auftreten können. Diese schwachen Effekte deuten auf eine niedrige Belastung der beiden untersuchten Oberflächengewässer hin und unterstreichen dadurch die Effizienz der mit einer PAK-Stufe ausgestatteten Kläranlagen Ebingen und Lautlingen. Die Effizienz der Spurenstoffelimination durch PAK wurde auch in der Literatur durch Abegglen (2010), Boehler et al. (2012) und Margot et al. (2013) beschrieben.

Hinsichtlich der physikalisch-chemischen Parameter wiesen alle untersuchten Probestellen einen nach den LAWA-Orientierungswerten (LUBW, 2008) sowie nach den Richtwerten der Oberflächengewässerverordnung von 2011 (OGewV, 2011) einen guten ökologischen Zustand auf. Bei der chemischen Analyse der Kläranlagenabläufe wies der Ablauf der KA Albstadt-Ebingen in der Summe die niedrigsten Konzentrationen an gemessenen Stoffen auf. Vor allem die Konzentrationen an Carbamazepin, Diclofenac, Metoprolol und Benzotriazol waren hier deutlich niedriger als in den Abläufen der Kläranlagen Langwiese und Eriskirch und deuten daher auf eine gute bis sehr gute Elimination durch die Pulveraktivkohle (Dosierung 20 mg/L) in der KA Albstadt-Ebingen hin. Die oben genannten Stoffe neigen durch ihren permanenten Eintrag in die Umwelt oder durch ihre schwere Abbaubarkeit dazu, in Flusssedimenten zu akkumulieren (z. B. Burke et al., 2014; Kunkel und Radke, 2012). Die Relevanz einer weitergehenden Elimination von Spurenstoffen bzw. Pharmazeutika wird durch eine Studie von Triebkorn et al. (2007) verdeutlicht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bereits niedrige Konzentrationen an Metoprolol, Diclofenac und Carbamazepin zu Schädigungen der Organe bei Regenforellen führen können.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Langzeiteffekte einer weitergehenden Abwasserreinigung mit Pulveraktivkohle in den aufnehmenden Gewässern Schmiecha und Eyach mit den Langzeiteffekten einer konventionell ausgestatteten Kläranlage zu vergleichen. Als Vergleichsgewässer, das konventionell gereinigtes Abwasser erhält, diente der stark mit Spurenstoffen belastete Bodenseezufluss Schussen (Tribskorn und Hetzenauer, 2012). Da eine Analyse von Abwasserproben nur eine Momentaufnahme der Abwasserbelastung darstellt, wurden in dieser Studie Sediment- und Oberflächenwasserproben analysiert. Vor dem Ausbau der Kläranlagen in Ebingen und Lautlingen galten die Flüsse Schmiecha und Eyach in den Zeiten der florierenden Textilindustrie als sehr stark belastet. Die angewandte Technik (PAK-Stufe) führte in den vergangenen zwei Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der Gewässerqualität sowie zu einer Erholung der aquatischen Flora und Fauna. Die gute Reinigungsleistung der KA Ebingen wurde auch durch Vogel et al. (2014) beschrieben. Die erhobenen Daten aus den Fischembryotests mit Proben der Flüsse Schmiecha und Eyach spiegeln diese Effizienz der mit PAK aufgerüsteten Kläranlagen wider. Das Gegenteil ist am Bodenseezufluss Schussen der Fall. Hier werden die negativen Effekte aus den FETs mit Proben aus der Schussen durch eine Beeinträchtigung der Fischgesundheit sowie einer Schadstoffbelastung der Fische unterhalb der KA Langwiese untermauert (Tribskorn et al., 2013b, siehe auch Kapitel 1.1). Abschließend lässt sich auf der Basis der vorliegenden Daten sagen, dass die weitergehende Abwasserreinigung mit Pulveraktivkohle ein effizientes Mittel zur Schadstoff- bzw. Spurenstoffelimination darstellt und vor allem in Bezug auf den nachhaltigen Schutz der aquatischen Flora und Fauna von hoher Relevanz ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Fischembryotest mit Sediment- und Oberflächenwasserproben eine geeignete Untersuchungsmethode darstellt, um den Einfluss von Kläranlagen und Regenüberlaufbecken in Oberflächengewässern zu erfassen.

Kapitel 3: Der Einfluss von Straßenabwässern auf die Fauna des aufnehmenden Gewässers

Kapitel 3.1

Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": How a case study on the impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany)

Journal: Environmental Sciences Europe; DOI: 10.1186/s12302-017-0108-y

Thellmann P., Kuch B., Wurm K., Köhler H.-R., Tribskorn R. (2017)

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden – im Auftrag des Regierungspräsidiums Tübingen sowie im Rahmen eines rechtlichen Streitfalls – gewässerökologische und ökotoxikologische Analysen an der Unteren Argen durchgeführt, um den Einfluss eines Regenklärbeckens auf das aquatische Ökosystem zu erfassen. Die Untersuchungen erfolgten im Bereich der Einleitung aus dem Klär- und Rückhaltebecken (RKB) Dürren (Kißlegg, Baden-Württemberg, Deutschland), das im Falle von Regenereignissen Straßenabwässer der benachbarten Autobahn (A96) erhält. Da das RKB keine Verbindung zu kommunalen Abwassernetzen besitzt, werden die von der A96 kommenden Wasserfrachten lediglich durch Sedimentation der gelösten Partikel sowie verkehrsbürtigen Schadstoffe geklärt und anschließend in die Untere Argen geleitet. Das Ziel des Projekts war es, zu prüfen, ob durch die Einleitung des RKB Dürren in die Argen Schutzgüter nach Fauna und Flora-Habitat-Richtlinie (Directive 92/43/EEC, 1992) Schaden nehmen, bzw. ob durch die Einleitung Risiken für Flora und Fauna im betroffenen Naturschutzgebiet bestehen. Von besonderer Bedeutung waren hierbei die Anhangsarten der FFH-Richtlinie wie z. B. Strömer (*Leuciscus souffia*) und Groppen (*Cottus gobio*).

Zur Untersuchung des Einflusses des RKB Dürren wurden zwei Probestellen bzw. Gewässerabschnitte von ca. 200 m Länge ober- und unterhalb der Einleitungsstelle ausgewählt. Zwischen April 2013 und November 2015 erfolgten an jeder Probestelle insgesamt fünf Probenahmen (siehe Tabelle 4). Hierbei wurden in Eigenarbeit Untersuchungen zur Fischgesundheit und limnochemische Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurden bei jeder Probenahme, an beiden Probestellen sowie am RKB-Auslauf, Sediment- und Wasserproben zur Durchführung von Fischembryotests entnommen. Bei den in Eigenarbeit durchgeführten Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) standen vor allem die Sedimente im Vordergrund, da diese Schadstoffe über einen längeren Zeitraum akkumulieren und daher auch langfristige Belastungen anzeigen können. Die von Kooperationspartnern durchgeführten Analysen beinhalteten limnologische und chemische Analysen sowie Untersuchungen zum Zustand des Makrozoobenthos und der Artenzusammensetzung der Fischpopulationen. Die Entnahme der Fische und die damit verbundene fischereiliche

Bestandsaufnahme erfolgten durch Elektrofischung. Zur Untersuchung der Fischgesundheit sollten ursprünglich ortsgebundene sowie sedimentnah lebende Fischarten wie Groppen (*Cottus gobio*) und Schmerlen (*Barbatula barbatula*) untersucht werden. Da die Probestellen bezüglich dieser beiden Fischarten starke Defizite aufwiesen, wurden auch andere Fischarten für die Untersuchung herangezogen (siehe Tabelle 4). Die Analyse des Gesundheitszustands der wildlebenden Fische wurde mithilfe histopathologischer Untersuchungen, Stressproteinanalysen und Mikrokernanalysen realisiert. Begleitend erfolgten hierzu chemische Analysen in Fischen und Flusssedimenten.

Tabelle 4: Durchgeführte Probenahmen, Zeitpunkte der Probenahmen und untersuchte Fischarten

Probenahme	Datum	Entnommene Fischart
1	Frühjahr 2013	Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
2	Sommer 2013	Schmerle (<i>Barbatula barbatula</i>)
3	Herbst 2013	Barben (juvenil) (<i>Barbus barbus</i>)
4	Frühjahr 2014	Schmerle (<i>Barbatula barbatula</i>)
5	Herbst 2014	Groppe (<i>Cottus gobio</i>) und Schmerle (<i>Barbatula barbatula</i>)

Bei keinem der untersuchten Parameter konnte ein deutlich negativer Einfluss des RKB Dürren festgestellt werden. Lediglich im Embryotest mit dem Zebraquarienfisch wurden in einigen Proben stärkere embryotoxische Potentiale in Wasser und Sediment unterhalb des RKB Dürren nachgewiesen, sodass hinsichtlich dieses Parameters ein negativer Einfluss des RKB nicht auszuschließen ist. Bei den durchgeführten Fischembryotests führten nur die Proben der ersten Probenahme zu erhöhten Mortalitäten, signifikant reduzierten Schlupfraten sowie signifikant erhöhten Raten an Entwicklungsverzögerungen und Fehlbildungen. Ähnliche Effekte konnten auch in Untersuchungen von Sedimenten und Wasserproben der deutlich stärker mit Spurenstoffen belasteten Schussen gezeigt werden (Thellmann et al., 2015; siehe auch Kapitel 1.4). In den Proben der nachfolgenden Probenahmen waren im FET nur schwache Effekte zu beobachten. Der drastische Rückgang an embryotoxischen Effekten lässt sich durch das Jahrhunderthochwasser im Juni 2013 erklären. Die vorherrschende Hydraulik könnte dabei zu einer Abschwemmung bzw. Verlagerung der Sedimente und der daran gebundenen Schadstoffe geführt haben. Bei den Proben aus den Probenahmen 4 und 5 waren vor allem bei Embryonen, die gegenüber Proben der Probestelle unterhalb des RKB Dürren exponiert waren, stärkere Effekte zu beobachten, was auf einen Eintrag von embryotoxischen Potentialen durch das RKB Dürren schließen lässt. Bei der Untersuchung der Erythrozyten konnten in nahezu allen Blutaussstrichen der in der Argen gefangenen Fische Mikrokern nachgewiesen werden. Schmerlen, die unterhalb der Einleitung des RKB Dürren an der Probenahme 4 gefangen wurden, wiesen eine im Vergleich zur Referenzstelle (oberhalb des RKB) signifikant erhöhte Mikrokernanzahl auf. Jedoch ist eine Einordnung der Werte aufgrund fehlender Referenz- bzw. Richtwerte nicht möglich. Bei der Untersuchung der Fische aus den anderen Probenahmen waren hinsichtlich dieses Biomarkers keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Ein Vergleich mit der Literatur machte

deutlich, dass der ermittelte Anteil an Mikrokernen bei Regenbogenforellen als unbedenklich einzustufen ist, da er im Bereich spontan gebildeter Mikrokernkerne liegt (Bolognesi und Hayashi, 2011) und somit nicht als genotoxischer Effekt gewertet werden kann. Aufgrund des Fehlens von Referenzwerten gestaltete sich die Einordnung der Werte aus den Untersuchungen der Barben ebenfalls als schwierig. Boettcher et al. (2010) untersuchten Barben hinsichtlich genotoxischer Effekte in der Donau nahe der Stadt Sigmaringen, welche im Rahmen ihrer Studie als unbelastet eingestuft wurde. Barben dieser Stelle wiesen höhere Mikrokernanzahlen auf als Barben aus dem untersuchten Argenabschnitt. Hierdurch kann in dieser Studie ein genotoxischer Einfluss auf Barben am untersuchten Argenabschnitt ausgeschlossen werden.

Bei der Stressproteinanalyse unterschieden sich die Werte für die einzelnen Probestellen, bis auf eine Ausnahme, nicht signifikant voneinander. So zeigten lediglich Groppen, die in Probenahme 5 unterhalb des RKB Dürren gefangen wurden, erhöhte Hsp70-Gehalte, welche die schweren Reaktionen aus der Histopathologie widerspiegeln. Die Ergebnisse der histopathologischen Analysen machen deutlich, dass der Gesundheitszustand der Fische im gesamten untersuchten Gewässerabschnitt an der Argen, sowohl oberhalb als auch unterhalb des RKB Dürren, beeinträchtigt ist. Vor allem die sedimentgebundenen Arten *Cottus gobio* und *Barbatula barbatula* wiesen in allen untersuchten Organen deutliche bis schwere Reaktionen und Schädigungen auf. Die untersuchten Kiemen wiesen diverse Reaktionen wie starke Hyperplasien (Vermehrung von Epithelzellen), starke Hypertrophien (Vergrößerung der Epithelzellen), häufig auftretende Epithel-Liftings (Ablösen der Epithelzellen), Fusionen der Sekundärlamellen und Epithelzellnekrosen auf. In den Lebern waren zelluläre Veränderungen in Form von starken Vakuolisierungen, eines Abbaus des Speicherstoffs Glykogen sowie irregulär geformte Hepatozyten und Nuklei zu beobachten. In selteneren Fällen wiesen einige Leberabschnitte Läsionen wie z. B. Nekrosen und stark vergrößerte sowie formveränderte Leberzellen (Megalozysten) auf. Auch in der Niere konnten Reaktionen beobachtet werden, die auf eine gesundheitliche Beeinträchtigung schließen lassen. Die am häufigsten beobachteten zellulären Veränderungen waren hierbei Vakuolisierungen der Tubuluszellen, irregulär geformte Nuklei, hyalintropfige Proteinspeicherungen in den Nierentubuli sowie dilatierte und degenerierte Glomeruli. Alle erhobenen Messwerte der physikalisch-chemischen Parameter lagen nach den Orientierungswerten der LAWA (LUBW, 2008) und der Oberflächengewässerverordnung (OGewV, 2011) in einem Bereich der einem guten bis sehr guten ökologischen Zustand entspricht. Trotz hoher Chloridkonzentrationen im Oberflächenabfluss der A96 wurden am Ablauf des RKB und in der Argen nur geringe Erhöhungen des Chloridgehaltes festgestellt. Auch die Untersuchung des Makrozoobenthos und die damit erhobenen ökologischen Indices wiesen auf einen guten ökologischen Zustand beider Probestellen hin. Bei der elektrofischereilichen Bestandsaufnahme wurden an beiden Probestellen alle typspezifischen Leitfischarten sowie nahezu alle Begleitarten, mit

Ausnahme der Seeforelle, der Quappe und der Nase, nachgewiesen. Jedoch wurden alle Fischarten nicht in allen Befischungen und nur in außergewöhnlich niedrigen Zahlen nachgewiesen, sodass der Bestand in den Untersuchungsstrecken in quantitativer Hinsicht als stark defizitär beschrieben werden kann.

In der chemischen Analytik konnten Spuren diverser Verbindungen in Fischen und Sedimenten beider Probestellen nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen waren bei einigen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), den polyzyklischen Moschusverbindungen (HHCB, AHTN), den polybromierten Diphenylethern (PBDE) sowie bei den Indikator-Kongeneren der polychlorierten Biphenyle (PCB) zu messen. Der Vergleich mit der Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments (Directive 2013/39/EU, 2013) zeigt, dass die Konzentrationen der gemessenen PBDEs und des Stoffes Naphthalin die Grenzwerte überschritten. Durch ihren hydrophoben Charakter neigen diese Substanzen dazu, sich in Organismen und Sedimenten anzureichern, wodurch höhere Konzentrationen erreicht werden können als im Wasser (Brázová et al., 2012; Burreau et al., 2004).

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass die erhobenen Daten auf eine ernstzunehmende Beeinträchtigung des Gesundheitszustands der wildlebenden Fische, auf eine Belastung der Fische und Sedimente sowie auf eine starke Beeinträchtigung der Fischpopulation an beiden Probestellen, d.h. auch oberhalb der Einleitung des RKB Dürren, hindeuten. In Bezug auf das Ziel der vorliegenden Studie bedeutet dies, dass das RKB Dürren keine wesentliche und vor allem keine alleinige Belastungsquelle für das Ökosystem der Unteren Argen im untersuchten Gewässerabschnitt darstellt. Durch die Stoffeinträge über das RKB Dürren ist allerdings eine zusätzliche Belastung für die Gesundheit wasserlebender Organismen, vor allem bei Starkregenereignissen in Kombination mit einer geringen Wasserführung der Argen, nicht auszuschließen (siehe Ergebnisse Embryotest). Des Weiteren weisen die Daten auf eine moderate Hintergrundbelastung durch abwasser- und verkehrsbürtige Stoffe hin. Da die Argen einen Bodenseezufluss mit hoher ökologischer und wirtschaftlicher Relevanz darstellt, werden abschließend – auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse – weitere Untersuchungen am Bodenseezufluss Argen empfohlen, um seinen ökologische Zustand zu verbessern und dadurch auch die Wasserqualität und die ökologische Stabilität des Bodensees zu erhalten. Dies ist besonders im Hinblick auf die Trinkwassernutzung im Bodensee von hoher gesellschaftlicher Relevanz.

1.8 Synthese

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, die Reinigungseffizienz bzw. das Abwasser mehrerer Baden-Württembergischer Kläranlagen – ausgestattet mit unterschiedlichen Reinigungstechniken – durch die Anwendung des Fischembryotests (FET) zu analysieren und zu bewerten. Zusätzlich wurden hierzu auch Sediment- und Oberflächenwasserproben einiger angeschlossener Fließgewässer hinsichtlich ihres embryotoxischen Potentials untersucht, um den Einfluss der angeschlossenen Kläranlagen (KA Langwiese, KA Albstadt-Ebingen und KA Albstadt-Lautlingen) zu ermitteln. Zum anderen wurden die Einflüsse von Kläranlagen und Straßenabwässern auf die aufnehmenden Oberflächengewässer durch den kombinierten Einsatz effektbasierter ökotoxikologischer und ökologischer Methoden erfasst. Des Weiteren wurden Antworten auf die in Kapitel 1.5 gestellten Fragestellungen erarbeitet, die im Folgenden erläutert werden.

1. Ist der Fischembryotest (FET) mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) ein adäquates Mittel zur Bewertung von Abwasserproben?

Bezüglich der ersten Fragestellung konnte durch die Ergebnisse aus den in den Kapiteln 1 und 2 durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass der Fischembryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) ein adäquates Mittel zur Abwasserbewertung und damit auch zur Bewertung unterschiedlicher Abwasserreinigungstechniken darstellt. Bei allen untersuchten „konventionell“ ausgestatteten Kläranlagen (mit mechanischer, biologischer und chemischer Stufe) war eine deutliche Reduktion der embryotoxischen Potentiale vom Zulauf bis hin zum Ablauf erkennbar, was auf die Eignung des Tests für die Abwasserbewertung hinweist. Bei der Bewertung der 4. Reinigungsstufe in den Kläranlagen Langwiese (nach dem Ausbau 2013) und Mannheim waren mit dem FET nur geringfügige bzw. keine Verbesserungen erkennbar, welche jedoch auf die bereits gute Eliminationsleistung ihrer „konventionellen“ Reinigungsverfahren zurückzuführen sind. Dennoch konnte im Falle der KA Langwiese mit den erhobenen Daten gezeigt werden, dass selbst auf einem hohen technologischen Niveau eine weitere Reduktion embryotoxischer Potentiale durch die adsorptive Stufe aus Pulveraktivkohle (PAK) erreicht werden kann.

2. Wie ist die Reinigungsleistung von konventionellen Abwasserreinigungstechniken mithilfe des FET zu bewerten?

Aus den Ergebnissen der in den Kapiteln 1 und 2 präsentierten Studien geht hervor, dass die Reinigungsleistung konventioneller Abwasserreinigungstechniken mit dem FET als insgesamt gut bewertet werden kann. Dennoch konnte am Beispiel der KA Göppingen sowie in einigen Probenahmen der KA Langwiese gezeigt werden, dass das konventionell gereinigte Abwasser nicht immer als unbedenklich bzw. für die Fischentwicklung als ungefährlich einzustufen ist.

Weiterhin konnte nach dem Ausbau der KA Langwiese gezeigt werden, dass zusätzliche Stufen zur weitergehenden Abwasserreinigung (4. Reinigungsstufe) auf der Basis von PAK zu einer weiteren Reduktion embryotoxischer Effekte führen.

3. Führt die 4. Reinigungsstufe in Kläranlagen zu einer weiteren Reduktion von toxischen Potentialen und Effekten bei Fischen?

Diese Frage ist mit ja zu beantworten. Die Analyse der nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben aus der Schussen führte hinsichtlich der Effizienz der PAK zu deutlichen Ergebnissen. Sowohl bei der Schlupf- als auch bei der Mortalitätsrate konnte nach dem Ausbau der KA Langwiese eine signifikante Verbesserung in den Proben der Probestellen S3 und S6 – unterhalb der Kläranlage – festgestellt werden, welche auf die Installation der PAK-Stufe zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu Abwasserproben, die nur eine „Momentaufnahme“ einer Spurenstoffbelastung darstellen, können Sedimente Belastungen über einen längeren Zeitraum integrieren. Dadurch sind sie nicht nur für die Belastungscharakterisierung von Gewässern geeignet, sondern dienen auch dazu, die Auswirkungen neuer Abwassereinigungsstufen zu erfassen. Folglich erwies sich der FET auch bei der Anwendung mit Flusssedimenten als adäquates Mittel, um die Auswirkungen einer zusätzlichen Reinigungsstufe auf die angeschlossenen Oberflächengewässer zu bewerten.

4. In welchem Zusammenhang stehen die gewonnenen Ergebnisse mit in anderen Tests erzielten Ergebnissen?

Die Ergebnisse der im Rahmen des Projekts SchussenAktiv*plus* durchgeführten FETs wurden durch Effektuntersuchungen und Wirkpotentialtests der Kooperationspartner bestätigt. Nach dem Ausbau der KA Langwiese wurde eine reduzierte Mortalität sowie eine erhöhte Schlupfrate der exponierten Forellenembryonen im Bypass-System an der Schussen beobachtet. Anhand dieses Beispiels wird klar ersichtlich, dass die Ergebnisse aus den Wirkuntersuchungen an Forellenembryonen die Daten aus den Wirkpotentialtests mit Zebraäbrblingsembryonen widerspiegeln, wodurch der Vorteil eines kombinierten Einsatzes von Wirkpotentialtests und Wirktests verdeutlicht wird.

5. Kann durch die 4. Reinigungsstufe in Kläranlagen eine Verbesserung im Ökosystem des aufnehmenden Gewässers erreicht werden?

In Kapitel 2 konnte gezeigt werden, dass eine weitergehende Abwasserreinigung mit PAK zu einer deutlichen Reduktion von Spurenstoffen sowie zu einer deutlichen Reduktion ihrer Wirkungen in Biota führt, wodurch auch eine Verbesserung im Ökosystem des aufnehmenden Gewässers erreicht werden kann. Diese Reduktion war sowohl in Wirkpotentialtests (u. a. FET) als auch bei der Untersuchung von Biomarkern im Freiland erkennbar. Der großtechnische Ausbau der KA Langwiese mit einer

adsorptiven Pulveraktivkohlestufe führte bereits nach 15 Monaten zu einer deutlichen Reduktion der toxischen Potentiale in Sediment und Oberflächenwasser der Schussen sowie zu einer Verbesserung der Fischgesundheit, einem Artenanstieg beim Makrozoobenthos und einem verbesserten Geschlechterverhältnis bei Gammariden. Die Effizienz einer adsorptiven Stufe auf Basis von PAK wurde durch die Untersuchungen an den Kläranlagen in Mannheim und Albstadt-Ebingen sowie am Fluss Schmiecha bestätigt.

6. Welchen Langzeiteffekt hat der Ausbau einer Kläranlage mit der 4. Reinigungsstufe?

Dass sich die weitergehende Abwasserreinigung auch langfristig positiv auf das Ökosystem angeschlossener Oberflächengewässer auswirken kann, wird am Beispiel der Kläranlagen in Albstadt-Ebingen und Albstadt-Lautlingen sowie am Beispiel der Flüsse Schmiecha und Eyach auf der Schwäbischen Alb verdeutlicht. Beide Flüsse stellten in den Zeiten der florierenden Textilindustrie stark anthropogen belastete Gewässer dar. Durch den Ausbau der angeschlossenen Kläranlagen mit einer PAK-Stufe zur Entfärbung und Schadstoffelimination konnte seit Anfang der 1990er Jahre eine stetige Verbesserung der Gewässerqualität sowie der Gewässergüte und damit auch eine Erholung des Ökosystems in der Schmiecha verzeichnet werden. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Analysen (Kapitel 2.3) bestätigen diesen Trend.

7. Welche Vorteile bietet das adsorptive Verfahren mit Pulveraktivkohle?

Der Vorteil eines adsorptiven Verfahrens mit PAK gegenüber anderen Technologien, wie bspw. der Ozonung, liegt darin, dass sie ein breites Spektrum an schwer abbaubaren Substanzen eliminieren kann, ohne dass dabei Risiken durch toxische Transformationsprodukte entstehen. Zwar weist die Ozonung für manche Stoffe höhere Eliminationsleistungen auf, jedoch kann sie die Selektion und Entstehung robuster Keime sowie Bakterien mit Antibiotika-Resistenzgenen fördern. Eine eindeutige Ursache für diesen Effekt ist bis dato nicht bekannt, jedoch sind Kreuzresistenzen nicht auszuschließen. Da beide Verfahren sowohl Vor- als auch Nachteile bieten, muss die Entscheidung über den Einsatz einer solchen Stufe von der Nutzung der Vorfluter abhängig gemacht werden. Weist ein Vorfluter eine hohe Keimbelastung auf oder wird dieser als Badegewässer genutzt, bietet sich der Einsatz einer Ozonung mit einer nachgeschalteten Filtrationsstufe an. Steht jedoch eine breit gefächerte Spurenstoffelimination im Fokus der Abwasserbehandlung oder wird der Vorfluter als Trinkwasserreservoir genutzt, so ist eine adsorptive Behandlung mit PAK besser geeignet. Obwohl die Gesamtkosten für die Inbetriebnahme einer PAK-Stufe ca. 15 % höher sind als die der Ozonung, sind die Verbraucherkosten relativ gering. Bei einer im Rahmen des Projekts SchussenAktivplus durchgeführten Kosten-Nutzen-Analyse wurde errechnet, dass pro EW (Einwohnerwert) zwischen 6 und 14 € pro Jahr für die weitergehende Spurenstoffelimination anfallen.

8. Welchen Einfluss können Straßenabwässer auf das aufnehmende Gewässer ausüben?

In Kapitel 3 sollte der Einfluss von Straßenabwässern auf das aufnehmende Gewässer, in diesem Fall der Argen, untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte ober- und unterhalb der Einleitung durch das Regen- und Klärbecken Dürren bei Kißlegg, welches keinen Anschluss an kommunale Abwassernetze besitzt. Die erhobenen Daten zeigen, dass das RKB Dürren keine wesentliche und vor allem keine alleinige Belastungsquelle für das Ökosystem der Unteren Argen im untersuchten Gewässerabschnitt darstellt, wodurch der Einfluss von Straßenabwässern auf das aufnehmende Gewässer, in diesem Fall die Argen, nicht eindeutig geklärt werden konnte. Die Ergebnisse aus den Fischembryotests zeigen jedoch, dass Stoffeinträge über das RKB Dürren, und damit auch eine zusätzliche Belastung wasserlebender Organismen, bei Starkregenereignissen nicht auszuschließen sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein eindeutiger Einfluss von Straßenabwässern der benachbarten Autobahn A96 nicht ersichtlich war. Dennoch war eine ernstzunehmende Beeinträchtigung des Gesundheitszustands der wildlebenden Fische, eine Belastung der Fische und Sedimente sowie eine starke Beeinträchtigung der Fischpopulation an beiden Probestellen festzustellen, was auf eine Hintergrundbelastung der Argen hindeutet. Auf der Grundlage der Ergebnisse werden daher abschließend weitere Untersuchungen am Bodenseezufluss Argen empfohlen, um seinen ökologischen Zustand sowie den Gesundheitszustand der Fische zu verbessern.

Abschließend erfolgt eine Stellungnahme zu den durchgeführten biologischen Untersuchungen. Während die chemische Analytik die Frage nach der Präsenz bestimmter Stoffe in der Umwelt beantworten kann, stößt sie bei der Frage nach der Gesamtheit an Stoffen in der Umwelt und ihrer ökologischen Relevanz an ihre Grenzen. Im Gegensatz hierzu stehen die biologischen Untersuchungen, welche die Gesamtheit aller Belastungen integrieren, jedoch keine Information über potentielle Verursacher der beobachteten Wirkungen liefern. Durch die kombinierte Betrachtung der Belastung mithilfe der chemischen Analytik, der Analyse von Umweltproben mithilfe von Wirkpotentialtests und der tatsächlichen Untersuchung von Wirkungen in Biota aus dem Freiland wird eine umfassende und komplementäre Bewertung der Belastungssituation in der Umwelt ermöglicht. Folglich stellt dieser komplementäre Ansatz auch ein geeignetes Werkzeug für die Risikobewertung von Abwassereinleitungen dar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass der Fischembryotest (FET) mit dem Zebraabärbling (*Danio rerio*) einen wichtigen Bestandteil bzw. Biotest bei der komplementären Bewertung von Belastungszuständen in der Umwelt sowie zur Bewertung von Abwassereinflüssen darstellt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der FET einige Ergebnisse aus parallel durchgeführten Untersuchungen widerspiegelt und dadurch bei der Interpretation von biologischen Antworten helfen kann (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der durchgeführten Studien. Der Fokus liegt hierbei auf dem Vergleich zwischen dem Fischembryotest (FET) mit *Danio rerio* und anderen parallel durchgeführten Analysen. ++ = starke Effekte; + = schwache Effekte; 0 = keine Effekte

Untersuchte Systeme	Fokus der Studie ?	Was wurde in Eigenarbeit analysiert?	embryotoxische Potentiale im FET	Effekte/toxische Potentiale bei anderen Methoden	Spiegeln die Ergebnisse aus dem FET die Ergebnisse der anderen Analysen wider?
KA Tübingen	Reinigungsleistung	Abwasser	+	k. D.	k. D.
KA Göppingen	Reinigungsleistung	Abwasser	+	k. D.	k. D.
KA Mannheim	3. Reinigungsstufe vs. PAK	Abwasser	ohne PAK: 0 mit PAK: 0	ohne PAK: ++ mit PAK: +/0	Bedingt, Zelltests deutlich sensitiver
KA Langwiese bzw. Schussen	3. Reinigungsstufe vs. PAK	Abwasser Sediment	ohne PAK: + mit PAK: 0 ohne PAK: +/++ mit PAK: +	ohne PAK: ++ mit PAK: +/0 ohne PAK: 0/+ mit PAK: 0	Ja mit Einschränkungen
KA Ebingen bzw. Schmiecha	PAK Langzeitwirkung	Sediment Biota	0/+	0/+	Ja
KA Lautlingen bzw. Eyach	PAK Langzeitwirkung	Sediment Biota	0/+	0/+	Ja
RKB Dürren bzw. Argen	Auswirkung von Straßenabwässern	Sediment Biota	++/+	++/+0	Ja mit Einschränkungen

Abkürzungen: FET = Fischembryotest; PAK= Pulveraktivkohle; k. D. = keine Daten vorhanden

1.9. Literatur

- Abegglen, C., (2010). Mikroverunreinigungen in Kläranlagen: Technische Verfahren zur Elimination von organischen Spurenstoffen. *Gas Wasser Abwasser* 90, 587-594.
- Adams, S., (2000). Assessing sources of stress to aquatic ecosystems using integrated biomarkers. *Biological resource management connecting science and policy*. Springer, pp. 17-29.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C., (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343, 121-135.
- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T., (2016). Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of the Total Environment* 559, 103-112.
- Altmann, J., Ruhl, A.S., Zietzschmann, F., Jekel, M., (2014). Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. *Water Research* 55, 185-193.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319-1330.
- Beasley, G., Kneale, P., (2002). Reviewing the impact of metals and PAHs on macroinvertebrates in urban watercourses. *Progress in Physical Geography* 26, 236-270.
- Bernet, D., (2003). Biomonitoring in Fließgewässern des Kantons Bern, Synthesebericht. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin FIWI, Universität Bern, Bern. Synthesebericht. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin FIWI, Universität Bern, Bern.
- BMUB, (2012). Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit; Die Wasserrahmenrichtlinie - Eine Zwischenbilanz zur Umsetzung der Maßnahmenprogramme 2012.
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/wasserrahmenrichtlinie_2012.pdf; Zugegriffen: 02.04.2017.
- BMUB/UBA, (2016). Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit/ Umweltbundesamt: Die Wasserrahmenrichtlinie – Deutschlands Gewässer 2015. *Bonn, Dessau*.
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1968/publikationen/final_broschure_wasserrahm_enrichtlinie_bf_112116.pdf. Zugegriffen: 02.04.2017.
- Boehler, M., Zwickenpflug, B., Hollender, J., Ternes, T., Joss, A., Siegrist, H., (2012). Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. *Water Science and Technology* 66, 2115-2121.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P., Hollert, H., Braunbeck, T., (2010). Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by

- means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 700, 11-17.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.
- Bonvin, F., Jost, L., Randin, L., Bonvin, E., Kohn, T., (2016). Super-fine powdered activated carbon (SPAC) for efficient removal of micropollutants from wastewater treatment plant effluent. *Water Research* 90, 90-99.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brázová, T., Hanzelová, V., Miklisová, D., (2012). Bioaccumulation of six PCB indicator congeners in a heavily polluted water reservoir in Eastern Slovakia: tissue-specific distribution in fish and their parasites. *Parasitology Research* 111, 779-786.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., (2013). Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339, 814-815.
- Bucher, F., Hofer, R., Salvenmoser, W., (1992). Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 410-419.
- Burke, V., Greskowiak, J., Asmuß, T., Bremermann, R., Taute, T., Massmann, G., (2014). Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Science of the Total Environment* 482, 53-61.
- Bureau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R., (2004). Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere* 55, 1043-1052.
- Carvalho, R.N., Arukwe, A., Ait-Aissa, S., Bado-Nilles, A., Balzamo, S., Baun, A., Belkin, S., Blaha, L., Brion, F., Conti, D., (2014). Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: how safe are they? *Toxicological Sciences* 141, 218-233.
- da Silva, B.F., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D., (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331-1339.
- Depledge, M., Fossi, M., (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 161-172.
- Deutsche Bundesregierung, (2004). Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer, AbwV-Abwasserverordnung (vom 17. Juni 2004, BGBl. I S. 1108, zuletzt geändert am 31. Juli 2009, BGBl. I S. 2585 (Inkrafttreten am 01.03.2010)). BGBl. I.
- Dieterich, A., Fischbach, U., Ludwig, M., Di Lellis, M.A., Troschinski, S., Gärtner, U., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., (2013). Daily and seasonal changes in heat exposure and the Hsp70 level of

- individuals from a field population of *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836)(Pulmonata, Hygromiidae) in Southern France. *Cell Stress and Chaperones* 18, 405-414.
- DIN EN ISO 7346-3:1998-03, (1998). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Teil 3: Durchflußverfahren (ISO 7346-3:1996); Deutsche Fassung EN ISO 7346-3:1997.
- DIN EN ISO 15088:2007, (2009). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007); Deutsche Fassung EN ISO 15088:2008.
- Directive 92/43/EEC, (1992). Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Official Journal of the European Union*. L 206. pp. 7-50.
- Directive 2000/60/EC, (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*. L 237. . pp. 1-73.
- Directive 2013/39/EU, (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*. L 226. pp. 1-17.
- Dußling, U., Berg, R., (2001). Fische in Baden-Württemberg. *Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Stuttgart* 176.
- Eder, K.J., Köhler, H.R., Werner, I., (2007). Pesticide and pathogen: heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1233-1242.
- Escher, M., Wahli, T., Büttner, S., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., (1999). The effect of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*): a cage experiment. *Aquatic Sciences* 61, 93-110.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61, 243-282.
- Fent, K., (2007). Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ferriman, A., (2007). BMJ readers choose the "sanitary revolution" as greatest medical advance since 1840. *BMJ: British Medical Journal* 334, 111.
- Gatermann, R., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Rimkus, G.G., Hecker, M., Karbe, L., (2002). Synthetic Musk in the Environment. Part 1: Species-Dependent Bioaccumulation of Polycyclic and Nitro Musk Fragrances in Freshwater Fish and Mussels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 437-446.

- Gerbersdorf, S.U., Hollert, H., Brinkmann, M., Wieprecht, S., Schüttrumpf, H., Manz, W., (2011). Anthropogenic pollutants affect ecosystem services of freshwater sediments: the need for a “triad plus x” approach. *Journal of Soils and Sediments* 11, 1099-1114.
- Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E., Triebkorn, R., (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 241-260.
- Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.-P.E., (2006). Benzotriazole and Tolyltriazole as Aquatic Contaminants. 1. Input and Occurrence in Rivers and Lakes. *Environmental Science & Technology* 40, 7186-7192.
- Grund, S., Keiter, S., Böttcher, M., Seitz, N., Wurm, K., Manz, W., Hollert, H., Braunbeck, T., (2010). Assessment of fish health status in the Upper Danube River by investigation of ultrastructural alterations in the liver of barbel *Barbus barbus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 88, 235-248.
- Heddle, J.A., Lue, C.B., Saunders, E.F., Benz, R.D., (1978). Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Research* 38, 2983-2988.
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C., Ekama, G.A., Brdjanovic, D., (2008). Biological wastewater treatment. IWA Publishing.
- Hollert, H., Ernst, M., Seiler, T.-B., Wölz, J., Braunbeck, T., Kosmehl, T., Keiter, S., Grund, S., Ahlf, W., Erdinger, L., (2009). Strategien zur Sedimentbewertung—ein Überblick. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 21, 160-176.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T., (2003). A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3, 197-207.
- IGKB, (2013). Faktenblatt „Phosphor im Bodensee“. http://www.igkb.org/fileadmin/user_upload/dokumente/aktuelles/IGKB_Faktenblatt_P_im_BS.pdf. Zugegriffen: 02.04.2017.
- Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., McArdeall, C.S., Ternes, T., Siegrist, H., (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research* 39, 3139-3152.
- Joss, A., Siegrist, H., Ternes, T., (2008). Are we about to upgrade wastewater treatment for removing organic micropollutants? *Water Science and Technology* 57, 251-255.
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C., (1998). Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 80, 183-201.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8897-8901.

- Klaminder, J., Brodin, T., Sundelin, A., Anderson, N.J., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., (2015). Long-Term Persistence of an Anxiolytic Drug (Oxazepam) in a Large Freshwater Lake. *Environmental Science & Technology* 49, 10406-10412.
- Köhler, H.-R., Knödler, C., Zanger, M., (1999). Divergent Kinetics of hsp70 Induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in Response to Four Environmentally Relevant Organic Chemicals (B[a]P, PCB52, γ -HCH, PCP): Suitability and Limits of a Biomarker. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 179-185.
- Köhler, H.-R., Rahman, B., Gräff, S., Berkus, M., Triebkorn, R., (1996). Expression of the stress-70 protein family (HSP70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: An approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere* 33, 1327-1340.
- Kunkel, U., Radke, M., (2012). Fate of pharmaceuticals in rivers: deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Research* 46, 5551-5565.
- LFischVO, (1998). Verordnung des Ministeriums für Ernährung und Ländlichen Raum zur Durchführung des Fischereigesetzes für Baden-Württemberg (Landesfischereiverordnung - LFischVO-) vom 3. April 1998.
- LUBW, (2008). Bewirtschaftungsziele für Fließgewässer. Arbeitshilfe zur Erstellung der Maßnahmenprogramme im Rahmen des ersten Bewirtschaftungsplans zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (German).
- LUBW, (2010). Die Schussen. Bilanz der Belastung eines Bodenseezuflusses. Entwicklung, gegenwärtiger Zustand und Zukunftsperspektiven für die Schussen aus wasserwirtschaftlicher Sicht. (Institut für Seenforschung Langenargen; Bd. 9). LUBW, Karlsruhe 2010. http://www4.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/72902/schussen_bilanz.pdf?command=downloadContent&filename=schussen_bilanz.pdf. Zugegriffen: 02.02.2017.
- Luckenbach, T., Corsi, I., Epel, D., (2004). Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Marine Environmental Research* 58, 215-219.
- Luckenbach, T., Epel, D., (2005). Nitromusk and Polycyclic Musk Compounds as Long-Term Inhibitors of Cellular Xenobiotic Defense Systems Mediated by Multidrug Transporters. *Environmental Health Perspectives* 113, 17-24.
- Luckenbach, T., Kilian, M., Triebkorn, R., Oberemm, A., (2001). Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 355-370.
- Lüddecke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Guede, H., Loeffler, H., (2015). Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research* 69, 243-251.

- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 473, 619-641.
- Maier, D., Benisek, M., Blaha, L., Dondero, F., Giesy, J.P., Köhler, H.-R., Richter, D., Scheurer, M., Triebkorn, R., (2016). Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132, 47-58.
- Mailler, R., Gasperi, J., Coquet, Y., Deshayes, S., Zedek, S., Cren-Olivé, C., Cartiser, N., Eudes, V., Bressy, A., Caupos, E., (2015). Study of a large scale powdered activated carbon pilot: removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents. *Water Research* 72, 315-330.
- Maltby, L., Forrow, D., Boxall, A., Calow, P., Betton, C., (1995). The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 1. Field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1079-1092.
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., De Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chèvre, N., Schärer, M., (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Science of the Total Environment* 461, 480-498.
- McKim, J.M., Arthur, J.W., Thorslund, T.W., (1975). Toxicity of a linear alkylate sulfonate detergent to larvae of four species of freshwater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 14, 1-7.
- Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R., (2010). Uptake and Biological Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceutical Diclofenac in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology* 44, 2176-2182.
- Meinel, F., Ruhl, A.S., Sperlich, A., Zietzschmann, F., Jekel, M., (2014). Pilot-Scale Investigation of Micropollutant Removal with Granular and Powdered Activated Carbon. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 2260.
- Meinel, H., Lehmann, M., (2016). Schutz der Ressource Wasser. Wasser als Quelle des Lebens - Rita Triebkorn und Jürgen Wertheimer (Hrsg.). Springer, pp. 77-92.
- Meland, S., Heier, L., Salbu, B., Tollefsen, K., Farmen, E., Rosseland, B., (2010). Exposure of brown trout (*Salmo trutta* L.) to tunnel wash water runoff—chemical characterisation and biological impact. *Science of the Total Environment* 408, 2646-2656.
- Molinos-Senante, M., Reif, R., Garrido-Baserba, M., Hernández-Sancho, F., Omil, F., Poch, M., Sala-Garrido, R., (2013). Economic valuation of environmental benefits of removing pharmaceutical and personal care products from WWTP effluents by ozonation. *Science of the Total Environment* 461–462, 409-415.

- Mousel, D., Palmowski, L., Pinnekamp, J., (2017). Energy demand for elimination of organic micropollutants in municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 575, 1139-1149.
- Nagel, R., (2002). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19, 38-48.
- Nowotny, N., Epp, B., von Sonntag, C., Fahlenkamp, H., (2007). Quantification and Modeling of the Elimination Behavior of Ecologically Problematic Wastewater Micropollutants by Adsorption on Powdered and Granulated Activated Carbon. *Environmental Science & Technology* 41, 2050-2055.
- OECD, (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing.
- OGewV, (2011). Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV).
- Osterauer, R., Köhler, H.-R., (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86, 485-494.
- Peschke, K., Burmester, J., Hermann, M., Köhler, H.-R., Reitter, K., Scheurer, M., Wurm, K., Tribskorn, R., (2016). Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe (German). *gwf - Wasser/Abwasser* 157, 370-379.
- PflSchG, (2012). Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz - PflSchG) in der Fassung vom 6. Februar 2012 (BGBl. I S. 148, 1281), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 84 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist.
- Pinkney, A.E., Myers, M.S., Rutter, M.A., (2017). Histopathology of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*), and yellow perch (*Perca flavescens*) in relation to polychlorinated biphenyl (PCB) contamination in the Hudson River. *Science of the Total Environment* 575, 1325-1338.
- Plakas, K., Georgiadis, A., Karabelas, A., (2016). Sustainability assessment of tertiary wastewater treatment technologies: a multi-criteria analysis. *Water Science and Technology* 73, 1532-1540.
- Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., (2010). Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 515-521.
- Qiang, L., Cheng, J., Yi, J., Rotchell, J.M., Zhu, X., Zhou, J., (2016). Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology* 25, 1426-1437.

- Regulation (EC) No. 1907/2006, (2006). Regulation No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 99/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union. L 396/1*. . pp. 1-849.
- Rocha, P., Luvizotto, G., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., (2009). Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): in vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1842-1848.
- Sanders, B.M., Martin, L.S., (1993). Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Science of The Total Environment* 139, 459-470.
- Schmidt, H., Bernet, D., Wahli, T., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., (1999). Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *Journal of Fish Biology* 54, 585-596.
- Schwaiger, J., (2001). Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 231-240.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68, 141-150.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6, 75-86.
- Snyder, S.A., Adham, S., Redding, A.M., Cannon, F.S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E.C., Yoon, Y., (2007). Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202, 156-181.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83, 13-34.
- Spence, R., Smith, C., (2006). Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology* 17, 779-783.
- Stalter, D., Magdeburg, A., Weil, M., Knacker, T., Oehlmann, J., (2010). Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Research* 44, 439-448.

- Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T., (2002). Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology* 61, 24-38.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N., (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology* 36, 3855-3863.
- Thellmann, P., Köhler, H.-R., Rößler, A., Scheurer, M., Schwarz, S., Vogel, H.-J., Tribskorn, R., (2015). Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 16405-16416.
- Tribskorn, R., (2016). Der Fußabdruck des Menschen im Wasser: Spurenstoffe als Risiko für Mensch und Umwelt? Wasser als Quelle des Lebens- Rita Tribskorn und Jürgen Wertheimer (Hrsg.). Springer, pp. 207-223.
- Tribskorn, R., (2017). Das Projekt SchussenAktivplus: Hintergrund, Ziele, Inhalt und Projektteam. Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf - Rita Tribskorn (Hrsg.). Eberhard Karls Universität Universitätsbibliothek; Auflage: 1 (29. März 2017).
- Tribskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Köhler, H.-R., (2002). Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11, 451-465.
- Tribskorn, R., Amler, K., Blaha, L., Gallert, C., Giebner, S., Güde, H., Henneberg, A., Hess, S., Hetzenauer, H., Jedele, K., (2013a). SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* 25, 2.
- Tribskorn, R., Blaha, L., Engesser, B., Güde, H., Hetzenauer, H., Henneberg, A., Köhler, H.-R., Kraus, S., Maier, D., Peschke, K., (2013b). SchussenAktiv–Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 8, 427-437.
- Tribskorn, R., Casper, H., Scheil, V., Schwaiger, J., (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1405-1416.
- Tribskorn, R., Hetzenauer, H., (2012). Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe* 24, 1-24.

- Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H.-R., (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment* 141, 177-188.
- Triebskorn, R., Thellmann, P., Vogel, H.-J., Wurm, K., (2014). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie? (German). *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 7, 1-13.
- UBA, (2014). Umweltbundesamt (Hrsg.): Wasserwirtschaft in Deutschland - Teil 1. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/479/publikationen/wawi_teil_01_web.pdf. Zugegriffen: 02.04.2017.
- UBA, (2015). Umweltbundesamt (Hrsg.): Arzneimittel in der Umwelt-vermeiden, reduzieren, überwachen. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/01.08.2014_hintergrundpapier_arzneimittel_final_.pdf; Zugegriffen: 02.04.2017.
- van Gestel, C., van Brummelen, T., (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- Vieno, N., Sillanpää, M., (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International* 69, 28-39.
- Vilcinskas, A., (2004). Fische: Mitteleuropäische Süßwasserarten und Meeresfische der Nord- und Ostsee. BLV.
- Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Köhler, H.-R., Triebskorn, R., (2015). Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 11822-11839.
- Vobach, M., Kammann, U., (2003). Der Fischei-Test: Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen. *Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung* 50, 126-130.
- Vogel, H.-J., Baur, S., Triebskorn, R., Rößler, A., Metzger, S., (2014). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: 20 Jahre Pulveraktivkohleeinsatz im Vollstrom (German). *Korrespondenz Abwasser, Abfall* 61, 902-907.
- Wave, (2001). Gutachterliche Stellungnahme: Betrieb der Kläranlage Albstadt-Ebingen bei Q_{max}<980l/s im Zulauf der biologischen Stufe. Wave Auftragsnummer. 417790-027.

Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten

Kapitel 1: Bewertung der Reinigungsleistung von konventionell ausgestatteten Kläranlagen hinsichtlich der Reduktion embryotoxischer Potentiale im Abwasser mithilfe des Fischembryotests (FET)

Kapitel 1.1:

Bewertung von Abwasserproben aus der Kläranlage Tübingen durch Anwendung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH

Thellmann, P. und Triebkorn, R. (2014)

100 % Eigenanteil bei der Untersuchung der Proben sowie der Auswertung der Daten aus dem Fischembryotest und der Verfassung des dazugehörigen Abschlussberichts. Die Beprobung der Kläranlage Tübingen erfolgte durch die Mitarbeiter des Klärwerks. Der Transport der Proben erfolgte durch die Dr. Ing. Jedele und Partner GmbH.

Kapitel 1.2:

Untersuchungen der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen mithilfe des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH

Thellmann, P. und Triebkorn, R. (2015)

100 % Eigenanteil bei der Untersuchung der Proben sowie der Auswertung der Daten aus dem Fischembryotest und der Verfassung des dazugehörigen Abschlussberichts. Die Gewinnung von Zu- und Ablaufproben des Klärwerks Göppingen erfolgte durch die Mitarbeiter der Stadtentwässerung Göppingen. Der Transport der Proben erfolgte durch die Dr. Ing. Jedele und Partner GmbH.

Kapitel 2: Bewertung der Reinigungsleistung von Kläranlagen sowie der Belastung in den angeschlossenen Fließgewässern (Vorflutern) mithilfe des Fischembryotests (FET) und parallel durchgeführten Wirkuntersuchungen

Kapitel 2.1

Nachweis biologischer Wirkungen in Proben aus der Kläranlage Mannheim – *Ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser*

Im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg; Oktober (unveröffentlicht)

Triebskorn R., Thellmann P., Escher B., Gartiser S., Knauer M., Kuch B., Wagner M. (2015)

Die Entnahme von Proben aus den untersuchten Reinigungsstufen im Klärwerk Mannheim erfolgte durch die Mitarbeiter der Stadtentwässerung Mannheim. Der Transport der Proben erfolgte ebenfalls durch einen Mitarbeiter der Stadtentwässerung Mannheim. 100 % Eigenanteil bei der Untersuchung der Proben mit dem Fischembryotest sowie der Auswertung der Daten und der Verfassung des dazugehörigen Teilabschlussberichts. Hauptanteil (80 %) bei der Zusammenstellung des Gesamtabschlussberichts aller Projektpartner. Die Erstellung des Gesamtabschlussberichts erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Triebkorn (Universität Tübingen). Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. R. Triebkorn (Universität Tübingen).

Kapitel 2.2.1:

SchussenAktiv - Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg.

Korrespondenz Wasserwirtschaft

Triebskorn R., Blaha L., Engesser B., Güde H., Hetzenauer H., Henneberg A., Köhler H.-R., Krais S., Maier D., Peschke K., Thellmann P., Vogel H.-J., Kuch B., Oehlmann J., Rault M., Suchail S., Rey P., Richter D., Sacher F., Weyhmüller M. und Wurm K. (2013)

Mitwirkung bei den im Freiland (Fische, Wasser, Sediment) und auf den untersuchten Kläranlagen erfolgten Probenahmen. Die Gewinnung von Feld- und Abwasserproben zur Durchführung des Fischembryotests erfolgte in Zusammenarbeit mit Kollegen der Universität Tübingen. Mitwirkung bei der Durchführung von Fischembryotests mit Freilandproben und Abwasserproben. Betreuung von Kandidaten, welche sich im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten an der Untersuchung der Freiland- und

Abwasserproben beteiligten. Mitwirkung bei der Auswertung der Fischembryotests mit Freiland- und Abwasserproben. Eigenanteil: ca. 15 %.

Kapitel 2.2.2

Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream?

International Journal of Water and Wastewater Treatment; Doi: <http://dx.doi.org/10.16966/2381-5299.1>

Thellmann P., Greiner-Perth K., Jacob S., Knoll K., Schäfer M., Stängle M., Ziegler M., Scheurer M., Köhler H.-R., Triebkorn R. (2017)

Die Gewinnung von Sediment- und Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Schussen und Argen erfolgte gemeinsam mit Kollegen der Universitäten Tübingen und Frankfurt. Mitwirkung bei der Untersuchung der Proben aus dem Flüssen Schussen und Argen. Betreuung von Kandidaten (K. Greiner-Perth, S. Jacob, M. Knoll, M. Stängle, M. Ziegler), welche sich im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten an der Untersuchung der Freiland- und Abwasserproben beteiligten. Die Digitalisierung und Einspeisung der Daten in die Datenbank erfolgte in Eigenarbeit. 100 % Eigenanteil bei der statistischen Auswertung der Daten. Hauptanteil bei der Verfassung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift „International Journal of Water and Wastewater Treatment“. Die Beschreibungen und Durchführung der chemischen Analytik erfolgten durch den Co-Autor M. Scheurer (TZW Karlsruhe). Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. R. Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. H.-R. Köhler (Universität Tübingen).

Kapitel 2.3.1

Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie? (German).

Korrespondenz Wasserwirtschaft

Triebkorn R., Thellmann P., Vogel H.-J., Wurm K. (2014)

Die Gewinnung von Sediment- und Oberflächenwasserproben aus dem Fluss Schmiecha erfolgte gemeinsam mit Kollegen der Universität Tübingen. Die Elektrobefischungen zur Entnahme von Fischen wurden durch K. Wurm (Ökologisches Labor Starzach) durchgeführt. Die Präparation der Fische erfolgte durch Kollegen der Universität Tübingen. 100 % Eigenanteil an der Durchführung der ökotoxikologischen Untersuchungen (Fischembryotest mit nativen Sediment- und

Oberflächenwasserproben, Untersuchungen an Fischen aus dem Freiland: histopathologische Untersuchungen, Untersuchungen des Stressproteingehalts (Hsp70), Mikrokerntest mit Blutproben). 100 % Eigenanteil bei Erstellung der Graphen zu den ökotoxikologischen Untersuchungen sowie Mitwirkung beim Erstellen des Material- und Methodenteils.

Kapitel 2.3.2

Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies.

Environmental Science and Pollution Research; DOI: 10.1007/s11356-014-3785-8

Thellmann P., Köhler H.-R., Rößler A., Scheurer M., Schwarz S., Vogel H.-J., Triebkorn R. (2015)

Die Gewinnung von Sediment- und Oberflächenwasserproben aus den Flüssen Schussen und Schmiecha erfolgte gemeinsam mit Kollegen der Universität Tübingen. 100 % Eigenanteil bei der Untersuchung der Proben aus dem Fluss Schmiecha. Mitwirkung bei der Untersuchung der Proben aus dem Fluss Schussen. Die Digitalisierung und Sortierung der Daten in der Datenbank erfolgte in Eigenarbeit. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit S. Schwarz. Hauptanteil bei der Verfassung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift Environmental Science and Pollution Research. Die Beschreibungen und Durchführung der chemischen Analytik erfolgten durch die Co-Autoren A. Rößler (Universität Stuttgart) und M. Scheurer (TZW Karlsruhe). Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. R. Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. H.-R. Köhler (Universität Tübingen). Eigenanteil: 75 %

Kapitel 3: Der Einfluss von Straßenabwässern auf die Fauna des aufnehmenden Gewässers

Kapitel 3.1

Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": How a case study on the impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany)

Environmental Sciences Europe; DOI: 10.1186/s12302-017-0108-y

Thellmann P, Kuch B, Wurm K, Köhler H-R, Triebkorn R (2015)

Die Gewinnung von Sediment- und Oberflächenwasserproben aus dem Fluss Argen erfolgte gemeinsam mit Kollegen der Universität Tübingen. Die Elektrobefischungen zur Entnahme von Fischen erfolgten unter der Leitung von K. Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) und wurden gemeinsam mit Dr. Karl Wurm sowie Kollegen der Universität Tübingen durchgeführt. Die Präparation

der Fische erfolgte in Zusammenarbeit mit Kollegen der Universität Tübingen. 100 % Eigenanteil an der Durchführung der ökotoxikologischen Untersuchungen (Fischembryotest mit nativen Sediment- und Oberflächenwasserproben, Untersuchungen an Fischen aus dem Freiland: histologische Untersuchungen, Untersuchungen Stressproteingehalts (Hsp70), Mikrokerntest mit Blutproben). 100 % Eigenanteil bei Erstellung der Graphen zu den ökotoxikologischen Untersuchungen. Hauptanteil (70 %) bei der Verfassung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift Environmental Sciences Europe. Die Beschreibung und Durchführung der chemischen Analytik erfolgten durch den Co-Autor Dr. B. Kuch (Universität Stuttgart). Die Durchführung der Makrozoobenthosuntersuchungen erfolgte durch den Co-Autor Dr. K. Wurm. Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. R. Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. H.-R. Köhler (Universität Tübingen).

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten

Kapitel 1.1: Bewertung von Abwasserproben aus der Kläranlage Tübingen durch Anwendung des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH; 2014

Thellmann, P. und Triebkorn, R.

1. Einleitung

Zur ökotoxikologischen Untersuchung der Reinigungseffizienz der Kläranlage (KA) Tübingen wurden Zulauf- sowie Ablaufproben von sieben aufeinanderfolgenden Tagen (mit unterschiedlichen Witterungs- und Niederschlagsverhältnissen) analysiert. Die Untersuchung erfolgte mithilfe des Embryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*), der es ermöglicht, embryotoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben nachzuweisen und so das Gefährdungspotential in den jeweiligen Proben abzuschätzen. Dies ist vor allem im Hinblick auf den Gesundheitszustand der Flora und Fauna des aufnehmenden Gewässers, in diesem Fall des Neckars, von großer Relevanz. Der Vergleich zwischen Zu- und Ablaufproben eines jeden Probenahmetages dient hier zur Erfassung der Reduktion embryotoxischer Potentiale während der Abwasserreinigung innerhalb der KA Tübingen. Weiterhin soll durch den Vergleich mehrerer Probenahmetage (und hiermit zusammenhängend auch mehrerer Proben) die Reinigungseffizienz bei unterschiedlichen Witterungsverhältnissen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Entnahme der Proben

An sieben aufeinanderfolgenden Tagen wurden täglich drei Mal 250 ml aus dem Zulauf (Rohabwasser nach mechanischer Vorklärung) sowie drei Mal 250 ml aus dem Ablauf (nach Passage des Flockungsfilters) entnommen. Die Entnahme der Proben erfolgte hierbei durch Mitarbeiter des Klärwerks Tübingen. Die entnommenen Wasserproben wurden bis zum Transport in die Laboratorien der Abteilung "Physiologische Ökologie der Tiere" der Universität Tübingen in 250 ml Braunglasflaschen (Schott Duran, Mainz, Deutschland) gekühlt aufbewahrt und anschließend bei -25 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Probenahmezeitpunkte sowie weitere Informationen über die Codierung der Proben sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Vereinfachung werden für die Probestellen und -tage im Folgenden die Probencodes aus Tabelle 1 verwendet. Informationen über die Niederschlagsverhältnisse vor und während der Probenahmen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zeitpunkt der Probenahmen und Codierung der Proben

	Datum	Code Zulauf	Code Ablauf
Tag 1	29/30.04. 2014	ZU1	AB1
Tag 2	30.04/01.05.2014	ZU2	Ab2
Tag 3	1/2.05.2014	ZU3	AB3
Tag 4	2/3.05.2014	ZU4	AB4
Tag 5	3/4.05.2014	ZU5	Ab5
Tag 6	4/5.05-2014	ZU6	AB6
Tag 7	5/6.05.2014	ZU7	AB7

Tabelle 2: Niederschlagsmengen zum Zeitpunkt der durchgeführten Probenahmen an der Kläranlage Tübingen

Datum	Niederschlagsmenge [mm]	Probenahmetage an der KA Tübingen
25.04.2014	0	-
26.04.2014	0	-
27.04.2014	18	-
28.04.2014	0	-
29.04.2014	3	Tag 1
30.04.2014	11	Tag 2
01.05.2014	15	Tag 3
02.05.2014	0	Tag 4
03.05.2014	0	Tag 5
04.05.2014	0	Tag 6
05.05.2014	0	Tag 7
06.05.2014	0	-

2.2 Der Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

Mithilfe des Embryotests können entwicklungstoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben nachgewiesen werden. Der im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführte Embryotest wird als sogenannter „verlängerter Embryotest“ bezeichnet und sieht eine 96-stündige Expositionszeit von Embryonen vor. Der Test erfolgt in Anlehnung an den von Nagel (2002) entwickelten Embryotest (DarT) mit *Danio rerio* sowie an den „Fish Early-life Stage Toxicity Test“ (OECD Guideline 210, 1992). Bei diesem Test wurden befruchtete Eier des Zebrafisches (*Danio rerio*) gegenüber Zu- und Ablaufproben der untersuchten Kläranlage exponiert. Während des Tests wurden zu definierten Zeitpunkten teratogene, subletale und letale Endpunkte sowie die Schlupfrate festgehalten.

Die Eier des Zebrafisches (*Danio rerio*) wurden nach der Befruchtung aus den Becken entnommen und gegenüber Abwasserproben der KA Tübingen bzw. gegenüber dem Kontrollmedium (Kunstwasser nach ISO 7346/3) exponiert. Die Exposition der befruchteten Eier erfolgte in kleinen Petrischalen, die vor Versuchsbeginn mit dem zu testenden Abwasser abgesättigt wurden. Von jeder Probe wurden

jeweils acht Petrischalen mit Wasser befüllt, wobei in jedes Schälchen vier befruchtete Eier überführt wurden. Während der Exposition wurden die Eier bei $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wärmeschrank bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h: 12 h gehältert. Die Bestimmung der o.g. Endpunkte erfolgt mithilfe eines Binokulars (Fa. Zeiss) und wird zu definierten Zeitpunkten (8, 12, 24, 48, 60, 72 und 96 h nach Befruchtung) durchgeführt. Zu den letalen Endpunkten werden z. B. die Koagulation des Embryos, eine ausbleibende Schwanzablösung und ein fehlender Herzschlag gezählt. Zu den subletalen Endpunkten (die Entwicklung betreffend) gehören bspw. die fehlende Ausbildung der Somiten, die Entwicklung der Augen, spontane Kontraktionen, eine reduzierte oder gesteigerte Herzschlagrate und Ödeme. Beispielhaft für teratogene Endpunkte (zu Fehlbildungen führend) sind bspw. die Verformung des Kopfes, des Schwanzes und des Herzens, Dottersackdeformationen sowie die Retardierung des Wachstums.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen JMP11.1 und Excel durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Tests:

- Pearson D'Agostino Omnibus Test
- Levene-Test/nicht-parametrischer Levene-Test
- Anova + Tukey HSD (honest significant difference) Test
- Krusal-Wallis + Steel-Dwass Test
- Cox Regression

3. Ergebnisse

Der Embryotest mit den Zu- und Ablaufproben der KA Tübingen wurde in drei unabhängigen Testdurchläufen durchgeführt um eventuell auftretende Ergebnisverfälschungen durch externe Faktoren ausschließen zu können.

3.1 Ergebnisse der Herzschlagraten

Bei der Untersuchung der Herzschlagraten konnten in allen der durchgeführten Testdurchläufe signifikante Unterschiede zwischen den Herzschlagraten der Kontrolltiere und denen der gegenüber den Zu- und Ablaufproben exponierten Tiere festgestellt werden. Bis auf wenige Ausnahmen waren bei allen Tieren, die gegenüber den Zulaufproben exponiert wurden, leichte bis deutlich reduzierte Herzschlagraten zu erkennen. Dies trifft vor allem auf die Expositionen ZU1, ZU4, ZU5, ZU6 und ZU7 zu. Die Herzschlagraten der in den Ablaufproben exponierten Fischembryonen vielen meist höher aus,

jedoch lagen diese häufig ebenfalls unter denen der Kontrolltiere. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in der Tabelle 3 festgehalten.

Testdurchlauf 1

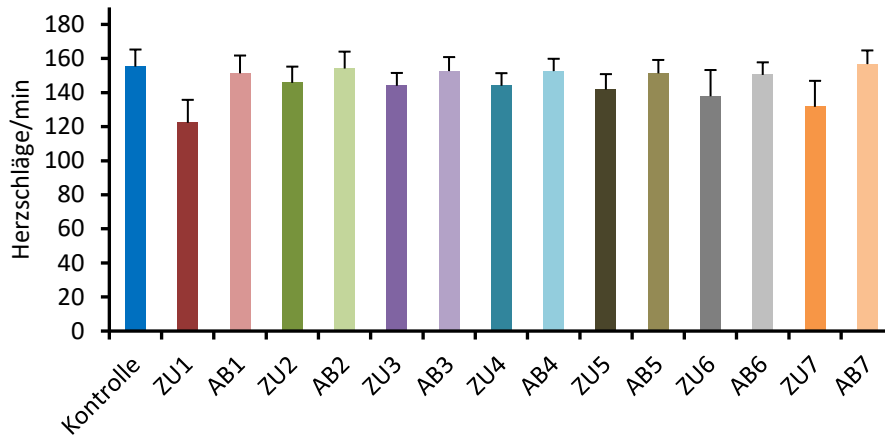


Abbildung 1: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 1; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 3 festgehalten

Testdurchlauf 2

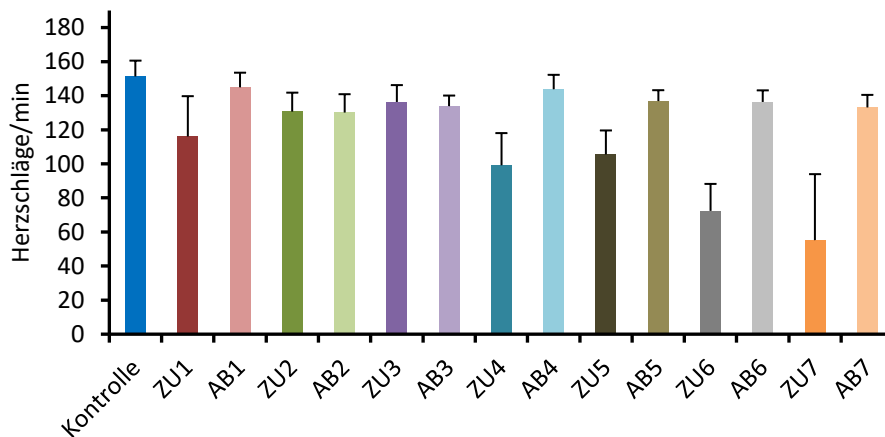


Abbildung 2: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 2; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 3 festgehalten

Testdurchlauf 3

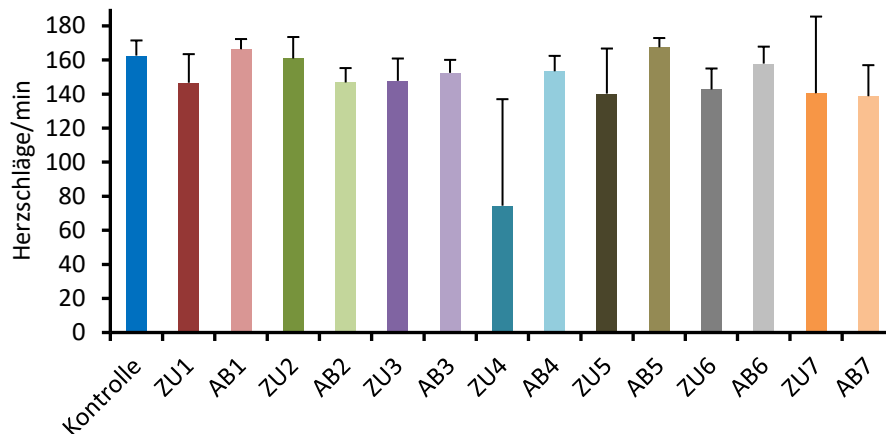


Abbildung 3: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 3; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 3 festgehalten

Tabelle 3: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Herzschlagraten. Rot markierte Werte zeigen signifikante Unterschiede an

Vergleich		p-Wert		
		Testdurchlauf 1	Testdurchlauf 2	Testdurchlauf 3
Kontrolle	ZU1	<0,0001	0,0076	0,1386
AB1	ZU1	0,0001	0,0269	0,0348
Kontrolle	AB1	0,7720	0,3284	0,8811
Kontrolle	ZU2	0,1504	0,0019	0,9410
AB2	ZU2	0,2220	0,9936	0,0294
Kontrolle	AB2	0,9715	0,0015	0,0142
Kontrolle	ZU3	0,0422	0,0060	0,0213
AB3	ZU3	0,1380	0,8392	0,6312
Kontrolle	AB3	0,8177	0,0016	0,1377
Kontrolle	ZU4	0,0337	<0,0001	0,0025
AB4	ZU4	0,1189	<0,0001	0,0031
Kontrolle	AB4	0,8042	0,3361	0,0990
Kontrolle	ZU5	0,0182	<0,0001	0,0604
AB5	ZU5	0,1096	<0,0001	0,0126
Kontrolle	AB5	0,6626	0,0288	0,6753
Kontrolle	AB6	0,7070	0,0378	0,6494
ZU6	AB6	0,2284	<0,0001	0,0224
ZU6	Kontrolle	0,0609	<0,0001	0,0029
Kontrolle	AB7	0,9461	0,0090	0,0143
ZU7	Kontrolle	0,0038	0,0027	0,1214
ZU7	AB7	0,0031	0,0027	0,1535

3.2 Mortalität

Während der Durchführung der Testdurchläufe traten vor allem bei den in den Zulaufproben exponierten Tieren leicht bis deutlich erhöhte Mortalitätsraten auf. Die höchsten Mortalitätsraten waren in den Expositionen ZU1, ZU5, ZU6 und ZU7 zu beobachten. Eine Ausnahme bildeten hier die Embryonen aus den Zulaufproben des zweiten und dritten Probenahmetages (ZU2 und ZU3), bei denen in allen Testdurchläufen nur wenige oder keine Mortalitäten festzustellen waren. Bei den Zebraabärlingsembryonen, die gegenüber den Ablaufproben exponiert wurden, konnten in nahezu allen Testdurchläufen nur geringe Mortalitätsraten zwischen 0 und 3,13 % beobachtet werden, wobei hier zu erwähnen ist, dass eine Mortalitätsrate von drei Prozent dem Tod von einem Tier entspricht. Einzige Ausnahme bildete die Exposition AB6, bei der es im dritten Testdurchlauf zum Tod von drei (9,38 %) Fischembryonen kam.

Weiterhin bleibt zu erwähnen, dass die in den Zulaufproben exponierten Tiere bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens eine normale Entwicklung und nur selten Fehlbildungen (schwach ausgeprägte Ödeme und Wirbelsäulendeformationen) aufzeigten. Nach erfolgten Schlupf stiegen die Mortalitäten in den Zulaufproben ZU1, ZU4, ZU5, ZU6 und ZU7 stark an. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

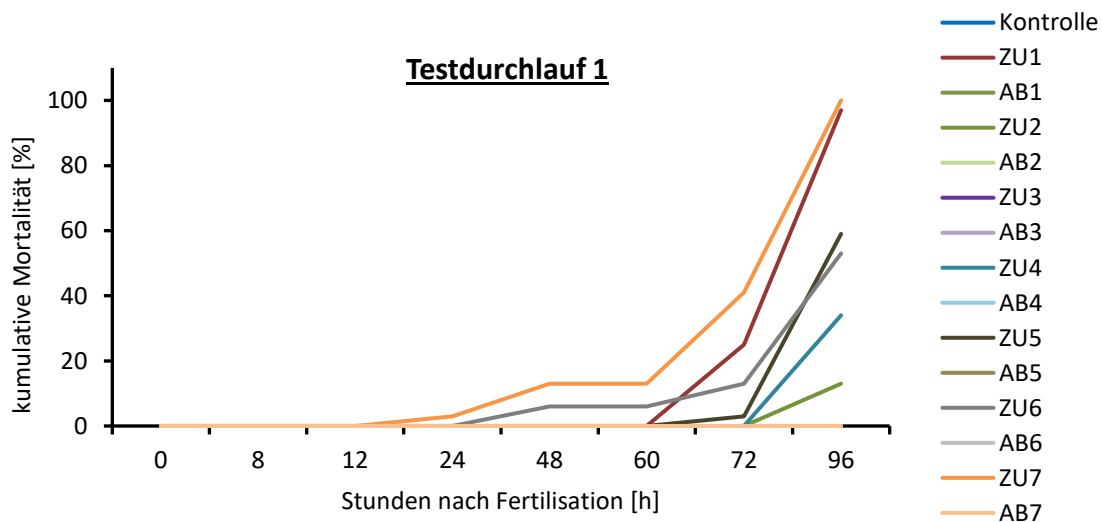


Abbildung 4: Mortalität der Zebraabärlingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 4 festgehalten

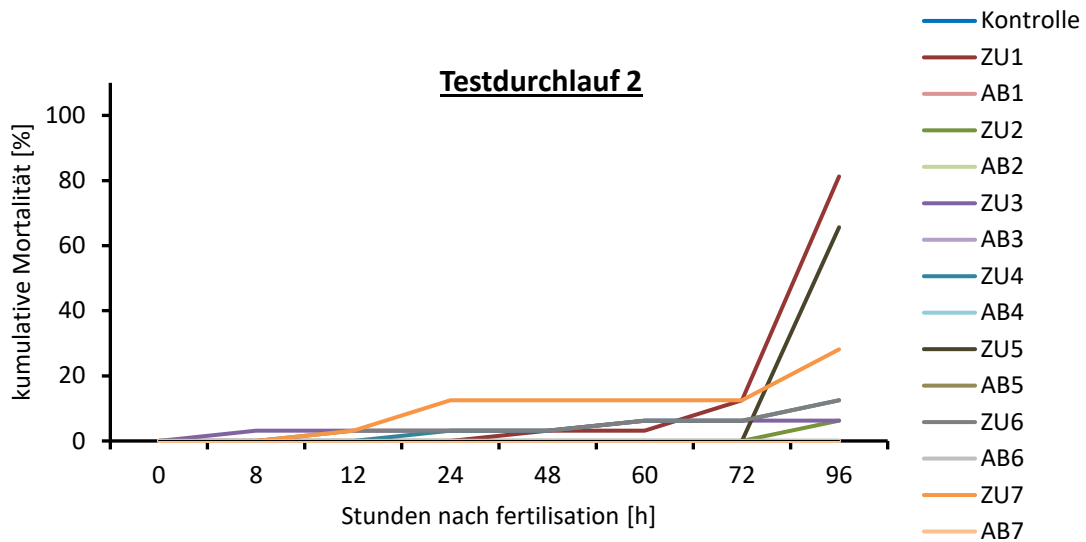


Abbildung 5: Mortalität der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 4 festgehalten

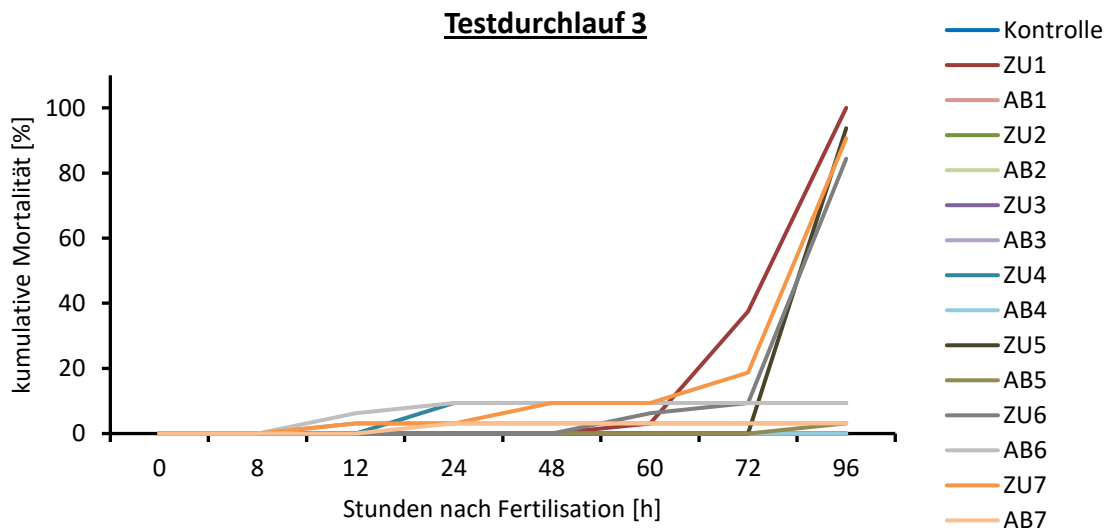


Abbildung 6: Mortalität der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 4 festgehalten

Tabelle 4: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Mortalitätsdaten. Rot markierte Werte zeigen signifikante Unterschiede an

Vergleich		p-Werte		
		Testdurchlauf 1	Testdurchlauf 2	Testdurchlauf 3
Kontrolle	AB1	1	1	1
ZU1	AB1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ZU1	Kontrolle	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Kontrolle	AB2	1	1	1
ZU2	AB2	0,0185	0,0959	1
ZU2	Kontrolle	0,0185	0,0959	1
Kontrolle	AB3	1	1	0,2390
ZU3	AB3	1	0,094	0,2390
ZU3	Kontrolle	1	0,094	0,9995
Kontrolle	AB4	1	1	1
ZU4	AB4	< 0,0001	0,0169	0,0414
ZU4	Kontrolle	< 0,0001	0,0169	0,0414
Kontrolle	AB5	1	1	0,2390
ZU5	AB5	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ZU5	Kontrolle	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Kontrolle	AB6	1	1	0,0351
ZU6	AB6	< 0,0001	0,0169	< 0,0001
ZU6	Kontrolle	< 0,0001	0,0169	< 0,0001
Kontrolle	AB 7	1	1	0,2340
ZU7	AB 7	< 0,0001	0,0003	< 0,0001
ZU7	Kontrolle	< 0,0001	0,0003	< 0,0001

3.3 Schlupfrate

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus der Auswertung der Schlupfraten dargestellt. Die Angaben beziehen sich dabei auf die Schlupfraten der noch lebenden Tiere. Während der Durchführung der Tests war eine deutliche Reduktion der Schlupfrate bei den in den Zulaufproben exponierten Tieren zu beobachten. Embryonen, die gegenüber den Ablaufproben der Kläranlage Tübingen exponiert wurden, zeigten Schlupfraten zwischen 97 und 100 %. Eine statistische Auswertung der Schlupfrate war aufgrund der stark schwankenden Anzahl an Individuen zwischen den Zu- und Ablaufproben (bedingt durch hohe Mortalitätsraten) nicht möglich. In diesem Fall stellt die zum Teil hohe Mortalitätsrate ohnehin den aussagekräftigeren Endpunkt dar.

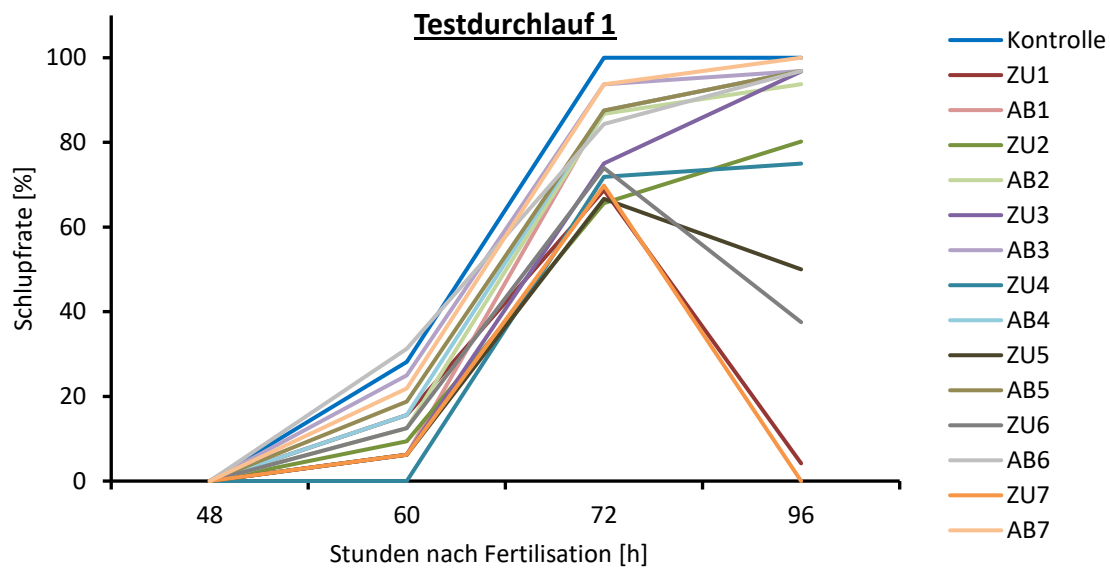


Abbildung 7: Schlupfrate der Zebraärlingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1

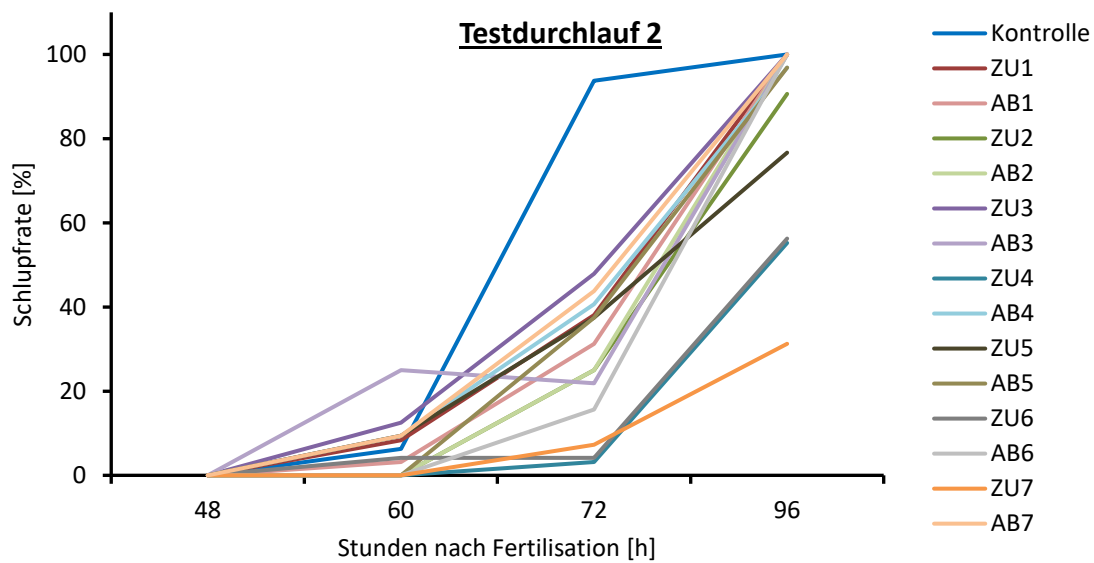


Abbildung 8: Schlupfrate der Zebraärlingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2

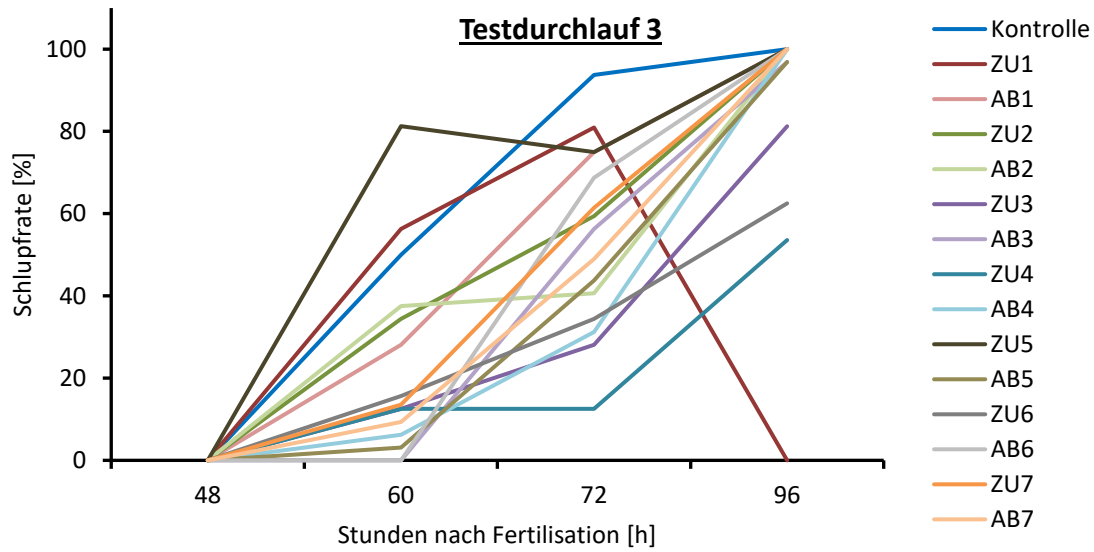


Abbildung 9: Schlupfrate der Zebraabrlingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3

3.4 Entwicklungsverzögerungen

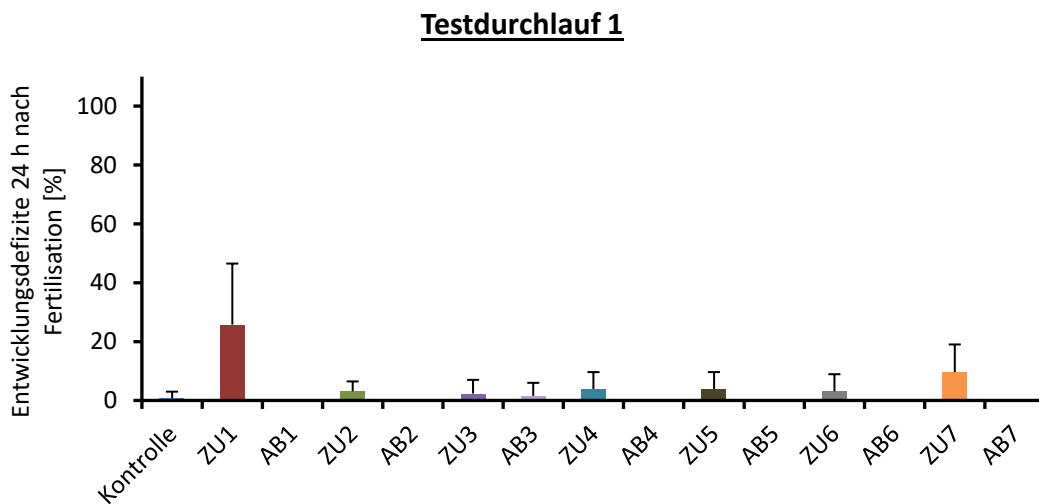


Abbildung 10: Rate der Entwicklungsverzögerungen (24 Stunden nach Befruchtung der Zebraabrlingseier) während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1

Testdurchlauf 2

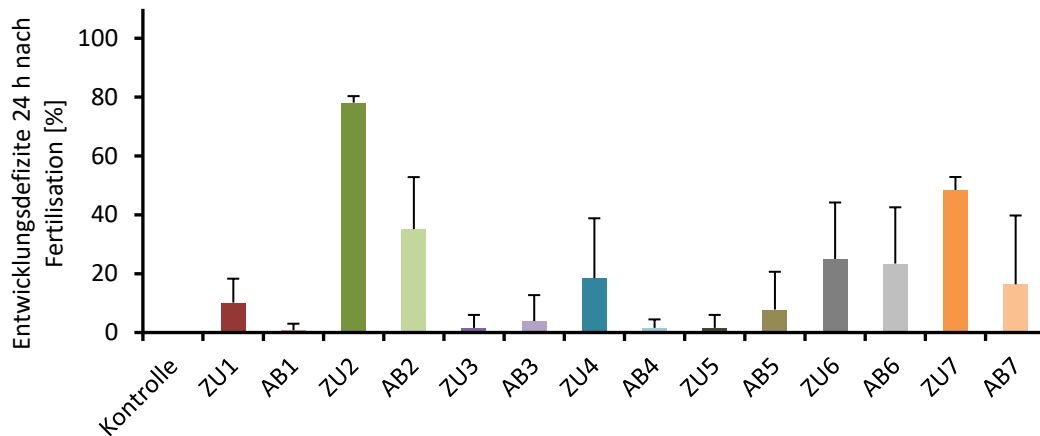


Abbildung 11: Rate der Entwicklungsverzögerungen (24 Stunden nach Befruchtung der Zebraäbrblingseier) während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2

Testdurchlauf 3

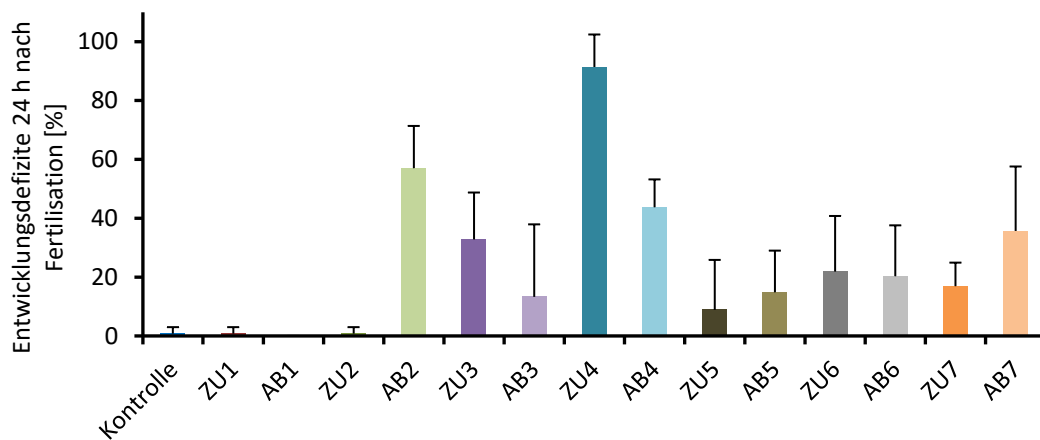


Abbildung 12: Rate der Entwicklungsverzögerungen (24 Stunden nach Befruchtung der Zebraäbrblingseier) während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3

3. 5 Fehlbildungen

Im Folgenden sind die Fehlbildungsraten aus den drei durchgeführten Testdurchläufen graphisch dargestellt. Es wurden nur die Fehlbildungen der überlebenden Tiere gewertet. Bei Betrachtung der Graphen wird deutlich, dass die in den Zulaufproben exponierten Tiere höhere Fehlbildungsraten

aufwiesen als die Tiere, die gegenüber den Ablaufproben exponiert wurden. Zu den am häufigsten beobachteten Fehlbildungen gehörten Ödeme (siehe Abb. 13) und Wirbelsäulendeformationen, welche als schwerwiegende Fehlbildungen anzusehen sind. Fehlbildungen, die bei Tieren aus den Ablaufproben verzeichnet werden konnten, äußerten sich meist in Form schwacher Ödeme. Da es während der Testdurchläufe in den Zulaufproben zu erhöhten Mortalitäten kam, war eine sinnvolle statistische Auswertung der Fehlbildungsraten aufgrund der stark schwankenden Anzahl an Individuen zwischen den Zu- und Ablaufproben nicht möglich. In diesem Fall stellt die zum Teil hohe Mortalitätsrate den aussagekräftigeren Endpunkt dar.

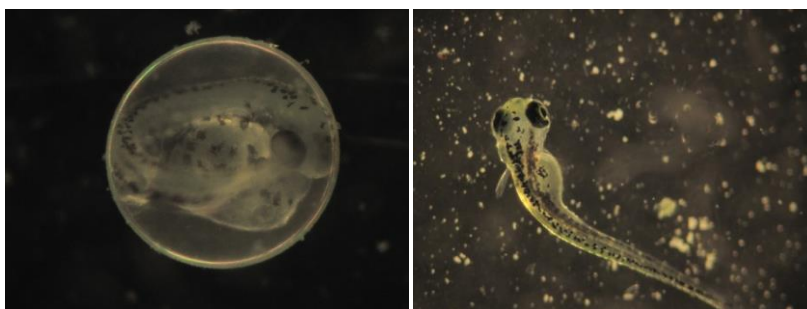


Abbildung 13: links, Zebraabrlingsembryo mit Dottersacködem (s. Pfeil); rechts Fischembryo mit Wirbelsäulendeformation

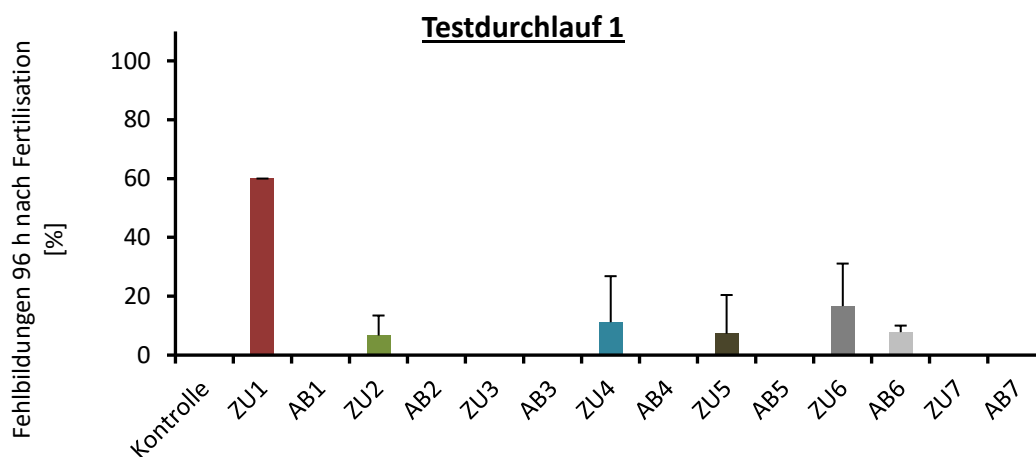


Abbildung 14: Fehlbildungsrate der exponierten Zebraabrlingsembryonen nach 96 h Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1

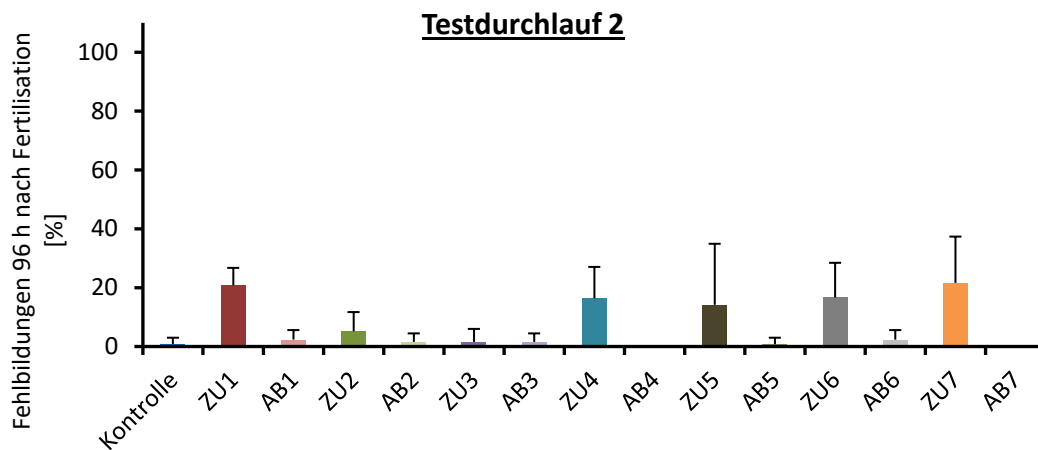


Abbildung 15: Fehlbildungsrate der exponierten Zebraäbrblingsembryonen nach 96 h Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2

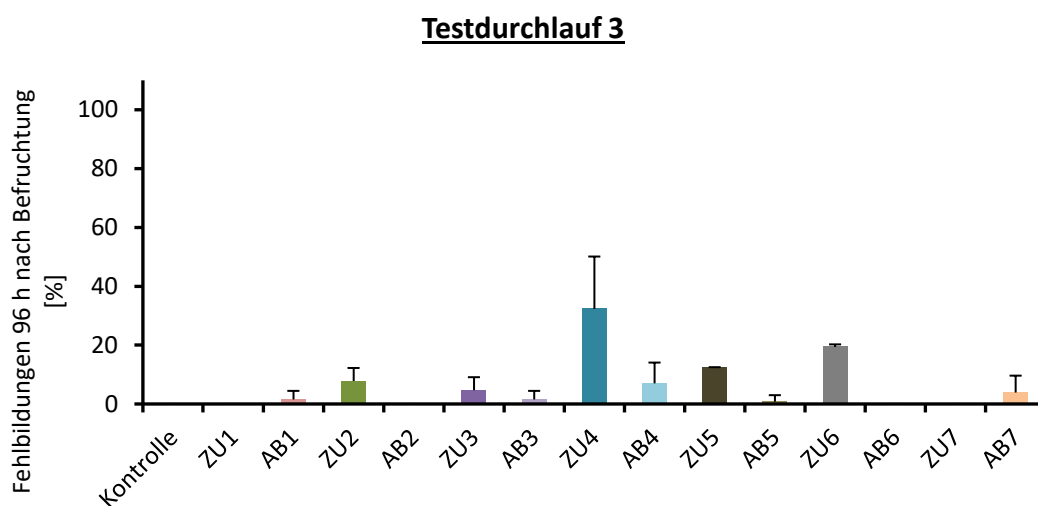


Abbildung 16: Fehlbildungsrate der exponierten Zebraäbrblingsembryonen nach 96 h Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Tübingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Ergebnisse aller drei durchgeführten Testdurchläufe zusammengefasst. Zur einfacheren Interpretation der Ergebnisse wird hier die Stärke der Reaktionen der Fischembryonen anhand von Symbolen wiedergegeben. Die Tabelle 5 verdeutlicht, dass die meisten Reaktionen in den Zulaufproben der Probenahmetage 1, 4, 5, 6, und 7 zu beobachten waren. In den Expositionen ZU2 und ZU3 sowie in allen Ablaufproben konnten nur schwache oder keine Reaktionen festgestellt werden.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse; +++ = starke Reaktion, ++ = mittlere Reaktion, + = schwache Reaktion, - = keine Reaktion

Exposition	Endpunkt			
	Reduktion der Herzfrequenz	Erhöhte Mortalität	Reduktion der Schlupfrate	Erhöhte Fehlbildungsrate
Kontrolle	Referenz	-	-	-
ZU1	++	+++	+++	+++
AB1	+/-	-	-	+
ZU2	+	+	+	+
AB2	++	-	-	-
ZU3	+	+	+/-	+
AB3	+	-	-	+
ZU4	+++	++	++	++
AB4	+	-	-	+
ZU5	++	+++	++	++
AB5	+	-	-	-
ZU6	++	+++	++	++
AB6	+	+	-	+
ZU7	++	+++	+++	++
AB7	+	-	-	+

4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine gute Abwasserreinigung sowie eine insgesamt effektive Reduktion der embryotoxischen Potentiale in den Abwässern hin. Das gereinigte Abwasser der Kläranlage Tübingen lässt sich anhand des Embryotests mit dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) als weitestgehend ungefährlich, jedoch nicht als vollkommen unbedenklich einstufen. Ein Großteil der Effekte, die bei den in den Ablaufproben exponierten Tieren zu beobachten waren, können auch z. T. im Rahmen der biologischen Variabilität auftreten, sodass man hier nicht eindeutig von einem Schädigungspotential ausgehen kann. Jedoch deuten die leicht reduzierten Herzschlagraten auf eine Beeinträchtigung des Kreislaufsystems durch eventuell vorhandene Schadstoffe in den gereinigten

Abwasserproben hin. Eine Reduktion der Herzschlagrate steht häufig im Zusammenhang mit der Wirkung chemischer Stressoren. Im Zuge von energiezehrenden Entgiftungsvorgängen wird die Metabolismusrate gesenkt, um ausreichend Energie zur Entgiftung bereitzuhalten (Strmac et al., 2002). Durch die Senkung der Metabolismusrate kann es dann schließlich auch zur Reduktion der Herzschlagrate kommen.

An zweiter Stelle soll hier noch einmal im Detail auf die Beschaffenheit der Zulaufproben eingegangen werden. Auffallend war, dass alle Zulaufproben insgesamt einen relativ sauberen Eindruck machten. Bezüglich der Trübung war zu den Ablaufproben mit dem bloßen Auge kein Unterschied erkennbar. Lediglich kleinere und zum Teil mittelgroße organische Partikel unterschieden die Zulauf- von den Ablaufproben. Diese Tatsache lässt auf eine hervorragende mechanische Vorklärung schließen. Dennoch konnten bei den in den Zulaufproben exponierten Tieren zum Teil starke Effekte beobachtet werden, die nicht eindeutig auf eine organische Belastung und eine damit verbundene Sauerstoffzehrung zurückzuführen sind, da eine Zehrung des Sauerstoffs im Normalfall zu einer starken Entwicklungsverzögerung der exponierten Tiere führt. Da die Embryonen jedoch bis zum Zeitpunkt des Schlüpfens eine normale Entwicklung und erst ab dem Verlassen der Eihülle erhöhte Fehlbildungs- und Mortalitätsraten aufzeigten, sind die beobachteten Effekte wahrscheinlich eher auf andere Stressoren (Arzneimittelrückstände, diverse Metaboliten etc.) zurückzuführen. Die Feststellung, dass in den Ablaufproben nur noch geringe Effekte zu beobachten waren, unterstreicht die Effizienz der Kläranlage Tübingen ebenfalls.

Obwohl die Fischembryonen aus den Expositionen ZU1, ZU4, ZU5, ZU6 und ZU7 deutliche Reaktionen zeigten und dadurch das Gefahrenpotential ungereinigten Abwassers verdeutlichten, konnten in den Expositionen ZU2 und ZU3 nur vergleichsweise schwache Effekte beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die Regenfälle sein (siehe Tabelle 2), die während des zweiten und dritten Probenahmetages stattgefunden haben. Der Eintrag von Regenwasser in das Kanalisationsnetz führt häufig zur Verdünnung des Abwassers, mit der auch eine Verdünnung der Konzentrationen an schädlichen Komponenten einhergeht. Weiterhin wird bei der Betrachtung der Mortalitätsraten (Abb. 4, 5, 6) deutlich, dass die höchsten Raten in den Expositionen ZU1, ZU5, ZU6 und ZU7 erreicht wurden, während in der Exposition ZU4 deutlich niedrigere Mortalitätsraten zu verzeichnen waren. Eine Erklärung hierfür könnte die Entleerung der Regenüberlaufbecken sein, die nach dem Rückgang der Niederschläge in der Regel ebenfalls entleert werden. Das Mischwasser aus den Regenentlastungssystemen könnte wie bei den Probenahmetagen 2 und 3 zu einer leichten Verdünnung der kommunalen Abwässer am Probenahmetag 4 geführt haben, was sich wiederum in den vergleichsweise schwachen Effekten in der Exposition ZU4 widerspiegelte.

5. Zusammenfassung

Die Untersuchung der Abwasserproben aus der Kläranlage Tübingen lässt sich insgesamt als positiv zusammenfassen. Anhand des Embryotests mit dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) lässt sich die Reinigungsleistung als gut beschreiben, da eine deutliche Reduktion der Effekte in den Abwässern beobachtet werden konnte, jedoch immer noch leichte Effekte bzw. Reaktion festzustellen waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Regenereignisse zu einer Reduktion der embryotoxischen Potentiale in den Abwässern führen, welche höchstwahrscheinlich auf eine Verdünnung des Abwassers durch Regenwasser zurückzuführen ist.

Zum Schluss bleibt zu erwähnen, dass der Test keinerlei Informationen über eventuell auftretende Auswirkungen auf zellulärer oder enzymatischer Ebene liefert. Um ein umfassendes Bild über das Schädigungspotential gereinigter Abwasserproben zu bekommen, ist es notwendig, Biomarkertests auf unterschiedlichen biologischen Ebenen anzuwenden. Des Weiteren bleibt die Frage der Langzeitwirkung ungeklärt. Eine Langzeitexposition von Versuchstieren gegenüber Abwasserproben könnte eventuell zu anderen oder deutlicheren Ergebnissen führen. Auch sollte eine weitere Analysekampagne zu einer anderen Jahreszeit in Betracht gezogen werden, da bspw. in den Wintermonaten andere Bedingungen (weniger Niederschlag) herrschen als im Sommer. Hier könnten sich erhöhte Gehalte an Salz und Arzneimittelrückständen (bedingt durch höhere Erkrankungsraten) zusätzlich negativ auf die Entwicklung bzw. auf den Gesundheitszustand exponierter Tiere auswirken.

6. Literatur

Nagel, R. (2002) DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model, *Ecotoxicology and Toxicology*. ALTEX 19, Suppl 1

OECD 210 (1992) OECD Guideline for testing of chemicals: Test Guideline 210: Fish, Early- Life Stage Toxicity Test. Zugegriffen am 22.02.2014 von: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948269.pdf>

Strmac, M., Oberemm, A. & Braunbeck, T. (2002) Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology*, 61, 24-38

Kapitel 1.2: Untersuchungen der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen mithilfe des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

unveröffentlichter Abschlussbericht an Jedele und Partner GmbH; 2015

Thellmann, P. und Triebkorn, R.

1. Einleitung

Zur Untersuchung der Reinigungseffizienz der KA Göppingen wurden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen Zulauf- sowie Ablaufproben analysiert. Die Untersuchung der Abwasserproben erfolgte mithilfe des Fischembryotests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*), der es ermöglicht, embryotoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben nachzuweisen, und dadurch das Gefahrenpotential der jeweiligen Proben abzuschätzen. Dies ist vor allem im Hinblick auf den Gesundheitszustand der Flora und Fauna des aufnehmenden Gewässers, in diesem Fall der Fils, von großer Relevanz. Der Vergleich zwischen Zu- und Ablaufproben eines jeden Probenahmetages dient hier zur Erfassung der Reduktion embryotoxischer Potentiale während der Abwasserreinigung in der KA Göppingen. Weiterhin sollen durch den Vergleich mehrerer Probenahmetage (und hiermit zusammenhängend auch mehrerer Proben) Schwankungen bezüglich der Reinigungseffizienz im Wochenverlauf erfasst werden.

2. Material und Methoden

2.1 Entnahme der Proben

An sieben aufeinanderfolgenden Tagen wurden Wasserproben aus dem Zulauf (Rohabwasser nach mechanischer Vorklärung) sowie aus dem Ablauf (nach Passage des Flockungsfilters) entnommen. Die Entnahme der Proben erfolgte hierbei durch Mitarbeiter der Kläranlage Göppingen. Die entnommenen Wasserproben wurden bis zum Transport in die Laboratorien der Abteilung "Physiologische Ökologie der Tiere" der Universität Tübingen in 1 L bzw. 2 L Braunglasflaschen (Schott Duran, Mainz, Deutschland) gekühlt aufbewahrt und bei Ankunft im Labor auf kleinere Braunglasflaschen (250 mL Braunglasflaschen; Schott Duran, Mainz, Deutschland) verteilt. Im Anschluss wurden die Wasserproben bei -25 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Zeitpunkte der Probenahmen sowie Informationen zur Codierung der Proben sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Vereinfachung werden für die Probestellen und -tage im Folgenden die Probencodes aus Tabelle 1 verwendet. Informationen über die Niederschlagsverhältnisse vor und während der Probenahmen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Alle untersuchten Zulaufproben zeichneten sich trotz mechanischer Vorklärung durch eine starke bräunliche Trübung und einen starken Fäkalgeruch aus. Dies war in den Ablaufproben nicht mehr der Fall, jedoch enthielten diese Proben einen deutlich erkennbaren Gehalt an Schwebstoffen.

Tabelle 1: Zeitpunkt der Probenahmen und Codierung der Proben

	Datum	Code Zulauf	Code Ablauf
Tag 1	14/15.04.2015	ZU1	AB1
Tag 2	15/16.04.2015	ZU2	AB2
Tag 3	16./17.05.2015	ZU3	AB3
Tag 4	17/18.04.2015	ZU4	AB4
Tag 5	18/19.04.2015	ZU5	AB5
Tag 6	19/20.04.2015	ZU6	AB6
Tag 7	20/21.04.2015	ZU7	AB7

Tabelle 2: Niederschlagsmengen zum Zeitpunkt der durchgeführten Probenahmen an der Kläranlage Göppingen; Daten stammen von der Wetterstation Geißlingen Stöten, abgerufen von: <http://www.wetteronline.de>

Datum	Niederschlagsmenge [mm]	Probenahmetage an der KA Tübingen
12.04.2015	0	-
13.04.2015	0	-
14.04.2015	0	
15.04.2015	0	Tag 1
16.04.2015	0	Tag 2
17.04.2015	6	Tag 3
18.04.2015	0	Tag 4
19.04.2015	0	Tag 5
20.04.2015	0	Tag 6
21.04.2015	0	Tag 7

2.2 Der Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

Mithilfe des Fischembryotests ist es möglich, entwicklungstoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben nachzuweisen. Anders als bei vielen anderen Labortests werden mit diesem Test mögliche Auswirkungen auf die frühen Entwicklungsstadien eines gesamten Organismus – in diesem Fall eines Fisches – erfasst. Der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführte Fischembryotest erfolgte in Anlehnung an den „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ (OECD Guideline 236, 2013) sowie an den von Nagel (2002) entwickelten Embryotest (DaT). Der hier angewandte Test wird als sogenannter „verlängerter Embryotest“ bezeichnet, da er anders als der Fischembryotest nach Nagel (2002) eine 96-stündige Expositionszeit der Embryonen vorsieht. Durch diese verlängerte Expositionszeit können Reaktionen miteinbezogen werden, die erst nach dem Schlupf der Tiere, also

ohne die protektive Wirkung der Eihülle, stattfinden. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden befruchtete Eier des Zebrafisch (*Danio rerio*) gegenüber den Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen exponiert. Einer der Vorteile dieses Tests ist, dass embryonale Stadien besonders sensibel auf die Einwirkung von Umweltproben und Schadstoffen reagieren können (Luckenbach et al., 2001; Scheil et al., 2010). Hierdurch können Aussagen zum Gefährdungspotential einzelner Schadstoffe bzw. im vorliegenden Fall Aussagen zum entwicklungstoxischen Potential von Abwasserproben gemacht werden. Während des Tests wurden zu definierten Zeitpunkten teratogene, subletale und letale Endpunkte sowie die Schlupfrate festgehalten. Zu den letalen Endpunkten werden z. B. die Koagulation des Embryos und ein fehlender Herzschlag gezählt (Tabelle 3). Zu den teratogenen Endpunkten (zu Fehlbildungen führend) gehören bspw. die Verformung des Kopfes, des Schwanzes und des Herzens, Dottersackdeformationen sowie die Retardierung des Wachstums (Tabelle 3).

Tabelle 3: Beobachtete Endpunkte im Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

Endpunkte	Stunden nach Befruchtung							
	8 h	12 h	24 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h
Koagulation (Mortalität)	X	X	X	X	X	X	X	X
Schlupfrate					X	X	X	X
Entwicklungsverzögerungen								
Epibolie	X							
Gastrulation		X						
Somitenbildung			X					
Schwanzablösung			X					
spontane Kontraktionen			X					
Augenbildung			X					
Herzschlagrate(Schläge/min)				X				
Otolithenbildung					X			
Melanozytenbildung					X			
Fehlbildungen								
Ödeme (an Herz/Dottersack)					X			
Fehlbildung der Augen					X	X	X	X
Schwanzdeformationen					X	X	X	X
Deformation der Wirbelsäule					X	X	X	X
schwache/fehlerhafte Pigmentierung					X	X	X	X

Die Exposition der befruchteten Eier erfolgte in kleinen Glaspetrischalen. Jede Probe wurde in drei unabhängigen Testdurchläufen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Vor Versuchsbeginn wurden die gefrorenen Wasserproben aufgetaut. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden für jede der untersuchten Probestellen acht Glaspetrischalen (30 mm Durchmesser, Schott Duran) mit dem jeweiligen Probenwasser über Nacht abgesättigt. Als Negativkontrolle dienten acht weitere Petrischalen, welche mit Kunstwasser (nach ISO 7346/3) befüllt wurden.

Unmittelbar vor Testbeginn wurden die Wasserproben durch frisches Probenmaterial ersetzt. Im Anschluss daran wurden die befruchteten Eier der Zebrabärblinge aus den Becken entnommen und in die Testgefäße überführt, wobei in jede Glaspetrischale vier befruchtete Eier überführt wurden. Folglich wurde der Test mit 32 Eiern pro Probe durchgeführt. Während des Experiments wurden die Eier bei 26 ± 1 °C im Wärmeschrank bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h Licht /12 h Dunkelheit gehältert. Die Beobachtung der Embryonalentwicklung sowie die Bestimmung der Endpunkte wurden an einem Binokular (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt und erfolgten zu definierten Zeitpunkten (siehe Tabelle 3).

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen JMP 11.1 und Excel durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Tests:

- Pearson D'Agostino Omnibus Test
- Levene-Test/nicht-parametrischer Levene-Test
- ANOVA, ggf. mit anschließendem Tukey HSD (honest significant difference) Test
- Wilcoxon Test, ggf. mit anschließenden Steel-Dwass Test
- Cox Regression
- Likelihood-Ratio Test, ggf. mit anschließendem Fishers Exact Test

3. Ergebnisse

Der Fischembryotest mit den Zu- und Ablaufproben der KA Göppingen wurde in drei unabhängigen Testdurchläufen durchgeführt, um eventuell auftretende Ergebnisverfälschungen durch externe Faktoren, wie bspw. Kontaminationen der Testgefäße, ausschließen zu können.

3.1 Ergebnisse der Herzschlagraten

Bei der Untersuchung der Herzschlagraten konnten in zwei der drei durchgeführten Testdurchläufe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den gegenüber den Ablaufproben exponierten Tieren nachgewiesen werden. Exemplarisch wird hierfür die Abbildung 1 gezeigt. Die restlichen Abbildungen sind dem Anhang zu entnehmen. Bei den Tieren, die gegenüber den Zulaufproben exponiert wurden, konnten meist keine Herzschlagmessungen durchgeführt werden, da die Mortalitäten zum Zeitpunkt der Messung bereits sehr hoch waren. Eine statistische Auswertung der Herzschlagraten der überlebenden Tiere in den Zulaufproben war aufgrund der geringen Stichprobengröße, bedingt durch die hohe Mortalität, nicht sinnvoll. In diesem Fall stellt die Mortalität ohnehin den aussagekräftigeren Endpunkt dar. Im dritten Testdurchlauf zeigten die Tiere der Expositionen AB4, AB6 und AB7 deutlich reduzierte Herzschlagraten, welche sich stark von den

anderen Testdurchläufen unterscheiden. Da hierbei von Artefakten auszugehen ist, wurden die Daten dieser drei Gruppen bei der Auswertung des dritten Testdurchlaufs nicht mit einbezogen. Eine mögliche Erklärung für diese stark abweichenden Werte wird in der Diskussion gegeben. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in der Tabelle 4 festgehalten.

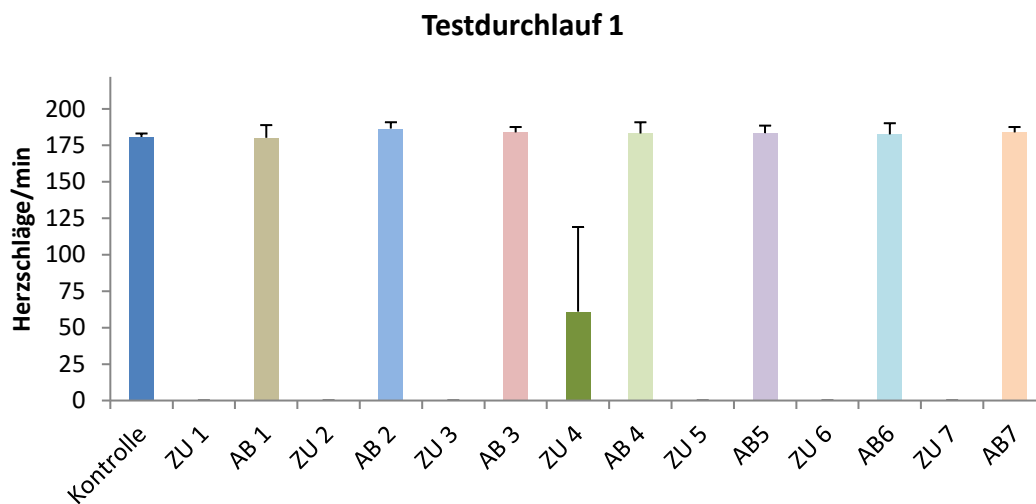


Abbildung 1: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 1; die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 4 festgehalten

Tabelle 4: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Herzschlagraten. Rot markierte Werte zeigen signifikante Unterschiede an; ein X deutet darauf hin, dass hier aufgrund von stark abweichenden Daten keine Statistik durchgeführt wurde

Vergleich		p-Wert		
		Testdurchlauf 1	Testdurchlauf 2	Testdurchlauf 3
Kontrolle	AB1	1	0,7803	0,9788
Kontrolle	AB2	0,2643	0,949	0,7151
Kontrolle	AB3	0,9132	0,9751	0,9931
Kontrolle	AB4	0,9299	0,9999	x
Kontrolle	AB5	0,9456	1	0,8764
Kontrolle	AB6	0,9766	0,9162	X
Kontrolle	AB7	0,9139	0,9995	X
AB1	AB2	0,3565	0,1546	0,9564
AB1	AB3	0,9597	0,2059	0,9999
AB1	AB4	0,9693	0,5138	X
AB1	AB5	0,9779	0,56	0,9954
AB1	AB6	0,9926	0,1199	X
AB1	AB7	0,9601	0,4534	X
AB2	AB3	0,9435	1	0,9156
AB2	AB4	0,929	0,9966	X
AB2	AB5	0,9103	0,9939	0,9977
AB2	AB6	0,8431	1	X
AB2	AB7	0,943	0,9986	X
AB3	AB4	1	0,9992	X
AB3	AB5	1	0,9983	0,9841
AB3	AB6	1	1	X
AB3	AB7	1	0,9998	X
AB4	AB5	1	1	X
AB4	AB6	1	0,9913	X
AB4	AB7	1	1	X
AB5	AB6	1	0,9859	X
AB5	AB7	1	1	X
AB 6	AB 7	1	0,9959	X

3.2 Mortalität

Bei allen drei durchgeführten Testdurchläufen konnten bei den in den Zulaufproben exponierten Tieren sehr hohe Mortalitätsraten beobachtet werden. Meist waren bereits 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach Befruchtung alle Tiere koaguliert. Die einzige Ausnahme bildete hierbei die Gruppe ZU4, bei der die Tiere erst einige Zeit später starben.

Die Zebrabärblingsembryonen, die gegenüber den Ablaufproben exponiert wurden, zeigten in nahezu allen Testdurchläufen nur geringe Mortalitätsraten zwischen 0 und 9,38 %. In der statistischen Auswertung konnten in den Testdurchläufen 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die einzige Ausnahme bildeten die Expositionen AB4 und AB7 im dritten Testdurchlauf, bei

denen eine im Vergleich zu den anderen Testdurchläufen extrem erhöhte Mortalitätsrate von 87,5 % bzw. 9,38 % erreicht wurde (siehe Anhang, Abbildung 8). Exemplarisch wird im Folgenden nur eine Graphik des ersten Testdurchlaufs gezeigt (Abbildung 2). Die hier fehlenden Graphen sind dem Anhang zu entnehmen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

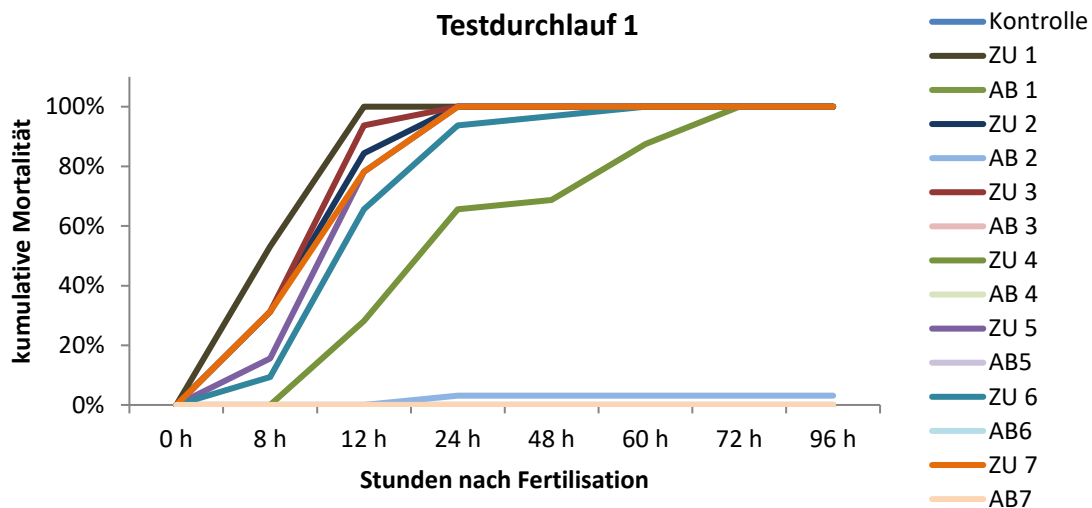


Abbildung 2: Mortalität der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 5 festgehalten

Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Mortalitätsdaten. Rot markierte Werte zeigen signifikante Unterschiede an

Vergleich		p-Werte		
		Testdurchlauf 1	Testdurchlauf 2	Testdurchlauf 3
Kontrolle	AB1	1	1	1
Kontrolle	AB2	0,2351	1	0,0895
Kontrolle	AB3	1	1	1
Kontrolle	AB4	1	1	<,0001
Kontrolle	AB5	1	1	1
Kontrolle	AB6	1	1	0,2361
Kontrolle	AB7	1	1	0,0403
AB1	AB2	0,2354	1	0,0895
AB1	AB3	1	1	1
AB1	AB4	1	1	<,0001
AB1	AB5	1	1	1
AB1	AB6	1	1	0,2364
AB1	AB7	1	1	0,0403
AB2	AB3	0,2354	1	0,0895
AB2	AB4	0,2354	1	<,0001

AB2	AB5	0,2354	1	0,0895
AB2	AB6	0,2354	1	0,5374
AB2	AB7	0,2354	1	0,6862
AB3	AB4	1	1	<,0001
AB3	AB5	1	1	1
AB3	AB6	1	1	0,2364
AB3	AB7	1	1	0,0403
AB4	AB5	1	1	<,0001
AB4	AB6	1	1	<,0001
AB4	AB7	1	1	<,0001
AB5	AB6	1	1	0,2364
AB5	AB7	1	1	0,0403
AB 6	AB 7	1	1	0,3067
Kontrolle	ZU1	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU2	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU3	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU4	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU5	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU6	<,0001	<,0001	<,0001
Kontrolle	ZU7	<,0001	<,0001	<,0001
ZU1	ZU2	0,0734	0,1509	0,8
ZU1	ZU3	0,1876	0,2016	0,267
ZU1	ZU4	<,0001	0,0007	<,0001
ZU1	ZU5	0,0128	0,0607	0,267
ZU1	ZU6	0,0008	0,0979	0,0495
ZU1	ZU7	0,0386	0,0394	0,0298
ZU2	ZU3	0,6236	0,8722	0,3849
ZU2	ZU4	0,0001	<,0001	<,0001
ZU2	ZU5	0,4659	0,6513	0,3849
ZU2	ZU6	0,0958	0,8022	0,0827
ZU2	ZU7	0,7663	0,5222	0,0513
ZU3	ZU4	<,0001	<,0001	<,0001
ZU3	ZU5	0,2248	0,5401	1
ZU3	ZU6	0,0334	0,682	0,3686
ZU3	ZU7	0,4332	0,4235	0,2613
ZU4	ZU5	0,0013	<,0001	<,0001
ZU4	ZU6	0,0167	<,0001	<,0001
ZU4	ZU7	0,0003	<,0001	<,0001
ZU5	ZU6	0,3414	0,8437	0,3686
ZU5	ZU7	0,6655	0,8508	0,2613
ZU6	ZU7	0,1683	0,7014	0,8196
AB1	ZU1	<,0001	<,0001	<,0001
AB2	ZU2	<,0001	<,0001	<,0001
AB3	ZU3	<,0001	<,0001	<,0001
AB4	ZU4	<,0001	<,0001	0,6177
AB5	ZU5	<,0001	<,0001	<,0001
AB6	ZU6	<,0001	<,0001	<,0001
AB7	ZU7	<,0001	<,0001	<,0001

3.3 Schlupfrate

Für die Bestimmung der Schlupfrate wurden lediglich die überlebenden Tiere betrachtet. Bei den in den Zulaufproben exponierten Tieren konnte, bedingt durch die hohen Mortalitäten, bis auf eine Ausnahme kein Schlupf beobachtet werden. Eine statistische Auswertung der Schlupfrate dieser Tiere war deshalb nicht möglich.

Während der Durchführung der Tests konnten bei den in den Ablaufproben exponierten Tieren leichte bis zum Teil deutliche Reduktionen der Schlupfraten beobachtet werden. Statistisch konnten zwischen der Kontrolle und einigen Testgruppen signifikante Unterschiede ermittelt werden, welche der Tabelle 6 zu entnehmen sind. Besonders Tiere, die gegenüber den Ablaufproben der Probenahmetage 2 und 3 exponiert waren, zeigten im Mittel die stärksten Reaktionen. Im dritten Testdurchlauf zeigten die Gruppen AB4, AB6 und AB7 wieder stark reduzierte Schlupfraten (Abbildung 3). Eine mögliche Erklärung hierfür wird in der Diskussion gegeben. Für die Darstellung der Schlupfraten werden exemplarisch die Ergebnisse aus dem ersten Testdurchlauf gezeigt. Die Graphen aus den anderen Testdurchläufen sind dem Anhang zu entnehmen.

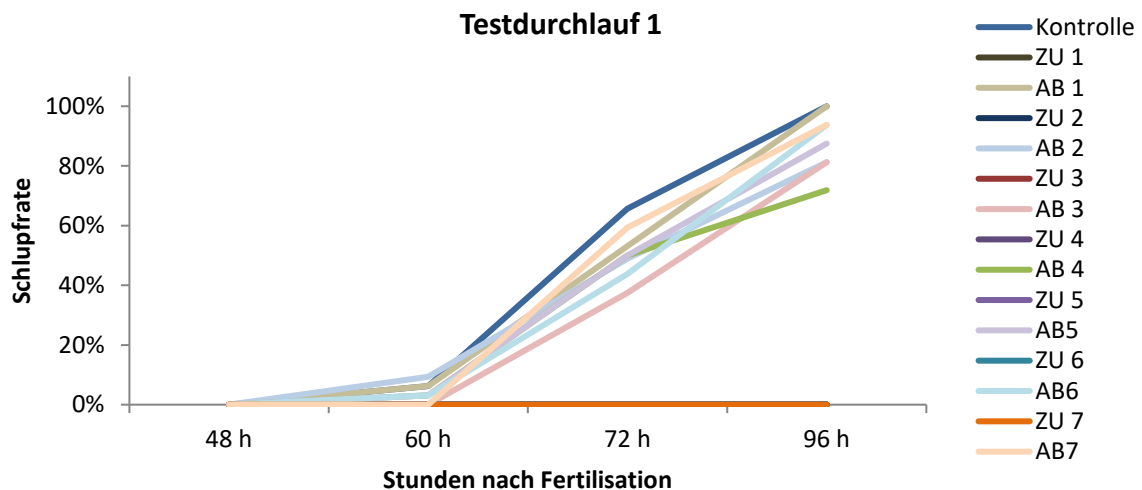


Abbildung 3: Schlupfrate der Zebraäbrüblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1

Tabelle 6: Ergebnisse der statistischen Auswertung der Schlupfraten. Rot markierte Werte zeigen signifikante Unterschiede an.

Vergleich		p-Werte		
		Testdurchlauf 1	Testdurchlauf 2	Testdurchlauf 3
Kontrolle	AB1	0,2075	0,0504	0,3692
Kontrolle	AB2	0,1625	0,0412	0,4869
Kontrolle	AB3	0,082	0,0282	0,4753
Kontrolle	AB4	0,0875	0,4168	0,0344
Kontrolle	AB5	0,5945	0,3917	0,5887
Kontrolle	AB6	0,3255	0,0514	0,0006
Kontrolle	AB7	0,6034	0,0477	0,2053
AB1	AB2	0,8975	0,9226	0,1236
AB1	AB3	0,6602	0,7831	0,8666
AB1	AB4	0,6567	0,239	0,0845
AB1	AB5	0,448	0,257	0,715
AB1	AB6	0,7536	0,9849	0,0102
AB1	AB7	0,4524	0,9636	0,668
AB2	AB3	0,7566	0,8598	0,1745
AB2	AB4	0,7503	0,2065	0,016
AB2	AB5	0,3702	0,2214	0,2267
AB2	AB6	0,6535	0,9382	<,0001
AB2	AB7	0,3757	0,9588	0,0638
AB3	AB4	0,9858	0,1505	0,073
AB3	AB5	0,2167	0,1641	0,85
AB3	AB6	0,4364	0,7991	0,0072
AB3	AB7	0,2231	0,8181	0,5625
AB4	AB5	0,2239	0,9687	0,0594
AB4	AB6	0,4399	0,2363	0,5747
AB4	AB7	0,2296	0,223	0,132
AB5	AB6	0,6453	0,2547	0,0033
AB5	AB7	0,9962	0,242	0,668
AB 6	AB 7	0,6477	0,979	0,045

3.4 Fehlbildungen

Auch Fehlbildungen wurden nur an den überlebenden Tieren ausgewertet bzw. in die Statistik einbezogen. Da die Auswertung der Fehlbildungsraten erst 96 Stunden nach der Befruchtung der Eier erfolgte, und zu diesem Zeitpunkt in den Zulaufproben eine 100 %ige Mortalität erreicht wurde, werden nur die Fehlbildungsraten der in den Ablaufproben exponierten Tiere beschrieben. Die einzige Ausnahme bildete ein Tier, das im zweiten Testdurchlauf nach 96 Stunden im Zulauf (ZU4) überlebte. Eine sinnvolle statistische Auswertung der Fehlbildungsraten war jedoch aufgrund der stark schwankenden Anzahl an Individuen zwischen der Zu- und Ablaufprobe hier nicht möglich. In diesem Fall stellt die hohe Mortalitätsrate den aussagekräftigeren Endpunkt dar.

Insgesamt betrachtet, konnten in keinem der durchgeführten Testdurchläufe signifikante Unterschiede zwischen den im Ablauf exponierten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt werden. Es traten nur wenige Fehlbildungen auf, welche sich meist in Form von Ödemen äußerten. Deutlich seltener traten Wirbelsäulendeformationen auf, welche als schwerwiegende Fehlbildungen anzusehen sind. Exemplarisch werden hierfür die Fehlbildungsraten aus Testdurchlauf 1 dargestellt (Abbildung 4). Die Ausnahme bildeten wieder die Gruppen AB4, AB6 und AB7 des dritten Testdurchlaufs. Hier kam es wieder zu einer im Vergleich zu den anderen Testdurchläufen stark erhöhten Fehlbildungsrate, was, wie bereits zuvor erwähnt, auf Artefakte schließen lässt. Aus diesem Grund wurden diese Gruppen bei der statistischen Auswertung des dritten Testdurchlaufs auch hier nicht mit einbezogen.

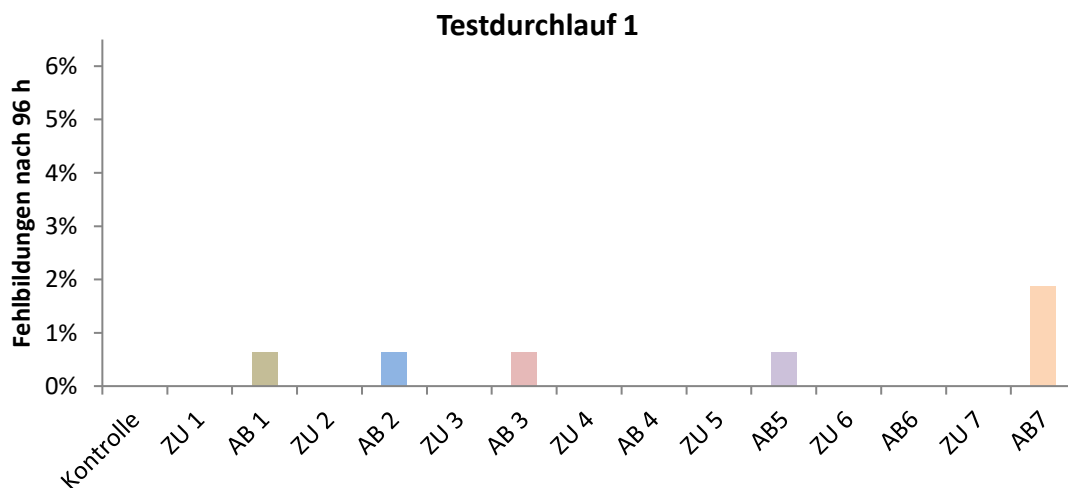


Abbildung 4: Fehlbildungsrate der exponierten Zebraabrlingsembryonen nach 96 stündiger Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 1

4. Diskussion

Die Ergebnisse sprechen für eine in der Summe gute Abwasserreinigung in der Kläranlage Göppingen, durch die embryotoxische Effekte sehr deutlich reduziert werden. Allerdings deuten die beeinflussten Schlupfraten darauf hin, dass das gereinigte Abwasser der KA Göppingen nicht als vollkommen unbedenklich angesehen werden sollte, und eine Beeinträchtigung der Fischentwicklung im aufnehmenden Gewässer (Fils) nicht auszuschließen ist. Dies ist vor allem auch vor dem Hintergrund zu sehen, dass der hier durchgeführte Test nur eine kurze Expositionszeit von 96 Stunden vorsieht, Fische im Gewässer jedoch kontinuierlich exponiert sind. Es ist nicht auszuschließen, dass eine längere

Exposition von Fischeiern und -larven im Bereich des Ablaufs der Kläranlage Göppingen drastischere Effekte zur Folge hat als diejenigen, die in den vorliegenden Tests gefunden wurden. Hinzu kommt, dass einheimische Fische bekanntermaßen deutlich sensitiver auf Stressoren reagieren als der Modellfisch Zebrabärbling.

Die im dritten Testdurchlauf beobachteten hohen Mortalitätsraten in der Gruppe AB4 sowie die starken Effekte (geringe Schlupfraten und hohe Fehlbildungsraten) in den Gruppen AB6 und AB7 unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen der Testdurchläufe 1 und 2 und deuten stark auf Artefakte hin. Als mögliche Erklärung kommt hier eine Kontamination der Testmedien in Frage. Diese scheint sehr wahrscheinlich, da die exponierten Tiere bereits sehr früh Entwicklungsverzögerungen bzw. hohe Mortalitätsraten zeigten. Als Ursache für die Verunreinigung kommt in Frage, dass die Braunglasflaschen, in denen sich diese Proben befanden, beim Auftauvorgang zu Bruch gingen und in einem Becherglas aufgefangen werden mussten. Hierbei könnten Klebe- und Färbemittel der Etiketten (Probenbeschriftung) in die Testmedien gelangt sein.

Generell ist nicht auszuschließen, dass die Probenbeschaffenheit (strenger Fäkalgeruch, bräunliche Färbung und Trübung der Zulaufproben; Schwebstoffe in den Ablaufproben) und die damit einhergehende organische Belastung bzw. Sauerstoffzehrung in den Proben zusätzlich die Testergebnisse beeinflusst haben. Welche Bedeutung alleine den Spurenstoffen zukommt, kann nicht entschieden werden. Allerdings sollte beachtet werden, dass an Schwebstoffe, die in den Ablaufproben zu finden waren, Spurenstoffe binden können, die hierdurch ins aufnehmende Gewässer eingetragen werden. Zu- und Ablaufproben der KA Tübingen, für die 2014 vergleichbare Untersuchungen durchgeführt wurden, zeigten die o.g. Eigenschaften nicht, so dass man dort von einer besseren Vorklärung ausgehen kann. Des Weiteren zeigten die Embryonen, die in den Zulaufproben der KA Tübingen exponiert wurden, deutlich geringe Mortalitätsraten als die Tiere, die gegenüber den Zuläufen der KA Göppingen exponiert wurden.

Vergleicht man die Ergebnisse für die KA Göppingen mit Daten, die in früheren Untersuchungen für die Kläranlagen Merklingen auf der Schwäbischen Alb und Langwiese (Ravensburg) an der Schussen im Bodensee-Einzugsgebiet erhoben wurden, wird deutlich, dass die Reinigungsleistung der KA Göppingen noch verbessert werden kann. Die Zulaufproben der zuvor erwähnten Kläranlagen zeichneten sich, wie die Zulaufproben der KA Göppingen, durch einen strengen Fäkalgeruch sowie eine starke bräunliche Färbung und Trübung aus. Dennoch konnten in den Ablaufproben (nach Sand- bzw. Flockungsfiltration) dieser beiden Kläranlagen nur noch schwache bis keine Reaktionen bei den exponierten Fischembryonen beobachtet werden, sodass für diese Anlagen statistisch keine Unterschiede zur Kontrolle festzustellen waren. Zu erwähnen ist hierbei noch, dass sich die Ablaufproben dieser Anlagen durch einen vergleichsweise geringen Gehalt an Schwebstoffen

auszeichneten. Die Reinigungsleistung der KA Mannheim wurde ebenfalls mit dem Fischembryotest untersucht. Auch hier zeichneten sich die Ablaufproben nach der Flockungfiltration durch Klarheit und einen geringen Gehalt an Schwebstoffen aus. Bei der Untersuchung dieser Kläranlage konnten in den Ablaufproben keine embryotoxischen bzw. subletalen Effekte beobachtet werden.

Der direkte Vergleich der KA Göppingen mit den Anlagen in Mercklingen, Ravensburg, Mannheim und Tübingen verdeutlicht, dass die KA Göppingen, trotz insgesamt relativ guter Reinigungsleistung, leichte Defizite in der Reduktion der embryotoxischen Potentiale aufweist. Eine genaue Erklärung hierfür kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Chemisch-analytische Nachweise von Spurenstoffen in Verbindung mit weiteren Biotests auf unterschiedlichen biologischen Ebenen könnten in diesem Zusammenhang weiterführende Erklärungen liefern.

5. Zusammenfassung

Der Embryotest mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Zu- und Ablaufproben der KA Göppingen sowie leichte, jedoch keine drastischen, Unterschiede zwischen den Probenahmetagen. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine gute Reinigungsleistung der Anlage hin, da eine deutliche Reduktion der Effekte in den Abwässern beobachtet werden konnte.

Die Beeinflussung der Schlupfrate in einzelnen Tests mit Ablaufproben sollte nicht außer Acht gelassen werden, da bei längerer Exposition von sensitiveren Organismen im Gewässer (trotz Verdünnung des Abwassers) drastischere Effekte nicht auszuschließen sind.

Auch sollte vor einer abschließenden Bewertung der Reinigungsleistung der Kläranlage Göppingen eine weitere Analysekampagne zu einer anderen Jahreszeit in Erwägung gezogen werden, da bspw. in den Wintermonaten andere Bedingungen (geringerer Niederschlag, Salzung der Straßen, höherer Konsum von Arzneimitteln) herrschen als im Sommer.

In der folgenden Tabelle 7 sind die Ergebnisse aller drei durchgeführten Testdurchläufe zusammenfassend dargestellt. Die Stärke der Reaktionen wurde wie folgt bewertet: +: schwache Reaktion; ++: deutliche Reaktion; +++: starke Reaktion und -: keine Reaktion. Neben den Zulaufproben führten vor allem die Ablaufproben AB3 und AB5 zu den stärksten Effekten. Generell traten bei den Ablaufproben die stärksten Effekte bei der Schlupfrate, einem subletalen Endpunkt, auf.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse; +++ = starke Reaktion, ++ = deutliche Reaktion, + = schwache Reaktion, - = keine Reaktion

Exposition	Endpunkt			
	Reduktion der Herzfrequenz	Erhöhte Mortalität	Reduktion der Schlupfrate	Erhöhte Fehlbildungsrate
Kontrolle	Referenz	-	-	-
ZU1	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB1	-	-	+	+
ZU2	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB2	-	-	+	+
ZU3	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB3	-	-	++	-/+
ZU4	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB4	-	-	+	-/+
ZU5	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB5	-	-	+(+)	-/+
ZU6	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB6	-	-	+	-/+
ZU7	100 % Mortalität	+++	100 % Mortalität	100 % Mortalität
AB7	-	-	+	+

6. Anhang

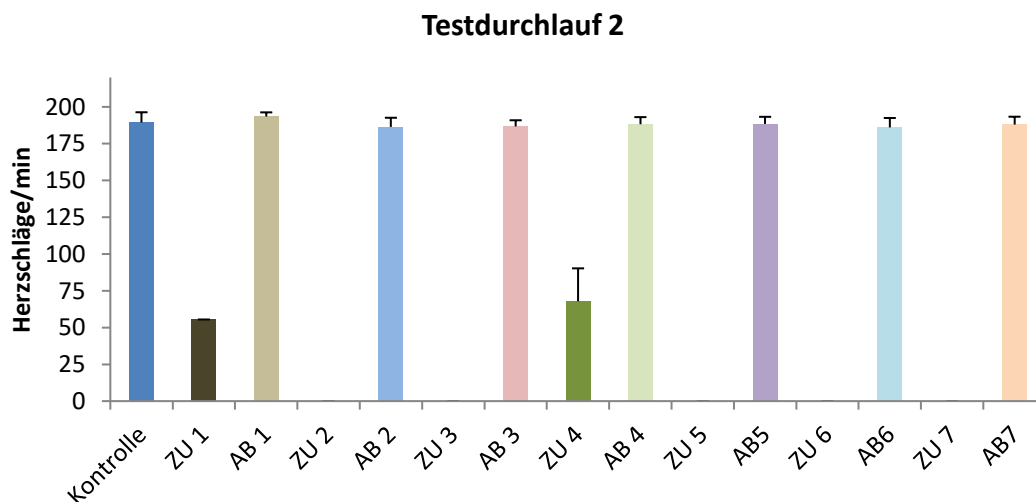


Abbildung 5: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 2; die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 4 festgehalten

Testdurchlauf 3

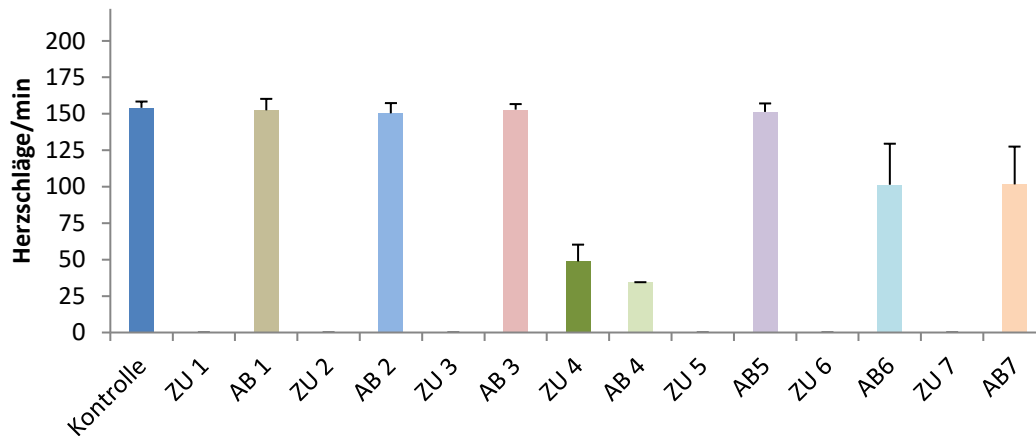


Abbildung 6: Herzschlagraten der Embryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Testdurchlauf 2; die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 4 festgehalten

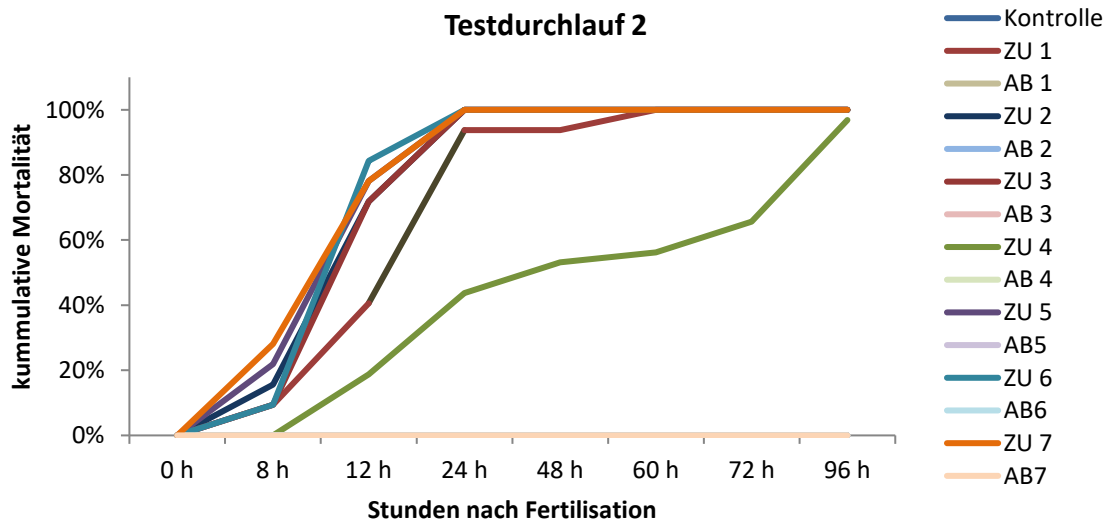


Abbildung 7: Mortalität der Zebrafischembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 5 festgehalten

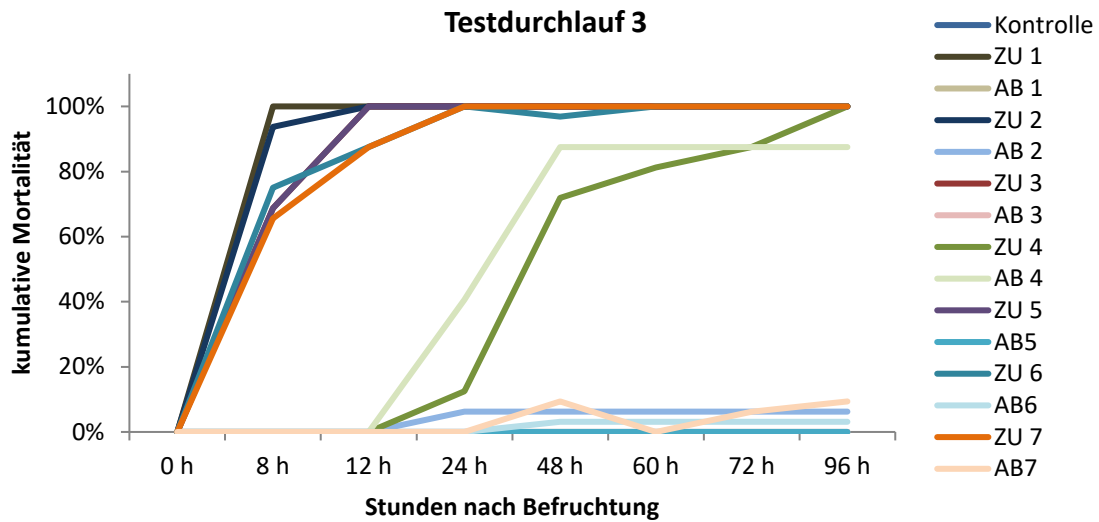


Abbildung 8: Mortalität der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 5 festgehalten

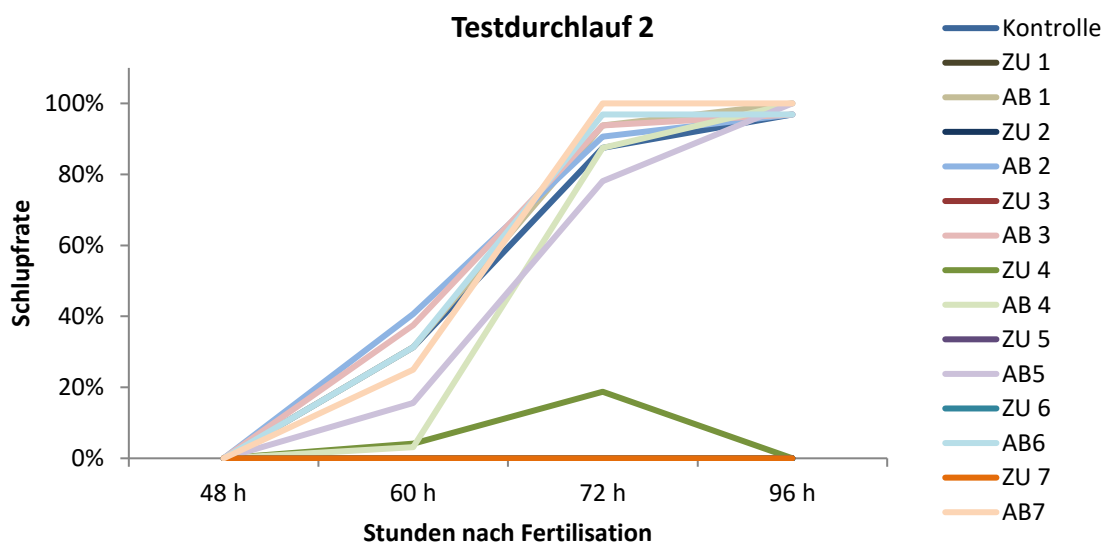


Abbildung 9: Schlupfrate der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 6 festgehalten

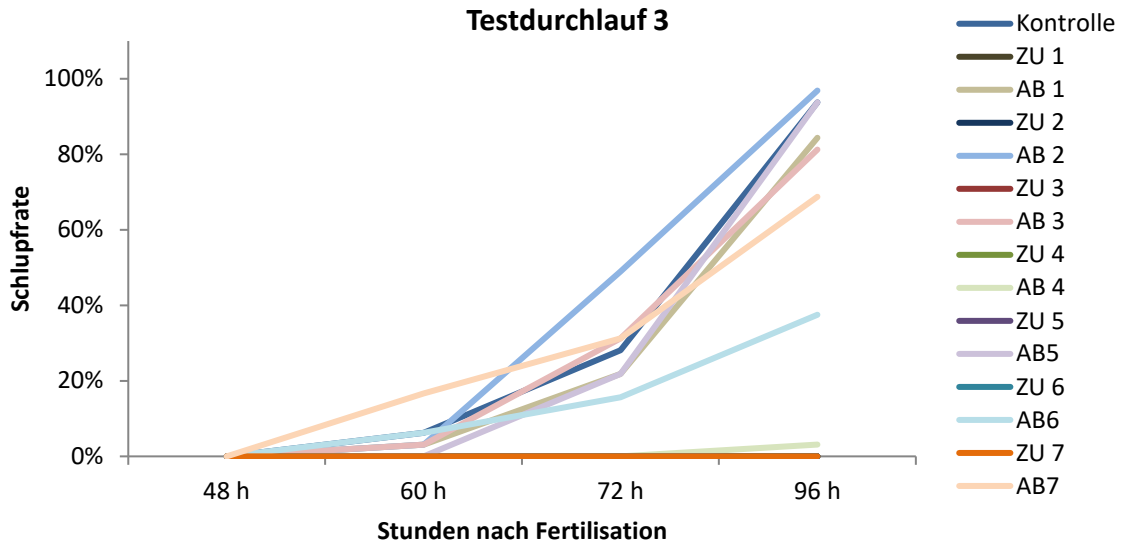


Abbildung 10: Schlupfrate der Zebraärblingsembryonen während der Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen und gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3; signifikante Unterschiede sind in Tabelle 6 festgehalten

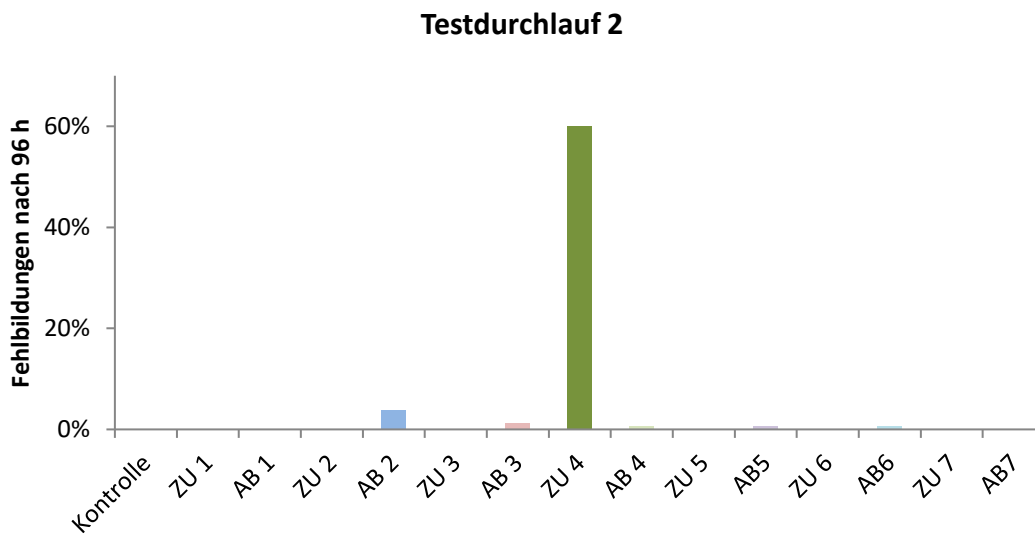


Abbildung 11: Fehlbildungsrate der exponierten Zebraärblingsembryonen nach 96 stündiger Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 2

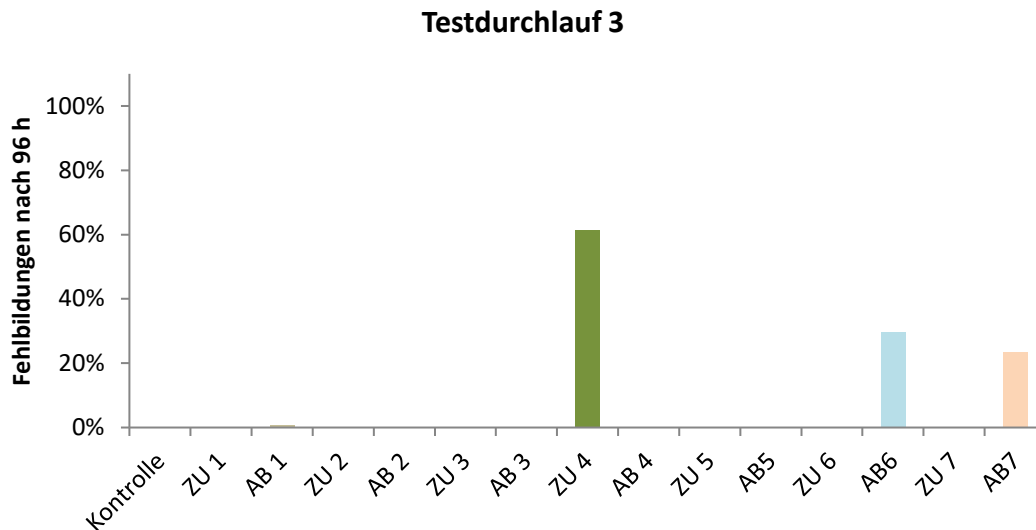


Abbildung 12: Fehlbildungsrate der exponierten Zebrafischembryonen nach 96 stündiger Exposition gegenüber Zu- und Ablaufproben der Kläranlage Göppingen sowie gegenüber Kunstwasser (Laborkontrolle); Ergebnisse aus Testdurchlauf 3

6. Literatur

- Luckenbach T, Killian M, Tribskorn R, Oberemm A (2001). Fish early life stages tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* (3-4): 355-370.
- Nagel R (2002). DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model, *Ecotoxicology and Toxicology*. ALTEX 19, Suppl 1
- OECD, (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test: OECD Publishing.
- Scheil V, Zürn A, Tribskorn R, Köhler H-R (2010). Embryo development, stress protein (Hsp70) responses and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos and binary mixtures of them. *Environmental Toxicology* 25: 83-93.
- Strmac M, Oberemm A, Braunbeck T (2002). Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology* 61: 24-38.

Kapitel 2.1: Nachweis biologischer Wirkungen in Proben aus der Kläranlage Mannheim – *Ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser*

Im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg; Oktober 2015 (unveröffentlicht)

Rita Triebkorn, Paul Thellmann (Universität Tübingen); Beate Escher (UFZ Leipzig/ Universität Tübingen); Stefan Gartiser, Martina Knauer (Hydrotox Freiburg); Bertram Kuch (Universität Stuttgart); Martin Wagner (Universität Frankfurt)

1. Hintergrund

Der vorliegende Bericht befasst sich mit der biologischen Untersuchung der Kläranlage (KA) Mannheim. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden mithilfe verschiedenster Testmethoden auf unterschiedlichen biologischen Ebenen Proben aus der Nachklärung (NKB), vom Ablauf nach Behandlung mit herkömmlichen Zweischichtfilter (F_b) sowie Proben nach zusätzlicher Behandlung durch eine Adsorptionsstufe und nachgeschaltetem Zweischichtfilter (F_a) untersucht (s. Tab. 1). Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, ob durch die zusätzlich installierte adsorptive Stufe mit Pulveraktivkohle (PAK) eine weitere Reduktion von Schadstoffen bzw. von biologischen Reaktionen erfolgt. Hierzu wurde zu drei ausgewählten Zeitpunkten (s. Tab. 2) eine 24-h-Sammelprobe (bei Trockenwetter) an den drei oben genannten Probestellen (NKB; F_a; F_b) entnommen und auf biologische Wirkungen hin untersucht. In der Adsorptionsstufe wurden während der Probenahme 10 mg/L Pulveraktivkohle dosiert. Durch den Vergleich mehrerer Probenahmetage (und hiermit zusammenhängend auch mehrerer Proben) sollten Schwankungen bezüglich der Reinigungseffizienz erfasst werden. Weiterhin erfolgte auch ein Vergleich zwischen nativen und angereicherten Proben. Die Codierung der Proben sowie die Probenahmetage sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 1: Durchgeführte Tests zur Untersuchung der Abwasserproben aus der KA Mannheim

Endpunkt	Test	Testsystem	Labor/Kooperationspartner
Dioxinähnliche Toxizität	AhR-CAFLUX	Rattenleberzellen	UFZ Leipzig/ Escher
Gentoxizität	Ames Fluktuationstest	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i>	Hydrotox GmbH Freiburg / Gartiser, Knauer
Gentoxizität/Zytotoxizität	P53-BLA	humane Darmkrebszellen	UFZ Leipzig/ Escher
Oxidativer Stress/ Zytotoxizität	ARE-c32	Humane Brustkrebszellen	UFZ Leipzig/ Escher
Entzündung/ Immuntoxizität/Zytotoxizität	nfKappaB-BLA	Humane Blutzellen	UFZ Leipzig/ Escher
Östrogenität	E-Screen	Brustkrebszellen	Uni Stuttgart / Kuch
Östrogenität	YES	Hefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Anti-Östrogenität	YAES	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Androgenität	YAS	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Anti-Androgenität	YAAS	Hefe: <i>S. cerevisiae</i>	Uni Frankfurt / Wagner
Reproduktionstoxizität	Chronischer Daphnientest	<i>In vivo: Daphnia magna</i>	Hydrotox GmbH Freiburg / Gartiser, Knauer
Entwicklungstoxizität	Fischembryotest	<i>In vivo: Danio rerio</i>	Uni Tübingen/ Thellmann, Triebskorn

Tabelle 2: Datum der Messkampagnen und Codierung der Proben

Messkampagne Nr.	Codierung	Datum	Untersuchte Proben
1	MK 1	03./04.02.2015 9.00-9.00 Uhr	MK 1_NKB, MK 1_F_b MK1_F_a
2	MK 2	17./18.02.2015 9.00-9.00 Uhr	MK 2_NKB, MK 2_F_b MK2_F_a
3	MK 3	25./26.02.2015 8.00-8.00 Uhr	MK 3_NKB, MK 3_F_b MK3_F_a

2. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt nach angewendeter Testmethode und befolgt die Reihenfolge aus Tabelle 2.

2.1 Dioxinähnliche Toxizität: AhR-CAFLUX

Einleitung

Der Arylkohlenwasserstoffrezeptor (AhR) ist ein Liganden-aktivierter Nuklearrezeptor, der vor allem für die Bindung von Dioxinen und dioxinähnlichen Verbindungen bekannt ist, jedoch auch von wassergängigen und natürlichen Liganden aktiviert werden kann (Denison et al., 2002). Nach der Bindung eines Stoffes an den AhR, erfolgt die Translokation des Liganden-AhR Komplexes in den Zellkern, wo er an das Dioxinantwort-Element (DRE) bindet. Das DRE stellt wiederum den Promotor für die Gene dar, welche verschiedene metabolische Enzyme codieren, z. B. CYP1A1, CYP1B1 und NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1).

Material und Methoden

Zur Untersuchung der dioxinähnlichen Toxizität wurde der von der Denison-Gruppe entwickelte CAFLUX Test (Chemically Activated Fluorescence Expression) verwendet (Nagy et al., 2002). Der Test wurde wie von Macova et al. (2010; 2011) beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse

Alle Proben zeigten gute log-logistische Konzentrations-Effektkurven (s. Abb. 1, Gleichung 1). Aus den Daten der drei unabhängig durchgeführten Testdurchläufe wurde eine gemeinsame Konzentrations-Wirkungskurve angepasst und der EC_{50} ermittelt (Tabelle 3). Der EC_{50} stellt die effektive Konzentration dar, bei der 50 % des maximalen Effekts der Referenzverbindung TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin) induziert werden. Die Lösungsmittelkontrolle zeigte bis zu einer 100-fachen Anreicherung der Probe keinen Effekt. Die EC_{50} Werte der Wasserproben sind in Einheiten von relativen Anreicherungsfaktoren (REF) angegeben.

$$\% \text{ Effekt} = \frac{100 \%}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log \text{Konzentration}) \cdot \text{Steigung}}} \quad (1)$$

Die Proben des Nachklärbeckens mussten 3.3 bis 6.7-fach angereichert werden, um 50 % des maximal erreichbaren Effekts zu erzielen. Der Ablauf ohne PAK zeigte EC_{50} Werte von REF 5.5 bis 9.2 (REF: relativer Anreicherungsfaktor = Verdünnungsfaktor/Anreicherungsfaktor). Beim Ablauf mit PAK lag der EC_{50} bei REF 11.0 bis 16.7.

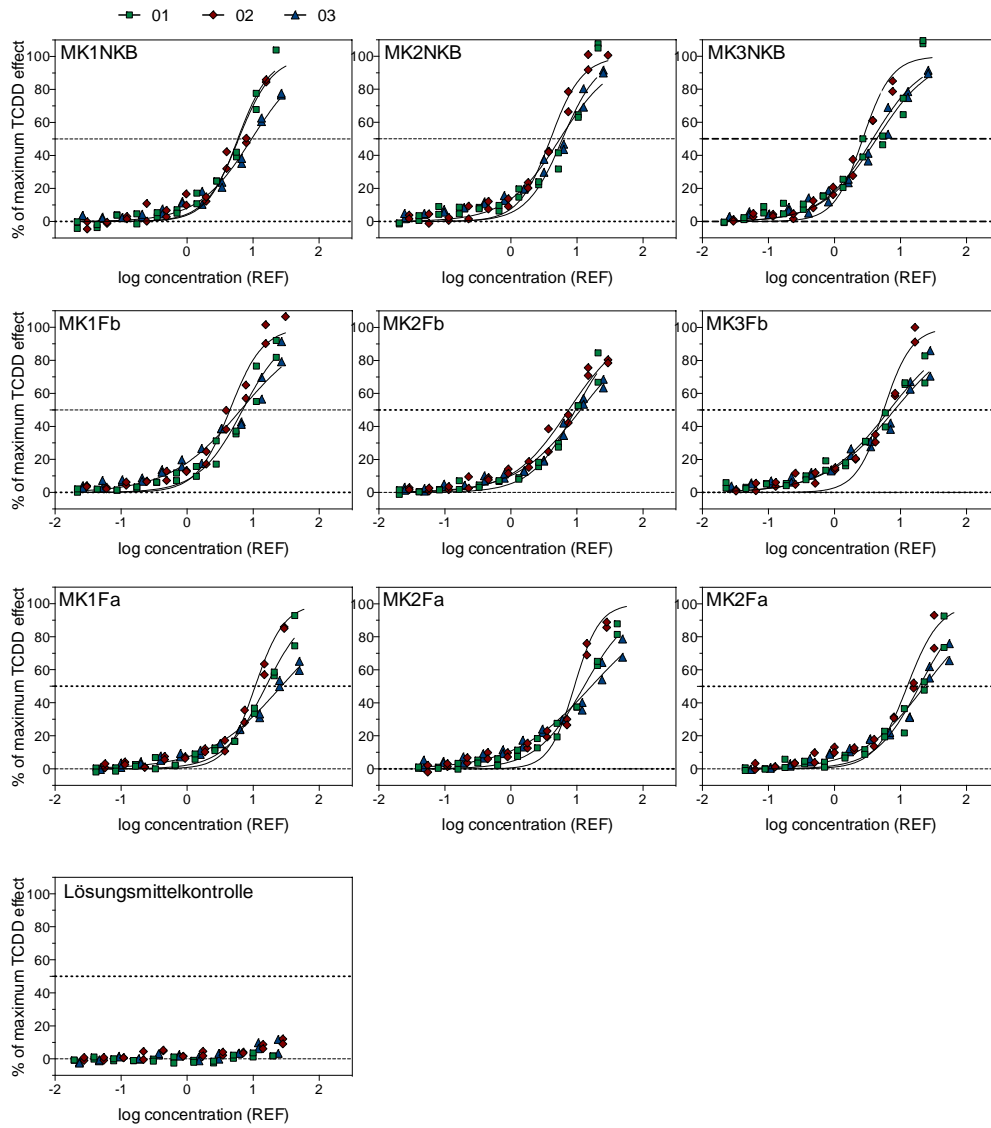


Abbildung 1: Konzentrations-Effekt-Kurven der Abwasserproben der KA Mannheim aus dem AhR-CAFLUX-Test

Tabelle 3: EC₅₀-Werte der untersuchten Abwasserproben der KA Mannheim aus dem AhR-CAFLUX-Test

	CAFLUX EC ₅₀ (REF)	log EC ₅₀ (REF)	Standardabweichung (log)
MK1NKB	6.7	0.83	0.02
MK2NKB	5.0	0.70	0.03
MK3NKB	3.3	0.52	0.04
MK1Fb	5.5	0.74	0.03
MK2Fb	9.2	0.97	0.02
MK3Fb	6.1	0.78	0.04
MK1Fa	14.6	1.17	0.03
MK2Fa	11.0	1.04	0.04
MK3Fa	16.7	1.22	0.03
Lösungsmittelkontrolle	>100		

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Die Reinigungsleistung ist definiert als:

$$\text{Reinigungsleistung} = 1 - \frac{\text{EC(NKB)}}{\text{EC(nachFilter)}} \quad (2)$$

Bei der ersten Probenahme wurde nach dem konventionellen Filter eine Reduktion der Reinigungsleistung um 21 % festgestellt. In den Proben der darauffolgenden Probenahmetage konnten Reduktionen von 45-46 % beobachtet werden. Beim Ablauf mit Pulveraktivkohle PAK erhöhte sich die Reduktion der Effekte im Vergleich zum Nachklärbecken auf 54 bis 80 % (Abb. 2). Diese Unterschiede spiegeln die in der chemischen Analytik sichtbare Eliminationsleistung hydrophober Stoffe (PAK, PCB etc.) wider.

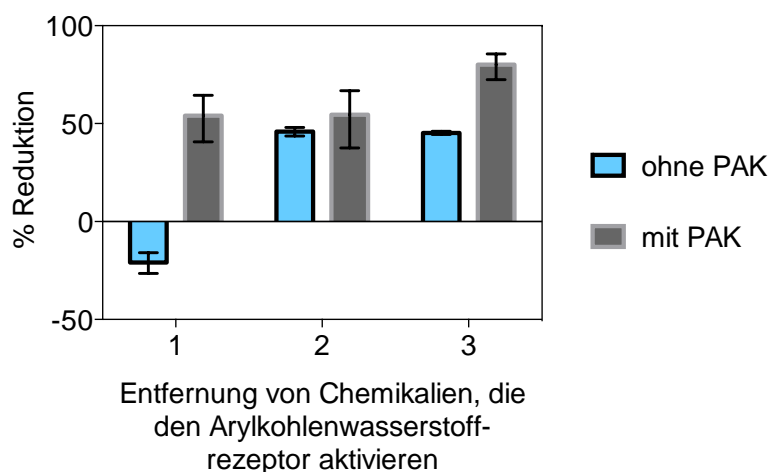


Abbildung 2: Reduktion der Effekte in den untersuchten Reinigungsstufen der KA Mannheim im AhR-CAFLUX-Test

2.2 Gentoxizität: Ames Fluktuationstest

Einleitung

Das Prinzip zur Bestimmung der gentoxischen Wirkung beruht beim Ames-Test auf der Induktion von Rückmutationen der Bakterien-Mutanten durch im Testansatz vorhandene Substanzen. Die *Salmonella typhimurium*-Stämme sind nicht in der Lage, in Histidin-freiem Nährmedium zu wachsen. Unter Einwirkung gentoxischer Substanzen kann es zu Mutationen kommen, die die Bakterien wieder dazu befähigen, die Aminosäure Histidin herzustellen. Diese können sich dann wieder in Histidin-freiem Medium vermehren. Im Gegensatz zum konventionellen Ames-Test wird der Ames-Fluktuationstest mit Flüssigmedien in Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Wachstum der Bakterien wird durch einen Farbumschlag von Violett zu Gelb detektiert und stellt gleichzeitig eine Quantifizierung der Rückmutationen (Revertanten) dar.

Material und Methoden

Der Ames-Fluktuationstest wurde mit dem kompletten Testkit von Xenometrics und dem ausführlichen „Instruction for Use“ (Version 4.51_S) durchgeführt. Die Teststämme TA 98 (Lot. 17a, H: 10/2016) und TA 100 (Lot. 17b, H: 09/2016) wurden ohne und mit metabolischer Aktivierung (Aroclor 1254-induziertes S9) untersucht.

Die Kontrolle wurde mit der Zugabe von sterilem deion. Wasser getestet. Die Testansätze wurden mit entsprechendem Volumen an Probe bzw. für die Verdünnungsstufen entsprechend mit sterilem deion. Wasser verdünnt. Getestet wurden die 4 Verdünnungsstufen G1, G2, G4 und G8. Jeder Testansatz wurde mit 3 Replikaten durchgeführt. Die Positivkontrollen wurden mit 2-Nitrofluoren (2 µg/mL final) und 4-Nitroquinolin-N-oxid (0,1 µg/mL final) und bei metabolischer Aktivierung mit 2-Aminoanthracen (5 µg/mL final) angesetzt. Die Übernachtskultur der Stämme wurde bei 37 °C im Schüttler für mindestens 14 Stunden auf eine OD₆₀₀ von > 2,0 hochgewachsen lassen. Die Proben wurden auf einen pH-Wert von 7,0 +/- 0,2 eingestellt und vor Testzugabe mit einem Sterilfilter (Whatman FP 30/0,2 CA-S, Lot. G5444161) filtriert.

Ergebnisse

Die untersuchten Proben der Kläranlage Mannheim zeigten in allen untersuchten Verdünnungsstufen (G1, G2, G4 und G8) mit den Teststämmen TA 98 (+/- S9) und TA 100 (+/- S9) keinen Hinweis auf mutagene Effekte (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Ergebnisse des Ames-Fluktuationstests mit Abwasserproben der KA Mannheim

			Ergebnisse			
Proben	Probe- nahmen	Getestete G-Stufen	TA 98		TA 100	
			- S9	+ S9	- S9	+ S9
Kläranlage Mannheim Ablauf mit PAK	MK 1 F_a	G1 – G8	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 2 F_a		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 3 F_a		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
Kläranlage Mannheim Ablauf ohne PAK	MK 1 F_b	G1 – G8	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 2 F_b		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 3 F_b		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
Kläranlage Mannheim Ablauf Nachklärbecken	MK 1 NKB	G1 – G8	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 2 NKB		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen
	MK 3 NKB		nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen	nicht mutagen

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Eine mutagene Wirkung auf *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 konnte mit den nativen Proben der Kläranlage Mannheim nicht nachgewiesen werden.

2.3 Gentoxizität /Zytotoxizität: P53-BLA

Einleitung

Adaptive Stressantworten werden als integrierende Indikatoren für diverse molekulare Mechanismen betrachtet. Sie stellen folglich eine Antwort der Zellen auf Störungen dar. Der p53-Weg ist besonders wichtig, da p53 als Tumor-unterdrückender Faktor die Antwort auf direkte und indirekte gentoxische Mechanismen darstellt, die für DNA-Reparatur, Regulation des Zellzyklus sowie Apoptose verantwortliche Proteine aktiviert (Duerksen-Hughes et al., 1999).

Der CellSensor p53RE-bla HCT-116 wurde bisher nur für das Screening von Einzelstoffen verwendet (Knight et al., 2009) sowie für das Screening von Trink- und Schwimmbadabwasser eingesetzt (Yeh et al., 2014). Sowohl direkt als auch indirekt genotoxische Substanzen sollten den p53 Weg aktivieren. Von fast 2000 der in ToxCast untersuchten Substanzen zeigten ca. 15 % in diesem Test eine Aktivität (<http://actor.epa.gov/dashboard/>).

Material und Methoden

Die HCT-116 epitheliale humane Darmkrebszelllinie wurde stabil mit einem β -Lactamase Reporter gen transfiziert, das von p53 kontrolliert wird und kommerziell von Invitrogen, Carlsbad, USA zu beziehen ist. Die CellSensor p53RE-bla HCT-116 Zellen wurden bei 37 °C kultiviert und der Biotest wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Expositionszeit wurde auf 48h ausgedehnt, da sich in Vorversuchen zeigte, dass die Empfindlichkeit durch die erhöhte Expositionszeit bei Wasserproben deutlich steigt (Yeh et al., 2014). Das detaillierte Protokoll liegt in englischer Sprache vor und kann bei Bedarf eingesehen werden.

Die Detektion der produzierten β -Lactamase erfolgt mit dem ToxBLAzer FRET-B/G CCF4-AM (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Substrat, das bei verschiedenen Wellenlängen fluoresziert (460 und 530 nm). Dieser veresterte lipophile Farbstoff wird von der Zelle aufgenommen und von lebenden Zellen mittels zellulärer Esterasen gespalten, wodurch er nicht mehr aus der Zelle austreten kann. Die β -Lactamase katalysiert die Hydrolyse des Lactamrings und überführt das grün fluoreszierende Molekül in eine blau fluoreszierende Form (Hallis et al., 2007). Das Verhältnis von blauer zu grüner Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge an produzierter β -Lactamase und damit auch ein Maß für die Aktivierung des p53.

Parallel dazu wird die Zytotoxizität bei einer dritten Wellenlänge bestimmt (590 nm Anregung, 665 nm Emission). Nur nicht zytotoxische Konzentrationen wurden für die Aktivierung ausgewertet.

Ergebnisse

Bis zur höchsten gemessenen Konzentration (Anreicherung REF von 100 bis 200) konnten keine positiven Antworten beobachtet werden (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Ergebnisse des P53-BLA-Tests

	Zytotoxizität EC ₁₀ (REF)	Aktivierung von p53 EC _{IR1.5} (REF)
MK1NKB	57	>100
MK2NKB	41	>93
MK3NKB	19	>96
MK1Fb	35	>99
MK2Fb	51	>94
MK3Fb	55	>105
MK1Fa	118	>188
MK2Fa	87	>180
MK3Fa	58	>203
Solvent Blank	57	>222

In der Tabelle sind die EC₁₀ Werte für Zytotoxizität aufgeführt (abgeleitet aus Gleichung 1). Die Zytotoxizität setzte bei p53 früher ein als bei ARE (Abbildung 3). Daher ist es möglich, dass induzierende Effekte durch die Zytotoxizität maskiert wurden.

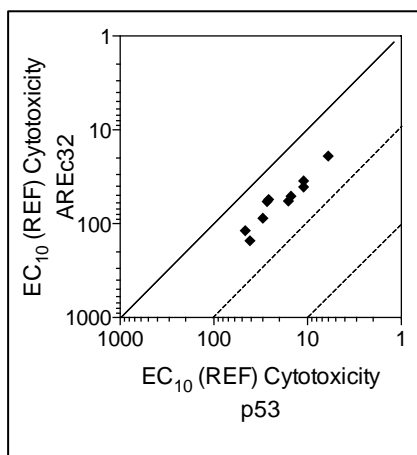


Abbildung 3: Vergleich der Zytotoxizität zwischen AREc32 und p53

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Die Aktivierung des p53-Wegs wurde auch bei Proben aus Oberflächengewässern erst bei sehr hohen Anreicherungen (REF 100 bis 300) aktiviert (nicht publizierte Resultate). Im Gegensatz dazu zeigten Schwimmbadabwässer hohe Aktivitäten mit EC_{IR1.5} in Höhe von 6 bis 30 REF (Yeh et al., 2014). Allerdings wurde auch bei diesen Proben nur ein geringer Konzentrationsbereich zwischen der

Aktivierung von p53 und der Zytotoxizität beobachtet, sodass in vielen Proben die Zytotoxizität die Aktivierung maskierte.

2.4 Oxidativer Stress / Zytotoxizität: ARE-c32, ARE-Bla

Kurze Einleitung

Die Antwort von Säugerzellen auf elektrophile Chemikalien und reaktive Sauerstoffspezies wird vor allem durch Nrf2 (NF-E2-related factor 2) gesteuert, das für die Induktion von entgiftenden und antioxidierenden Enzymen verantwortlich ist (Nguyen et al., 2009; Giudice et al., 2010; Zhang et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert das Antioxidant Response Element (ARE), welches die Produktion von vielen Entgiftungsenzymen wie z. B. GSTA2 (Glutathion-S-Transferase A2) und NQO1 (NADPH-Quinon-Oxidoreduktase) aktiviert (Uda et al., 1997).

Ein Reportgentest der die Aktivierung von Nrf2 über die Expression der Luziferase, welche leicht über Lumineszenz quantifizierbar ist, basiert auf der von Wang et al. (2006) aus der Brustkrebszelllinie MCF7 konstruierten Zelllinie AREc32. Diese Zellen wurden für die Testung von hautreizenden Stoffen angewendet (Natsch, 2010). Ein ähnlicher Test wurde in der US EPA ToxCast Studie verwendet (Martin et al., 2010), bei der 26 % aller getesteten Stoffe die oxidative Stressantwort aktivierten (<http://actor.epa.gov/dashboard/>). Parallel zur Aktivierung von ARE wurde die Zytotoxizität mit Resazurin quantifiziert. Nur nicht zytotoxische Konzentrationen wurden für die Aktivierung ausgewertet.

Der AREc32 wurde für die Verwendung in der Wasserqualitätsbestimmung angepasst (Escher et al., 2012b) und in vielen Studien angewendet (Escher et al., 2014). Es konnte auch gezeigt werden, dass weniger als 1 % der Antworten in Wasserproben durch typischerweise analysierte Mikroverunreinigungen erklärt werden konnte. Welche anderen Stoffe im Test ansprechen, ist bisher noch nicht bekannt (Escher et al., 2013).

Material und Methoden

Die AREc32 Zelllinie (Wang et al., 2006) wurde gemäß Escher et al. (2012a) getestet. Das detaillierte Protokoll ist in englischer Sprache verfasst und kann bei Bedarf eingesehen werden.

Ergebnisse

Zunächst wurde die Zytotoxizität der Proben auf die AREc32 Zellen bestimmt. Wie die Tabelle zeigt, mussten die Proben zwischen 19- und 151-fach angereichert werden, um 10%ige Zytotoxizität zu erzielen (EC10 Wert für Zytotoxizität). Die Lösungsmittelkontrolle zeigte bis REF 180 keinen Effekt. Die

Messung der Aktivierung wurde daher nur mit Konzentrationen unterhalb des EC10 Wert für Zytotoxizität durchgeführt.

Die Konzentrations-Effektcurven wurden dreifach bestimmt und sind in der Abbildung 4 gezeigt. Aus der linearen Regression wurde der ECIR1.5, die Konzentration, die zu einen Induktionsverhältnis IR 50 % über der Kontrolle führt, abgeleitet (s. Tab. 6).

Tabelle 6: Ergebnisse aus dem ARE-c32-Test mit Abwasserproben der KA Mannheim im Vergleich mit Ergebnissen aus dem P53-BLA-Tests

	Zytotoxizität EC ₁₀ (REF)	Induktion der oxidativen Stressantwort EC _{IR1.5} (REF)	Standardabweichung des EC _{IR1.5} (REF)
MK1NKB	57	4,46	0,22
MK2NKB	41	2,88	0,15
MK3NKB	19	2,98	0,14
MK1Fb	35	5,15	0,24
MK2Fb	51	6,65	0,33
MK3Fb	55	6,97	0,37
MK1Fa	118	13,5	0,58
MK2Fa	87	8,12	0,21
MK3Fa	58	10,5	0,48
KA-Tü	151	9,21	0,38
Solvent Blank	> 180	> 180	

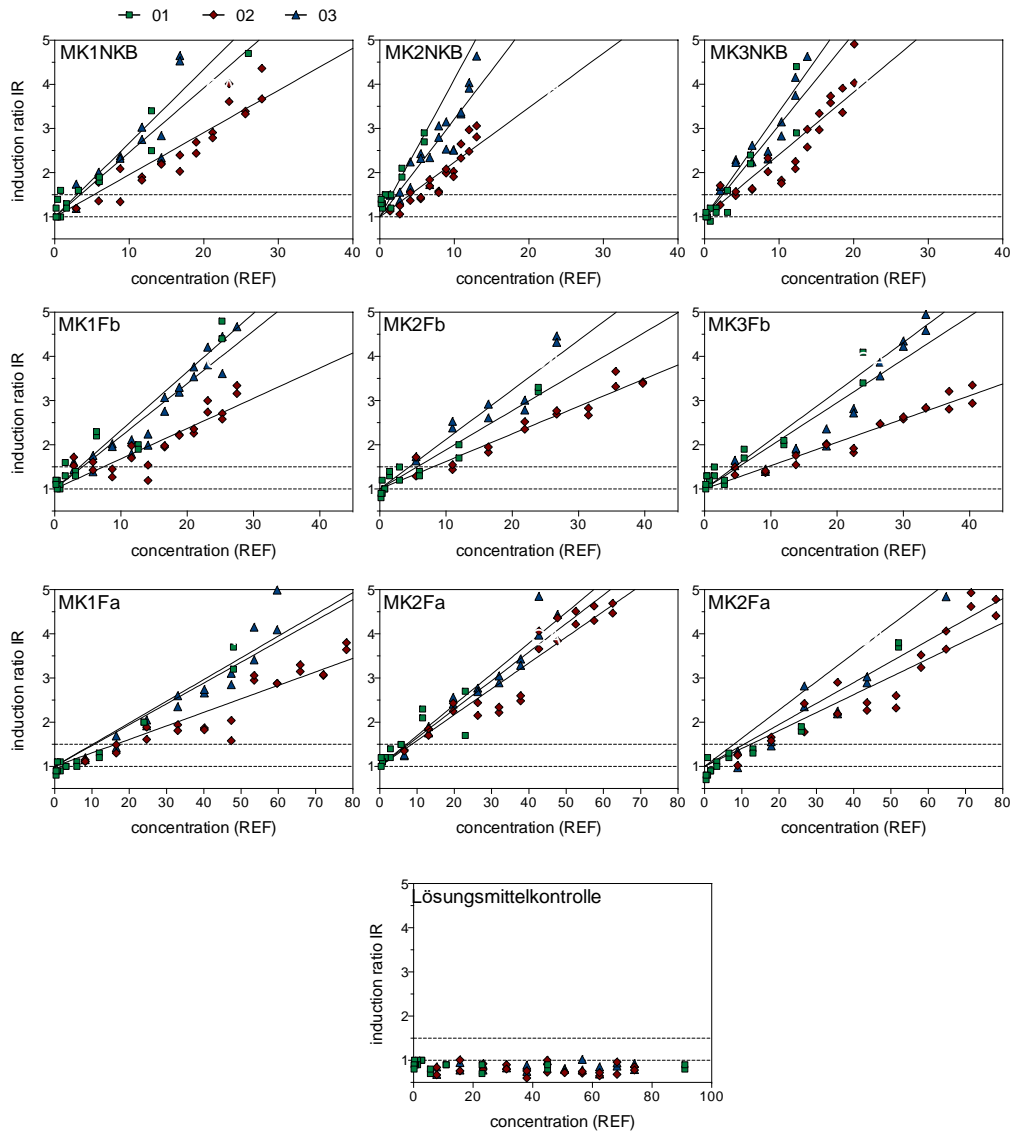


Abbildung 4: Konzentrations-Effektkurven aus dem ARE-c32-Test mit Abwasserproben der KA Mannheim

Die Zytotoxizität setzte erst bei einer zehnfach höheren Konzentration als bei der Aktivierung der oxidativen Stressantwort ein. Dies bedeutet, dass ein gutes Konzentrationsfenster für die Messung der Aktivierung vorhanden war (s. Abb. 5).

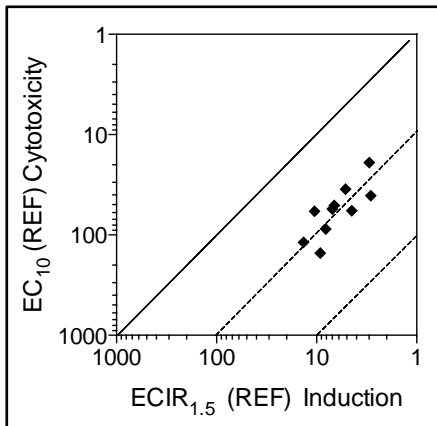


Abbildung 5: Vergleich von Zytotoxizität und oxidativer Stressantwort

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Insgesamt waren die Effektkonzentrationen für die Aktivierung der oxidativen Stressantwort sehr gering (also hohe Aktivität), aber ähnlich wie in einer anderen untersuchten Kläranlage (s. Abb. 6). In Oberflächengewässern lagen die ECIR1.5Werte ein bis zwei Größenordnungen tiefer. In chloriertem Schwimmbadabwasser waren sie aber in der gleichen Größenordnung oder sogar noch tiefer als an der KA Mannheim (ECIR1.5Werte von REF 0.5 bis 25, (Yeh et al., 2014)).

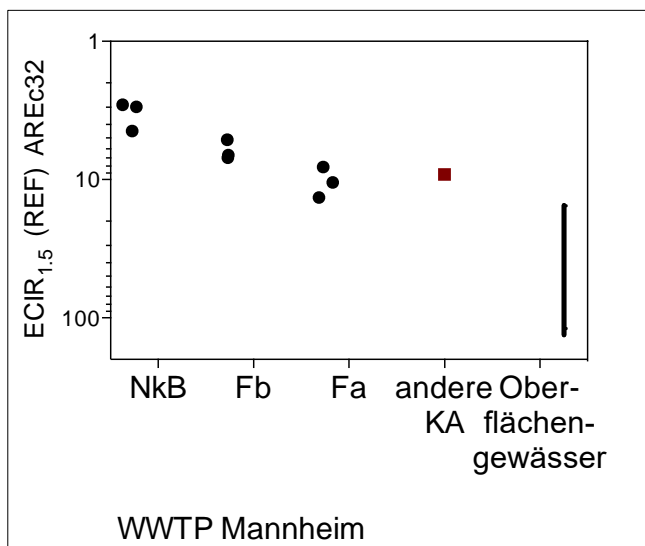


Abbildung 6: Vergleich der KA Mannheim mit anderen Werten aus dem ARE-c32-Test mit Abwasser- und Oberflächenwasserproben

Die Reinigungsleistung lässt sich in Bezug auf die Entfernung von Chemikalien, welche die oxidative Stressantwort aktivieren können, als hoch interpretieren (57 % ohne PAK, 65-72 % mit PAK; s. Abb. 7). Erneut konnte bei der Probe ohne PAK der ersten Probenahme ein Ausreißer festgestellt werden. Auch bei anderen Biotests zeigte diese Probe abweichende Ergebnisse. Die Reduktion der Zytotoxizität ist bei diesem Test variabler, da der hier beobachtete Endpunkt auf wenigen Datenpunkten und nicht auf vollständigen Konzentrations-Effektkurven basiert. Jedoch zeigt sich ein gleicher Trend.

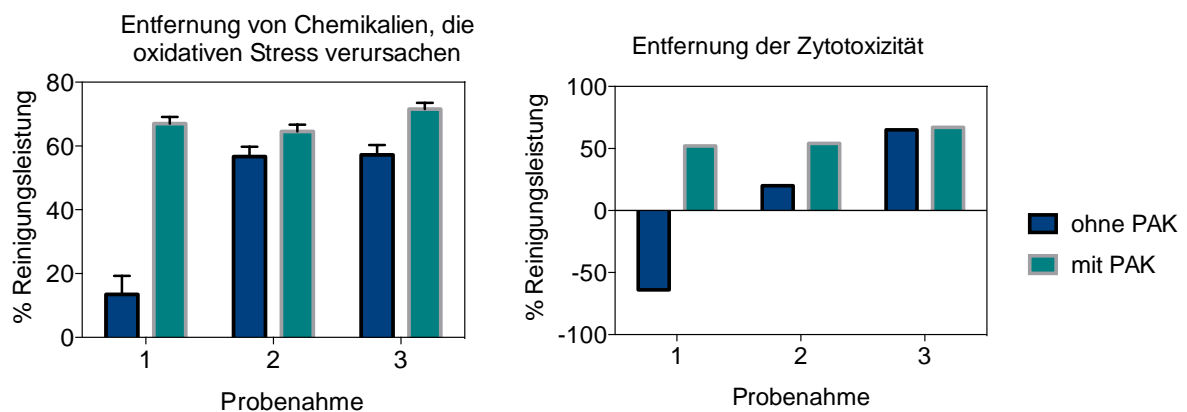


Abbildung 7: Reduktion der Effekte in den untersuchten Reinigungsstufen der KA Mannheim im ARE-c32-Test

2.5 Entzündung / Immuntoxizität / Zytotoxizität: nfKappaB-BLA

Einleitung

Der NF- κ B-Transkriptionsfaktor ist als Teil der adaptiven Stressantwort ein Schlüsselfaktor für die Entzündungsantwort von Zellen (Simmons et al., 2009). Entzündungen stellen eine Schutzantwort der Zelle gegen physische und chemische Stressoren dar. Die Aktivierung des NF- κ B Transkriptionsfaktors führt zur Aktivierung von Immunantworten sowie der Induktion von Zytokinen, dem Hitzeschockprotein 90, der Regulatoren der Apoptose und weiteren Abwehrmechanismen (Miller et al., 2010).

Nur 3 % der in der Toxcast Datenbank gelisteten Stoffe führten zu einer Aktivität im NF- κ B-bla Test (<http://actor.epa.gov/dashboard/>). Es ist bekannt, dass eine Reihe von Pharmazeutika den NF- κ B Weg inhibiert (Miller et al., 2010), jedoch wurde dieser Test bisher noch nie für die Anwendung in der Wasserqualitätsbewertung eingesetzt. Aufgrund seiner potentiellen Relevanz für diese Untersuchung wurde dieser Test in die Testbatterie aufgenommen. Einen weiteren Grund für seine Auswahl liefert die Untersuchung der Donau, bei der dieser Test sehr starke Effekte zeigte, während in chloriertem Trinkwasser und im Abwasser keine Aktivitäten messbar waren.

Material und Methoden

Die Zelllinie "CellSensorR NFκB-bla THP-1" enthält ein β-Lactamase Reportergen unter der Kontrolle vom Nuclear Factor kappa B (NFκB) Antwortelement, das stabil in THP1 Zellen integriert ist. Das Messprinzip ist gleich wie bei den CellSensor p53RE-bla HCT-116 Zellen. Der Biotest wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das detaillierte Protokoll ist in englischer Sprache verfasst und kann bei Bedarf eingesehen werden.

Ergebnisse

Zunächst wurde die Zytotoxizität der Proben auf die CellSensorR NFκB-bla Zellen bestimmt. Wie die Tabelle 7 zeigt, musste zwischen 19 und 151-fach angereichert werden, um 10%ige Zytotoxizität zu erzielen (EC10-Wert für Zytotoxizität). Die Lösungsmittelkontrolle zeigte bis REF 180 keinen Effekt. Die Messung der Aktivierung wurde daher nur mit Konzentrationen unterhalb des EC10 Wert für Zytotoxizität durchgeführt. Insgesamt wurde in den drei Wiederholungen des Versuches eine höhere Variabilität als in den anderen Experimenten beobachtet. Da wir erst seit sehr kurzer Zeit mit NFκB-bla Zellen arbeiten, ist es möglich, dass die Versuchsbedingungen noch nicht optimal sind und noch weiter optimiert werden sollten.

Tabelle 7: Ergebnisse aus dem NFκB-bla -Test mit Abwasserproben der KA Mannheim

	Zytotoxizität EC ₁₀ (REF)	Induktion der Entzündungsantwort EC _{R1.5} (REF)
MK1NKB	5,2	0,51 ± 0,05
MK2NKB	7,4	0,44 ± 0,09
MK3NKB	3,2	0,12 ± 0,02
MK1Fb	8,4	0,74 ± 0,13
MK2Fb	7,6	0,55 ± 0,05
MK3Fb	13,0	0,23 ± 0,02
MK1Fa	24,8	0,14 ± 0,02
MK2Fa	22,0	0,17 ± 0,02
MK3Fa	10,6	0,17 ± 0,02
Lösungsmittelkontrolle	> 180	> 180

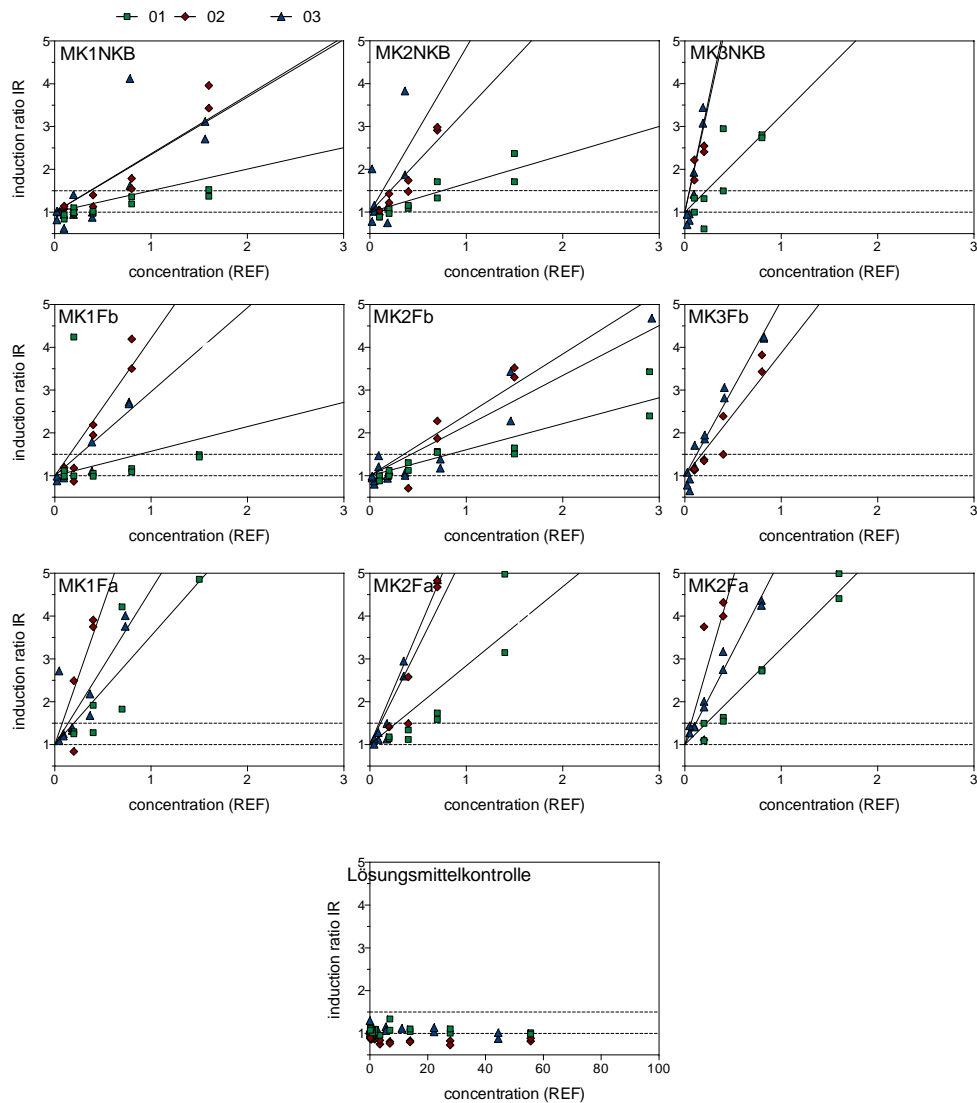


Abbildung 8: Konzentrations-Effektkurven aus dem NFκB-*bla* -Test mit Abwasserproben der KA Mannheim

Wie bei AREc32 gab es auch bei CellSensorR NFκB-*bla* einen deutlichen Unterschied zwischen Induktion der Entzündungsantwort und Zytotoxizität (s. Abb. 9), sodass die Ergebnisse in sich valide sind.

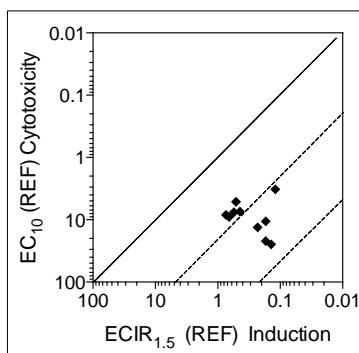


Abbildung 9: Induktion der Entzündungsantwort im Verhältnis zur Zytotoxizität im NFκB-*bla* -Test

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Die Effekte auf die adaptive Stressantwort sind erstaunlich hoch, wenn man berücksichtigt, dass nur 3 % der ToxCAST Stoffe aktiv waren. Diese hohe Aktivität wurde auch bereits bei Oberflächengewässerproben detektiert (nicht publiziert). In Proben der Donau beobachteten wir ECIR1.5 Werte von 7 bis 50 REF. Diese Werte stellen jedoch eine 10- bis 100-fach geringere Aktivität dar, als diejenigen, die in Proben der Kläranlage Mannheim gemessen wurde. Für detailliertere Aussagen zur Bedeutung der Messergebnisse sowie zur Belastung der Wasserproben aus der KA Mannheim sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Die Reinigungsleistung in Bezug auf Entfernung von Chemikalien, die zu Entzündungen führen, liegt bei 20-50 % ohne PAK (s. Abb. 10). Mit PAK erhöhen sich die Effekte oder werden nur leicht reduziert. Die Entfernung der Zytotoxizität ist konsistenter mit den Befunden für die anderen Zelllinien, allerdings hat diesmal die Probenahme 2 einen Ausreißer. Es muss dazu gesagt werden, dass das Zellwachstum bei der Durchführung der Versuche nicht optimal war. Das wirkt sich auf die Induktion kaum aus, da über die Verhältnisbildung von blauer und grüner Fluoreszenz quasi eine Korrektur für die Zellzahl gemacht wird, aber die Zytotoxizitätsmessung wird durch variable Zellzahlen weniger verlässlich.

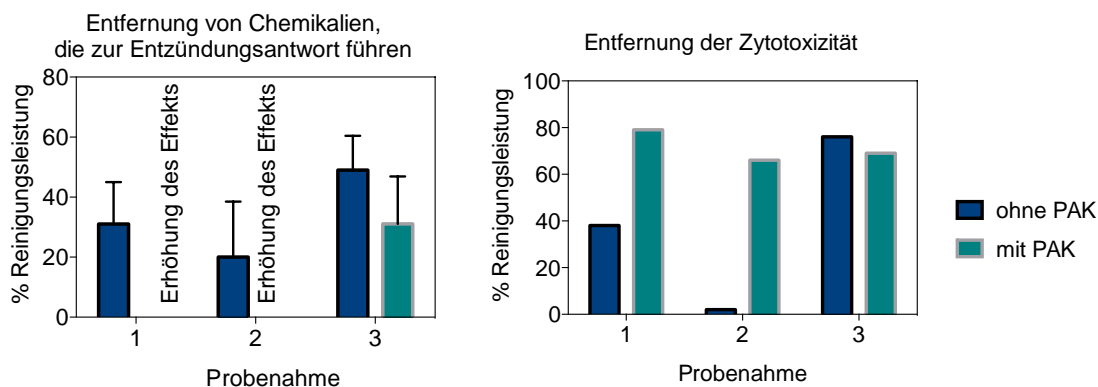


Abbildung 10: Reduktion der Effekte in den untersuchten Reinigungsstufen der KA Mannheim im NFκB-*bla* -Test

2.6 Östrogenität: E-Screen

Einleitung

Das hier angewendete Testsystem ist ein E-Screen-Assay (basierend auf menschlichen Brustkrebszellen MCF-7). Der Test stellt einen Proliferationstest dar, bei dem ein vermehrtes Wachstum bei Anwesenheit östrogenaktiver Verbindungen im Vergleich zu einer Kontrolle beobachtet werden kann.

Material und Methoden

Die Angabe der östrogenen Aktivität erfolgt in diesem Test als Summenparameter in Konzentrationseinheiten der Bezugssubstanz 17 β -Estradiol (EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration in ng/L). Die Bestimmungsgrenze des Testsystems liegt bei 0,01 – 0,1 ng/L. Es wurden unfiltrierte und filtrierte Proben untersucht.

Ergebnisse

Vergleicht man filtrierte und nicht filtrierte Proben miteinander, wird deutlich, dass in den Proben vom Nachklärbecken und vom normalen Filter F_b partikelgebundene Anteile mit östrogenen Aktivität enthalten sind, die durch die Filtration entfernt werden (Abb. 11). In der Adsorptionsstufe mit PAK konnte eine zusätzliche Elimination von 90 % beobachtet werden (s. Abb. 12). In der Vergleichsstraße wurde ebenfalls eine zusätzliche Elimination von 40-50 % ermittelt, welche vermutlich überwiegend auf Rückhalt partikelgebundener Östrogenität zurückzuführen ist. Weiterhin ist festzuhalten, dass der EEQ-Bereich im Ablauf der Nachklärung (NKB) den Ablaufkonzentrationen anderer konventioneller Kläranlagen (Beprobung im Frühjahr, in den kälteren Jahreszeiten ist aufgrund der geringeren Leistung der biologischen Stufe mit diesem Konzentrationsbereich zu rechnen) entspricht. Die Eliminationsleistung der Aktivkohlestufe in der KA Mannheim ist mit anderen Untersuchungen vergleichbar.

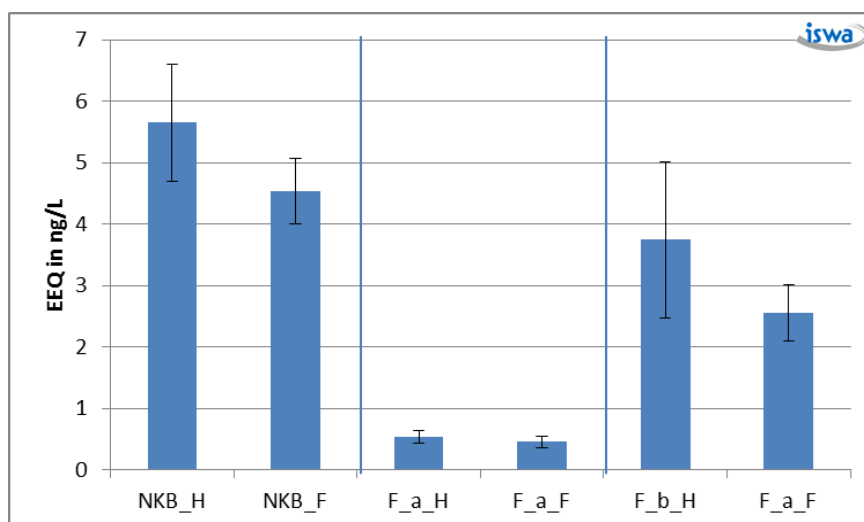


Abbildung 11: EEQ-Werte in nicht filtrierten und filtrierten Proben (jeweils Mittelwerte aus drei Proben). In NKB und F_b partikelgebundene Anteile der östrogenen Aktivität, die durch die Filtration entfernt werden

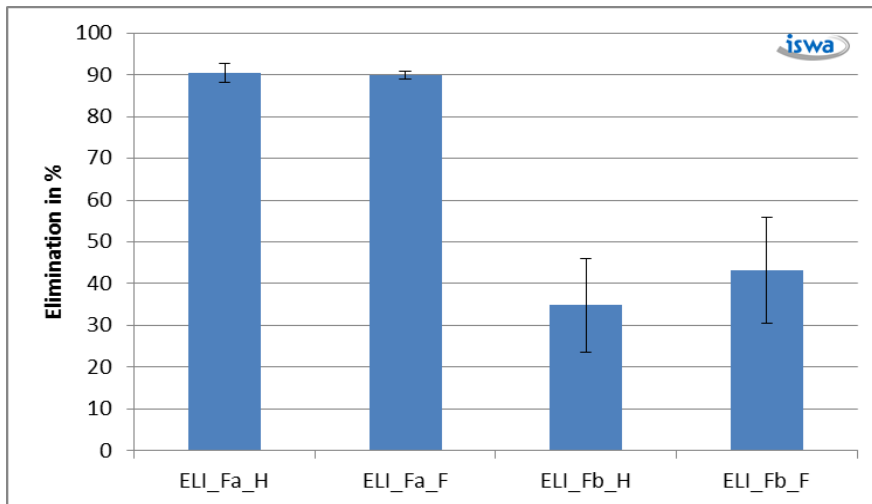


Abbildung 12: Elimination der östrogenen Aktivität – Mittelwert aus drei Beprobungen (Bezug Ablauf NKB; H: Elimination auf Basis der unfiltrierten Bilanzierungspaare, F: Elimination auf Basis der filtrierten Bilanzierungspaare)

2.7 Endokrine Aktivität in den Saccharomyces-Systemen

Einleitung

Die verwendeten Bioassays sind hefebasierte Reporter-Gen-Assays, bei denen die Aktivierung des humanen Östrogenrezeptors α (hER α), bzw. des Androgenrezeptors (hAR) mittels eines Lac-Z/ β -Galactosidase-Reporters untersucht wird. Die Rezeptoraktivierung (durch endokrin wirksame Substanzen in der Probe) wird hierbei mittels einer Farbreaktion detektiert, die von der β -Galactosidase katalysiert wird.

Material und Methoden

Die verwendeten Assays sind der Yeast Estrogen Screen (YES) und der Yeast Androgen Screen (YAS) zur Untersuchung agonistischer Effekte (Aktivierung hER α /hAR), die von Routledge & Sumpter (1996) und Sohoni & Sumpter (1998) beschrieben wurden. Um antagonistische Effekte, d. h. eine Inhibition der Hormonrezeptoren durch die Probe, zu detektieren, wurden Yeast Antiestrogen und Antiandrogen Screen (YAES/YAAS) angewendet. Die Durchführung und Auswertung der Bioassays wird ausführlich in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben (Wagner & Oehlmann, 2009; Stalter et al., 2011; Wagner et al., 2013a; Berger et al., 2015). Im vorliegenden Projekt wurden SPE-Extrakte (20-fache Endkonzentration, resultiert aus 10.000-fach konzentrierten Extrakten, die 500-fach im Assay verdünnt wurden) untersucht.

Da die Angabe von bio-Äquivalenten (z. B. EEQ) nur bedingt mit den Daten der anderen Projektpartner vergleichbar ist (Wagner et al., 2013b), wurden hier relative Aktivitäten dargestellt. Diese ergeben sich

aus einer Normalisierung der Reporterogenaktivität auf die Negativkontrollen (0 %) und die maximale Aktivität der Positivkontrolle (100 % Rezeptoraktivierung, agonistische Effekte) bzw. der Aktivität einer Kontrolle ohne Hintergrundagonist (simuliert 100 % Rezeptorinhibition, antagonistische Effekte).

Ergebnisse Östrogenität (YES) und Androgenität (YAS)

Im YES ließen sich deutliche östrogene Aktivitäten (29-38 % relative Aktivität) in den Proben der Nachklärung detektieren, die in den Messkampagnen 1 und 2 genommen wurden (Abb. 13). Die Behandlung mit PAK und anschließender Filtration (F_a) führte zu einer Reduktion der Östrogenität unter die Nachweisgrenze. Verglichen damit, reduzierte die Filtration ohne zusätzliche PAK-Behandlung die Aktivität zwar deutlich, jedoch unvollständig (8 %). Die Aktivität der Probe NKB der dritten Messkampagne war deutlich weniger aktiv (2 %) als die der vorangegangenen Probenahmen. Dementsprechend reduzierten beide Nachbehandlungen die Östrogenität auf ein nicht mehr detektierbares Niveau. Im YAS konnte in keiner der Proben eine androgene Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

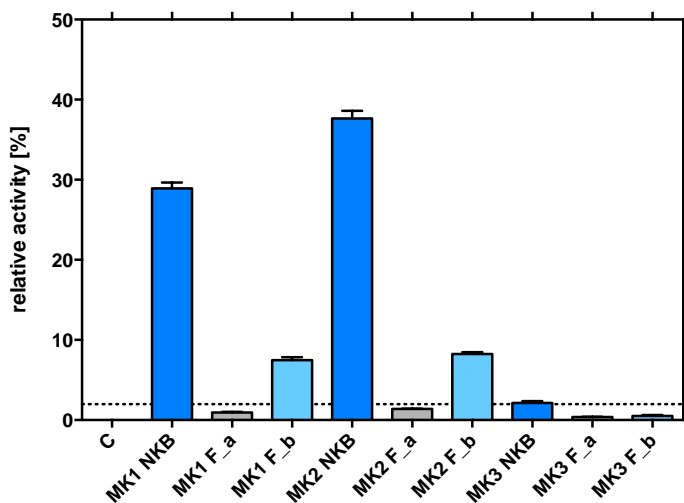


Abbildung 13: Aktivität der Proben der Nachklärung (NKB), PAK+Filtration (F_a) und Filtration (F_b) über drei Messkampagnen (MK1-3). Dargestellt ist die relative Aktivität der Proben im YES (n = 8). C = Kontrolle

Ergebnisse Antiöstrogenität (YAES) und Antiandrogenität (YAAS)

In Analogie zur Östrogenität im YES waren die Proben NKB der ersten und zweiten Messkampagne nicht antiöstrogen (negative Aktivität, Abb. 14). Die Proben der zusätzlichen Nachbehandlungen waren demgegenüber deutlich antiöstrogen aktiv. Die Stufe PAK+Filtration zeigte im YAES eine höhere Aktivität (60 %) als die Proben nach reiner Filtration (38 %). Die Probe NKB der dritten Messkampagne

war stark antiöstrogen aktiv (79 %), in den Nachbehandlungen wurde eine maximale Aktivität detektiert.

Im YAAS zeigten alle Proben eine starke Antiandrogenität (57-85 %). Bei den Proben der ersten beiden Messkampagnen führte die Nachbehandlung mit PAK+Filtration (F_a) zu einer leichten Reduktion der antiandrogenen Aktivität, die bei reiner Filtration (F_b) nicht beobachtet werden konnte. Die Proben der dritten Messkampagne zeigten wiederum ein anderes Aktivitätsprofil: Hier waren alle Proben gleichermaßen aktiv (83-86 %) (Abb. 15).

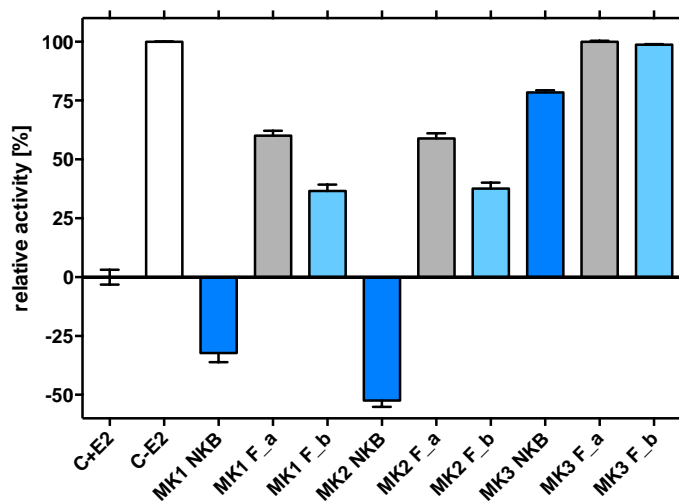


Abbildung 14: Antiöstrogene Aktivität der Proben der Nachklärung (NKB), PAK+Filtration (F_a) und Filtration (F_b) über drei Messkampagnen (MK1-3). Dargestellt ist die relative Aktivität der Proben im YAES (n = 24 aus drei Testwiederholungen). C+E2 = Negativkontrolle mit 17 β -Östradiol (0 % Rezeptorinhibition), C-E2 = Kontrolle ohne 17 β -Östradiol (100 % Rezeptorinhibition).

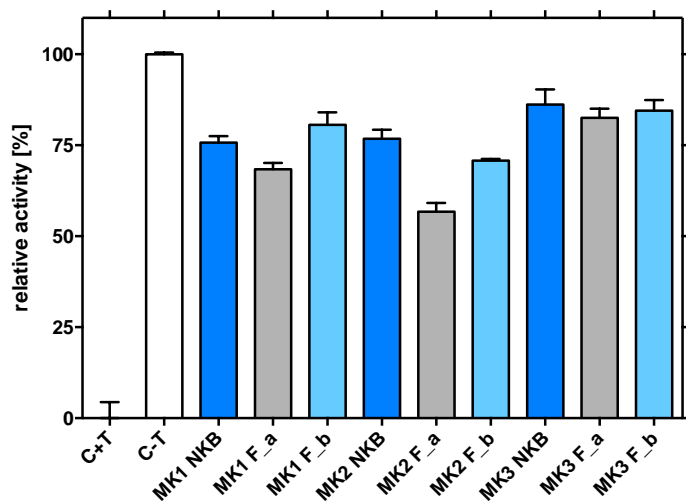


Abbildung 15: Antiandrogene Aktivität der Proben der Nachklärung (NKB), PAK+Filtration (F_a) und Filtration (F_b) über drei Messkampagnen (MK1-3). Dargestellt ist die relative Aktivität der Proben im YAAS (n = 8). C+T = Negativkontrolle mit Testosteron (0 % Rezeptorinhibition), C-E2 = Kontrolle ohne Testosteron (100 % Rezeptorinhibition).

Tabelle 8: Endokrine Aktivität der 20-fach konzentrierten SPE-Extrakte in den hefebasierten Reporterassays.

Assay		MK1 NKB	MK1 F_a	MK1 F_b	MK2 NKB	MK2 F_a	MK2 F_b	MK3 NKB	MK3 F_a	MK3 F_b
YES (%)	MW	28,9	0,93	7,48	37,7	1,38	8,24	2,12	0,38	0,53
n = 8	SEM	0,75	0,09	0,37	0,95	0,05	0,24	0,25	0,03	0,10
YES (ng EEQ/L)	MW	30,2	3,39	11,8	37,9	4,29	12,6	5,49	2,02	2,37
n = 8	SEM	0,64	0,18	0,36	0,86	0,09	0,23	0,37	0,10	0,28
YAES (%)	MW	-32,3	60,0	36,6	-52,5	59,0	37,6	78,5	100	98,7
n = 24	SEM	3,87	2,08	2,70	2,69	2,17	2,54	0,93	0,43	0,23
YAS (%)	MW	-1,33	-0,13	-0,87	-1,08	0,98	0,18	-2,26	-1,58	-1,65
n = 8	SEM	0,15	0,49	0,23	0,20	0,58	0,39	0,08	0,14	0,22
YAAS (%)	MW	75,7	68,4	80,6	76,8	56,8	70,8	86,2	82,6	84,5
n = 8	SEM	1,84	1,73	3,45	2,50	2,39	0,51	4,14	2,46	2,91

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Bei zwei von drei Probenahmen konnten deutliche östrogene Effekte im 20-fach konzentrierten Ablauf der konventionellen Klärung detektiert werden. In der Regel reduziert die biologische Abwasserbehandlung die Östrogenität bereits unter ein Niveau von 10 % relativer Aktivität (z. B. Stalter et al., 2011). Im Vergleich dazu ist die unzureichende Entfernung östrogen aktiver Substanzen durch die KA Mannheim auffällig und bedarf weiterer Untersuchungen. Bei der dritten Probenahme waren nur sehr schwache Effekte in der NKB detektierbar. Dies kann möglicherweise mit den

Betriebsparametern der Anlage zusammenhängen: In den Messkampagnen 1 und 2 wurde die Anlage mit einem Zulauf von ca. 60 000 m³ d⁻¹ betrieben, während es in der dritten Kampagne ca. 70 000 m³ d⁻¹ waren. Dies deutet auf ein Regenereignis hin, das zu einer Verdünnung des Abwassers und somit einer niedrigeren Aktivität geführt haben könnte. Eine Betrachtung der Wasserparameter widerspricht dieser Hypothese jedoch: Hier sind CSB, TOC und AFS nach der Nachklärung für alle drei Probenahmen vergleichbar. Die beobachteten Unterschiede in der Östrogenität der konventionellen Reinigung könnten auch auf Veränderungen in den Betriebsparametern der Anlage sowie in der Zusammensetzung des Rohabwassers zurückzuführen sein.

Einen weiteren Erklärungsansatz liefert die antiöstrogene Aktivität der NKB-Proben. Nach konventioneller Klärung wurde in den ersten beiden Messkampagnen keine Rezeptorinhibition detektiert. Demgegenüber war die Probe der dritten Kampagne stark antiöstrogen aktiv. Die Präsenz von Rezeptorantagonisten im YAES resultiert in einer niedrigen östrogenen Aktivität im YES, da diese Substanzen die Effekte der agonistisch wirkenden Substanzen überlagern können. Der Ursprung der antiöstrogen wirksamen Substanzen (und deren sporadisches Auftreten) kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht aufgeklärt werden. In den Nachbehandlungen wird ebenfalls Antiöstrogenität detektiert. Bei MK 1 und 2 sind die Aktivitäten nach der PAK-gekoppelten Filtration erstaunlicherweise höher als nach reiner Filtration. Auch hier könnten Mixtureffekte von agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen eine Erklärung liefern: Die PAK-Behandlung entfernt Östrogene wirksamer als die Filtration. Dies führt zu einer effektiveren Demaskierung der antiöstrogenen Wirkung, welche vermutlich nicht durch die adsorptiven Verfahren entfernt wird. Eine vermeintliche Erhöhung der antiöstrogenen Aktivität nach Aktivkohlebehandlung wurde bereits von Stalter et al. (2011) für die Kläranlage Neuss beschrieben.

Als zusätzlicher Endpunkt wurde die antiandrogene Aktivität untersucht. Hier zeigten alle Proben eine starke Aktivität. Während Stalter et al. (2011) eine ca. 60%ige Entfernung der Antiandrogenität mittels PAK (20 mg/L, 60 min Kontaktzeit) und anschließender Sandfiltration beschreiben, reduzierte die PAK-Behandlung der KA Mannheim die Aktivität nur um 10 % (MK 1) bzw. 26 % (MK 2). Eine Filtration ohne PAK führte zu keiner Verringerung der Antiandrogenität. Bei MK3 wurde keinerlei Entfernung festgestellt. Wie auch bei der Antiöstrogenität bleibt die Herkunft und Ursache der beobachteten antiandrogenen Aktivität unklar, da die verantwortlichen Substanzen weitestgehend unbekannt sind. Zwar ist bekannt, dass einige Östrogene (u.a. Bisphenol A, Nonylphenole) ebenfalls antiandrogen wirksam sind (Sohoni und Sumpter, 1998). Da die östrogene Wirkung allerdings gut von der Nachbehandlung der KA Mannheim entfernt wird, kann es sich nicht um diese Substanzen handeln. Um weitere Informationen über die ursächlichen Substanzen zu gewinnen, müsste in zukünftigen Untersuchungen ein Ansatz zur Effekt-geleiteten Analytik angewandt werden.

2.8 Reproduktionstoxizität: Chronischer Daphnientest

Einleitung

Der chronische Daphnien-Reproduktionstest wurde nach ISO-Norm 10706 (2000) durchgeführt. Ziel des Testverfahrens ist es, die Beeinträchtigung der Reproduktion von *Daphnia magna* durch Prüfsubstanzen zu bestimmen. Hierfür werden maximal 24 h alte Jungtiere einzeln mit verschiedenen Prüfsubstanzenkonzentrationen über 21 Tage exponiert. Der Daphnien-Reproduktionstest erfasst somit chronische Effekte im Hinblick auf wichtige Teile des Lebenszyklus von *Daphnia magna*. Wenn möglich, wird als Ergebnis die Konzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle 50 % der Nachkommen erzeugt werden (EC50), aus der Dosis-Wirkungs-Beziehung errechnet. Zusätzlich werden die niedrigste Konzentration, bei der Effekte beobachtet wurden (LOEC, lowest observed concentration), sowie die höchste Konzentration, bei der noch keine Effekte beobachtet wurden (NOEC, no observed effect concentration), angegeben und statistisch abgesichert. Der Fokus der Auswertung liegt insbesondere auf der Reproduktionsrate und dem Überleben der Elterntiere. Weitere Endpunkte wie Zeitpunkt des ersten Schlupfes, Dauereibildung, männliche Nachkommen, Mortalität bei Nachkommen, Länge der Muttertiere werden berichtet.

Material und Methoden

Die Prüfung wurde mit *Daphnia magna* (Straus) aus der Stammzucht des deutschen Umweltbundesamtes, Abteilung V 3.2, durchgeführt. Die eingesetzten Tiere werden im Labor der Hydrotox seit Oktober 2012 gezüchtet. Für die Kontrollansätze wurde M4 Elendt Medium (nach OECD 202) verwendet. Die Verdünnung der Probe für die Verdünnungsstufen G2 und G4 erfolgte ebenfalls mit M4 Elendt Medium. Die Einzelhalterung der Jungdaphnien erfolgte in je 50 mL Testlösung. Dreimal pro Woche wurden die Tiere in frisches Medium umgesetzt. Die Daphnien wurden täglich mit einer Algensuspension von *Desmodesmus subspicatus* gefüttert, um den C-Gehalt im Inkubationsgefäß bei 0.1 mg C pro Daphnie und Tag zu halten. Die Daphnien wurden bei 18 – 22 °C mit einer maximalen Schwankung von ± 1 °C und einem Hell-Dunkel Rhythmus von 16:8 Stunden gehältert.

Tabelle 9: Testvorgang und -durchführung; Uhrzeiten und Bedingungen

Testdurchführung:	Uhrzeit
1. Abtrennen der Jungtiere:	10.03.2015 um 15:00 Uhr
2. Entnahme der Jungtiere für den Test:	11.03.2015 um 9:00 Uhr
Teststart:	11.03.2015 um 14:00 Uhr
Medienwechsel:	Am 13.03.,16.03., 18.03., 20.03., 23.03., 25.03., 27.03. und 30.03.2015
Testende:	01.04.2015
Temperatur:	19,7 bis 21,1 °C

Die im Test verwendeten Daphnien waren zwischen 5h und 18h alt. Der pH-Wert der Proben wurde dokumentiert und nicht eingestellt. Geprüft wurden die Verdünnungsstufen G1,G2 und G4. Der pH-Wert und die Sauerstoff-Konzentration lagen in den Testansätzen und der Kontrollen zu Beginn und vor einem Medienwechsel während des gesamten Versuches im Bereich von pH 7,2 - 8,6 und O₂ 7,4 - 10,0 mg/L. Werktäglich wurde die Anzahl der Nachkommen entfernt und gezählt.

Ergebnisse

Die untersuchten Misch-Proben (MK1, 2, 3), F_a (Ablauf mit PAK), F_b (Ablauf ohne PAK) und NKB (Ablauf Nachklärbecken) der Kläranlage Mannheim zeigten in allen untersuchten Verdünnungsstufen (G1, G2 und G4) Fördereffekte der Nachkommen-Anzahl und auch im Größenwachstum der Muttertiere. Eine geringe Reduzierung der Fördereffekte mit zunehmender Verdünnungsstufe lässt sich bei den Proben F_b und NKB erkennen. Bei Probe F_a in G2 wurde mit 40,5 % die höchste Förderung festgestellt (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Ergebnisse des Daphnien Reproduktionstest

	Ansatz	Nachkommen	Std. Abw.	n	Hemmung [%]	Größe [mm]
Kontrolle		98,0	15,30	10	0,0	4,618
F_a	G4	120,0	16,10	10	-22,4*	4,831 (+4.6 %**)
	G2	138,0	11,40	10	-40,5	4,637 (+0,4 %)
	G1	126,0	22,10	9	-28,0	4,781 (+3.5 %)
F_b	G4	116,0	20,60	10	-17,8	4,887 (+5,8 %)
	G2	119,0	12,20	10	-20,9	4,732 (+2,5 %)
	G1	123,0	18,00	10	-25,4	4,868 (+5,4 %)
NKB	G4	120,0	11,20	10	-22,5	4,954 (+7,3 %)
	G2	127,0	16,20	9	-29,3	4,899 (+6,1 %)
	G1	130,0	15,10	10	-32,5	4,879 (+5,7 %)

* negative Hemmung entspricht Fördereffekt

** prozentuale Abweichung zur Kontrolle

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

Die Proben von der Kläranlage Mannheim zeigten alle deutliche Fördereffekte in der Daphnien-Reproduktion. Der undefinierte Nährstoff-Eintrag der Proben könnte hierfür verantwortlich sein. Eine mögliche Reproduktionshemmung durch Schadstoffe wird durch den Fördereffekt überdeckt.

2.9 Entwicklungstoxizität: Zebraärbling FET-Test

Einleitung

Mithilfe des Fischembryotests können entwicklungstoxische Potentiale in Umwelt- und Abwasserproben nachgewiesen werden. Anders als bei vielen anderen Testsystemen, die Reaktionen auf Zellen oder Enzyme detektieren, werden mit diesem Test mögliche Auswirkungen auf die frühen Entwicklungsstadien eines gesamten Organismus – in diesem Fall eines Fisches – erfasst. Der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführte Fischembryotest erfolgte in Anlehnung an den „Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test“ (OECD Guideline 236, 2013) sowie an den von Nagel (2002) entwickelten Embryotest (DarT). Der hier angewandte Test wird als sogenannter „verlängerter Embryotest“ bezeichnet, da er anders als der Fischembryotest nach Nagel (2002) eine 96-stündige Expositionszeit der Embryonen vorsieht. Durch diese verlängerte Expositionszeit können Reaktionen miteinbezogen werden, die erst nach dem Schlupf der Tiere, also ohne den protektiven Schutz der Eihülle, stattfinden. Einer der Vorteile dieses Tests ist, dass embryonale Stadien besonders sensibel auf die Einwirkung von Umweltproben und Schadstoffen reagieren können (Luckenbach et al., 2001; Scheil et al., 2010). Hierdurch können Aussagen zum Gefährdungspotential einzelner Schadstoffe bzw., wie im vorliegenden Fall, Aussagen zum entwicklungstoxischen Potential von Abwasserproben gemacht werden.

Bei dieser Untersuchung wurden sowohl native als auch 4-fach angereicherte Proben der KA Mannheim untersucht. Die Untersuchung der angereicherten Proben wurde durchgeführt, um evtl. vorhandene Unterschiede zwischen den Probestellen besser erkennen zu können.

Material und Methoden

Während des Tests wurden zu definierten Zeitpunkten teratogene, subletale und letale Endpunkte sowie die Schlupfrate festgehalten (s. Tab. 11). Zu den letalen Endpunkten werden z. B. die Koagulation des Embryos und ein fehlender Herzschlag gezählt. Zu den teratogenen Endpunkten (zu Fehlbildungen führend) gehören bspw. die Verformung des Kopfes, des Schwanzes und des Herzens, Dottersackdeformationen sowie die Retardierung des Wachstums.

Tabelle 11: Beobachtete Endpunkte im Fischembryotest

Endpunkte	Stunden nach Befruchtung							
	8 h	12 h	24 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h
Koagulation (Mortalität)	X	X	X	X	X	X	X	X
Schlupfrate					X	X	X	X
Entwicklungsverzögerungen								
Epibolie	X							
Gastrulation		X						
Somitenbildung			X					
Schwanzablösung			X					
spontane Kontraktionen			X					
Augenbildung			X					
Herzschlagrate(Schläge/min)				X				
Otolithenbildung					X			
Melanozytenbildung					X			
Fehlbildungen								
Ödeme (an Herz/Dottersack)					X			
Fehlbildung der Augen					X	X	X	X
Schwanzdeformationen					X	X	X	X
Deformation der Wirbelsäule					X	X	X	X
schwache/fehlerhafte Pigmentierung					X	X	X	X

Jede Probe wurde in drei unabhängigen Testdurchläufen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die Exposition der befruchteten Eier erfolgte in kleinen Glaspetrischalen. Vier Tage vor Versuchsbeginn wurden die gefrorenen Wasserproben im Kühlschrank bei 7 °C aufgetaut. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden für jede der untersuchten Probestellen acht Glaspetrischalen (30 mm Durchmesser, Schott Duran) mit dem jeweiligen Probenwasser über Nacht abgesättigt. Als Negativkontrolle dienten acht weitere Petrischalen, die mit einem Kontrollmedium (Kunstwasser nach ISO 7346/3) gefüllt wurden.

Kurz vor Testbeginn wurden die zur Absättigung eingefüllten Wasserproben durch frisches Probenmaterial ersetzt und auf 26 °C erwärmt. Im Anschluss daran wurden die befruchteten Eier der Zebraabärblinge aus den Becken entnommen und in die Testgefäße überführt, wobei in jede Glaspetrischale vier befruchtete Eier überführt wurden. Folglich wurde der Test mit 32 Eiern pro Probe durchgeführt. Während des Experiments wurden die Eier bei 26 ± 1 °C im Wärmeschrank bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h Licht /12 h Dunkelheit gehältert. Die Beobachtung der Embryonalentwicklung sowie die Bestimmung der Endpunkte wurden an einem Binokular (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt und erfolgten zu definierten Zeitpunkten (siehe Tabelle 11). Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen JMP 11.1 und Excel durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte anhand folgender Tests:

- Pearson D'Agostino Omnibus Test
- Levene-Test/nicht-parametrischer Levene-Test
- ANOVA, ggf. mit anschließendem Tukey HSD (honest significant difference) Test
- Wilcoxon Test, ggf. mit anschließenden Steel-Dwass Test
- Cox Regression
- Likelihood-Ratio Test, ggf. mit anschließendem Fishers Exact Test

Ergebnisse

Herzschlagrate

Bei der Untersuchung der Herzschlagraten konnten sowohl bei den nativen als auch bei den angereicherten Proben in keinem der Testdurchläufe signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den gegenüber den Ablaufproben exponierten Tieren nachgewiesen werden. In den Abbildungen 16 (native Proben) und 17 (angereicherte Proben) sind die gemittelten Werte aller durchgeführten Testdurchläufe dargestellt.

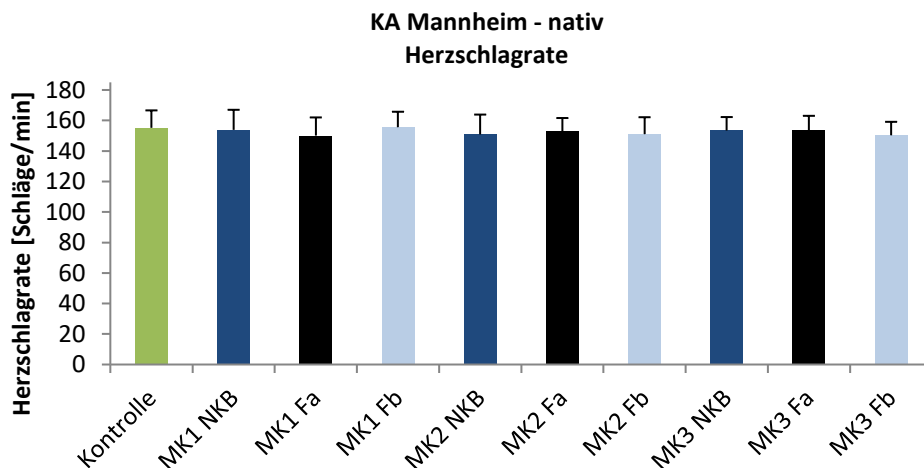


Abbildung 16: Herzschlagraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (native Proben) exponierten Fischembryonen

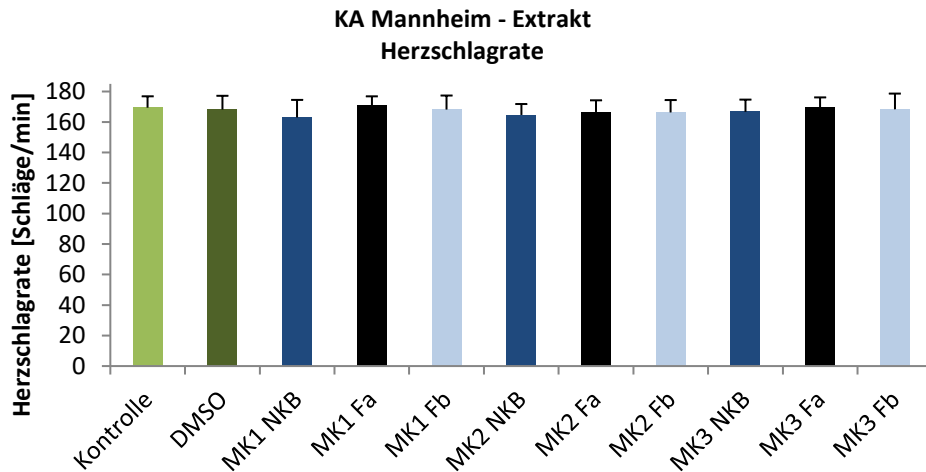


Abbildung 17: Herzschlagraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (angereicherte Proben) exponierten Fischembryonen; DMSO=Lösungsmittelkontrolle

Mortalität

In den Abbildungen 18 und 19 sind die gemittelten Mortalitäten aller durchgeführten Testdurchläufe dargestellt. In einigen der durchgeführten Testdurchläufe konnten bei einzelnen Testgruppen eine leicht erhöhte Mortalität von 1,6 bis 3,1 % beobachtet werden. In der statistischen Analyse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden.

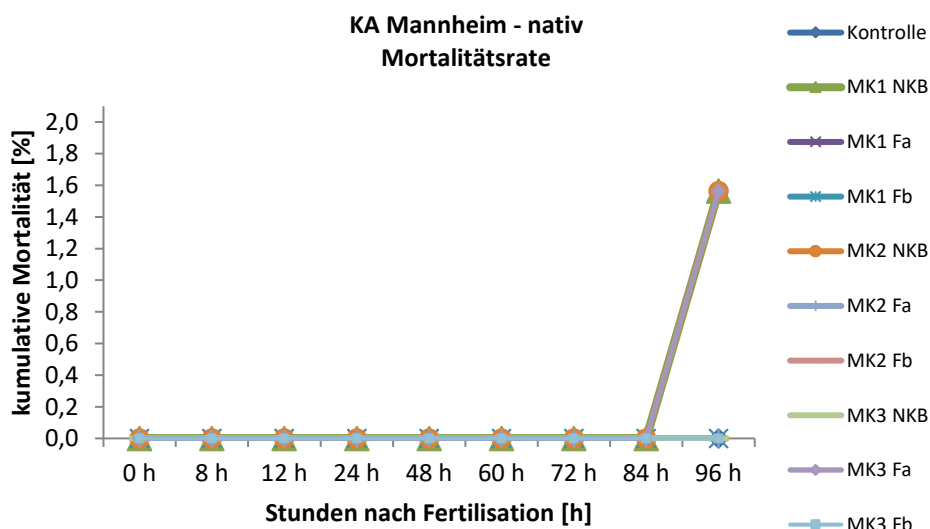


Abbildung 18: Mortalitätsraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (native Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe

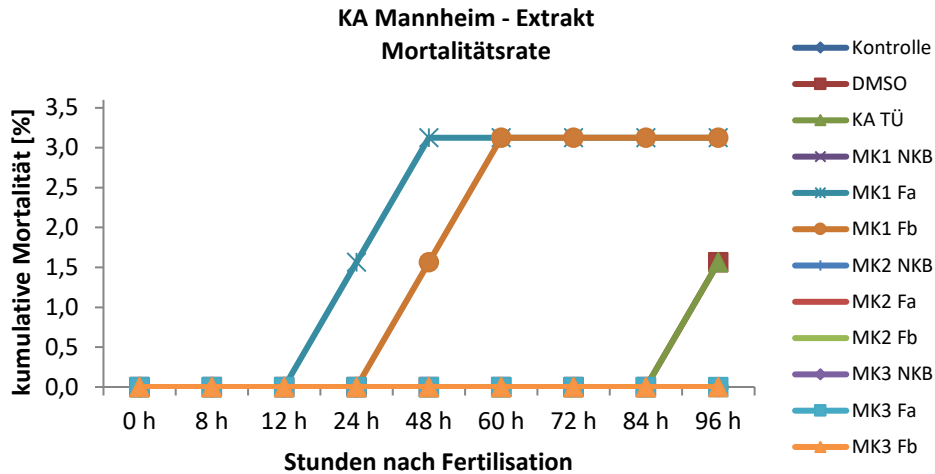


Abbildung 19: Mortalitätsraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (angereicherte Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe; DMSO=Lösungsmittelkontrolle

Schlupfrate

Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die gemittelten Schlupfraten aller durchgeführten Testdurchläufe. Mit einer Ausnahme lag die Schlupfrate in allen Testgruppen, sowohl nativ als auch angereichert, zwischen 97 und 100 %. Lediglich bei der Testgruppe MK1 NKB der nativen Proben konnte eine reduzierte Schlupfrate von 87,5 % beobachtet werden. Die statistische Auswertung der Schlupfraten lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

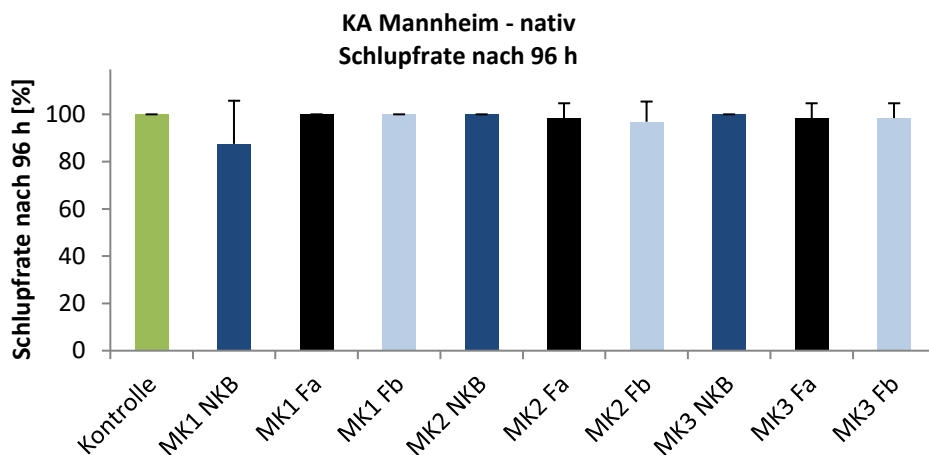


Abbildung 20: Schlupfraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (native Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe

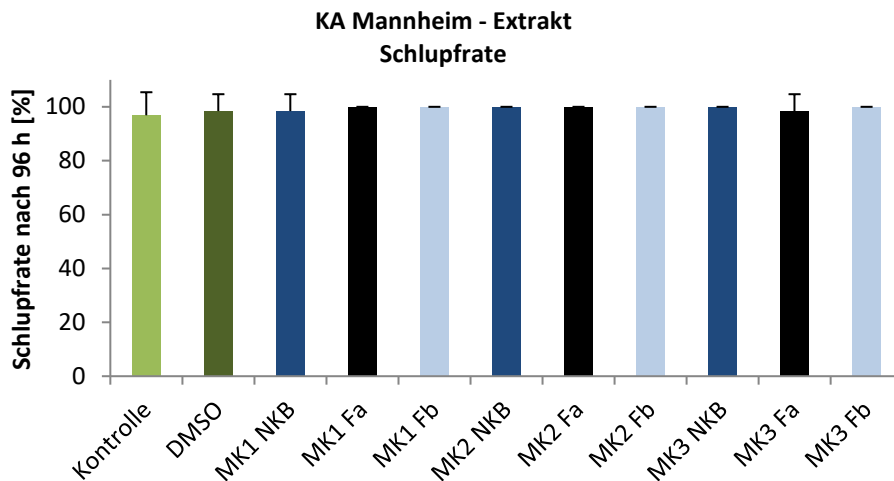


Abbildung 21: Schlupfraten der gegenüber Proben der KA Mannheim (angereicherte Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe; DMSO=Lösungsmittelkontrolle

Fehlbildungen

Die gemittelten Fehlbildungsraten aller durchgeführten Testdurchläufe sind in den Abbildungen 21 (native Proben) und 22 (angereicherte Proben) dargestellt. Die in den Tests beobachteten Fehlbildungen äußerten sich meist in Form von Ödemen. Bei einigen wenigen Tieren traten auch leichte Wirbelsäulendeformationen auf. In den meisten Testgruppen wurden nur geringe Fehlbildungsraten zwischen 1 und 2 % ermittelt. Lediglich die Testgruppe MK3Fa zeigte bei den Tests mit nativen Proben eine leicht erhöhte Fehlbildungsrate. In der statistischen Auswertung konnten mit einer Ausnahme in keinem der durchgeführten Testdurchläufe signifikante Unterschiede zwischen den exponierten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt werden.

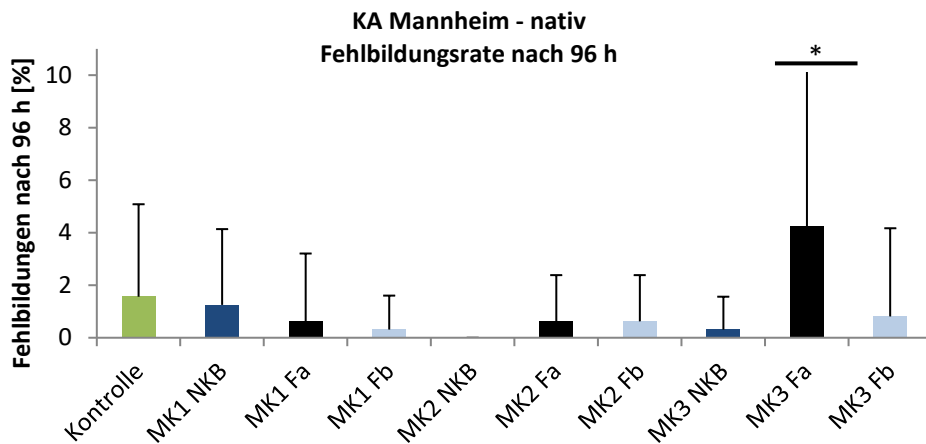


Abbildung 22: Fehlbildungsraten der gegenüber den Proben der KA Mannheim (native Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe

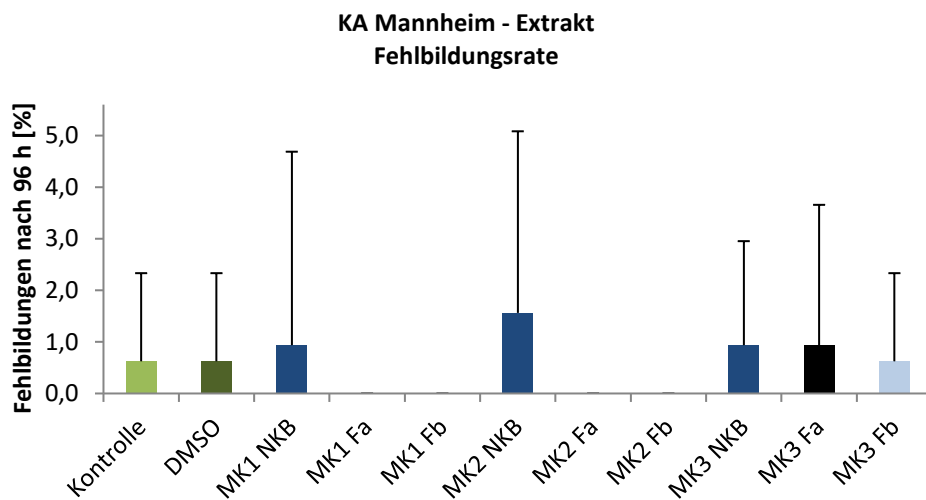


Abbildung 23: Fehlbildungsraten der gegenüber den Proben der KA Mannheim (angereicherte Proben) exponierten Fischembryonen; Mittelwerte aller durchgeführten Testdurchläufe; DMSO=Lösungsmittelkontrolle

Interpretation und Bewertung der Ergebnisse

In der Summe führten die Abwasserproben der KA Mannheim zu geringen embryotoxischen Effekten. Die meisten der beobachteten Effekte liegen im Bereich der biologischen Variabilität, weshalb man hier nicht auf ein embryotoxisches Potential der KA Mannheim schließen kann. Die reduzierte Schlupfrate der Gruppe MK1NKB lässt sich auf den ersten Testdurchlauf zurückführen, bei dem einige Testschalen der Gruppe MK1NKB eine geringe Schlupfrate aufwiesen. Ob dieser Effekt auf das Abwasser der KA Mannheim zurückzuführen ist, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Jedoch zeigten die anderen Testläufe, sowohl nativ als auch angereichert, eine 97 bis 100 %ige Schlupfrate dieser Gruppe, weshalb man hier von Artefakten ausgehen kann. Die erhöhte Fehlbildungsrate der Gruppe MK3Fa deutet auf einen embryotoxischen Stressor in der Probe hin. Sowohl in den nativen als auch in den angereicherten Proben zeigte diese Gruppe unter den mit PAK-behandelten Abwässern die höchsten Fehlbildungsraten. Der Vergleich mit den anderen Testsystemen zeigt, dass in diesen Proben von einem oder mehreren potentiellen Stressoren ausgegangen werden kann.

3. Zusammenfassende Bewertung (rot markiert empfohlene Tests)

Endpunkt	Aktivität NKB	Reduktion ohne PAK (% max)	Reduktion mit PAK (% max)	Unterschiede zwischen PN (Wann höchste Werte)	Eignung des Tests für KA-Ablauf?
Dioxinähnliche Toxizität (Aktivierung des Arylkohlenwasserstoff-Rezeptors)	hoch	45-46 %	54 bis 80 %.	1. PN	Ja (Extrakte)
Gentoxizität	keine	-	-	nein	Ja (wenn Gentoxizität vorhanden)
Gentoxizität / Zytotoxizität	keine	-	-	-	Nein (Induktionseffekte von Zytotoxizität maskiert)
Oxidativer Stress / Zytotoxizität	hoch	14-57 %	65-72 %	1. PN	Ja (Effekt deutlich von der Zytotoxizität abgegrenzt)
Entzündung / Zytotoxizität / Immunotoxizität /	hoch	20-50 %	- hohe Variabilität, Erhöhung	PN 3	Nein (Zytotoxizitätstest noch nicht optimiert. Die hohen Effekte nach PAK sind nicht erklärbar)
Östrogenität E-Screen	mittel (typisch für Jahreszeit)	50	90	PN 2 (NKB, ohne PAK)	Ja (Extrakte)
Östrogenität YES	mittel	97 %	78 %	PN 3	Ja (Extrakte)
Anti-Östrogenität	hoch	-27 % (Erhöhung)	-26 % (Erhöhung)	PN 3	Ja (Extrakte)
Androgenität	keine	-	-	nein	Ja (Extrakte)
Anti-Androgenität	hoch	26 %	8 %	nein	Ja (Extrakte)
Reproduktionstoxizität	keine (Förder-effekt)	Nein (Förder-effekt)	Nein (Förder-effekt)		Nein (native Proben) Extrakte? Zu großer logistischer Aufwand! Zu teuer; Alternativ: Test mit <i>Ceriodaphnia dubio</i> : Dauer nur 7 Tage!

Empfohlene Ökotox-Box für die Abwasserbewertung

Ökotox-Box für die Abwasserbewertung				
Art der Testsysteme	Art der Wirkung	Wirk-Endpunkt	Empfohlener Test	Begründung
<i>In vitro</i> -Tests	Spezifische Wirkung	Genotizität	Umu-C (Extrakte)	Kürzer als Ames-Fluktionstest (1-2 Tage statt 3-4 Tage)
		Östrogenität	E-Screen, YES (Extrakte)	E-Screen mit höherer Sensitivität
		Anti-östrogene, Anti(androgene) Wirkung	YAES, YAS, YAAS (Extrakte)	Einziges Testsysteme, robust
	Adaptive Stressantwort	Oxidativer Stress	ARE-c32 (Extrakte)	Robust, klar von Zytotoxizität abzugrenzen
<i>In vivo</i> -Testsysteme	Organismische Wirkung	Reproduktion	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Extrakte?)	Logistisch einfacher als Test mit <i>Daphnia magna</i>
		Entwicklung	Fisch-Embryotest mit Zebraquarienfisch (native Proben oder Extrakte)	Robust, logistisch einfach, indiziert starke Wirkungen

4.Referenzen

Berger, E., Potouridis, T., Haeger, A., Püttmann, W. and Wagner, M. (2015). "Effect-directed identification of endocrine disruptors in plastic baby teethers." *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.3159

Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P. and Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 141(1-2): 3-24.

Duerksen-Hughes, P.J., Yang, J. and Ozcan, O. (1999). p53 induction as a genotoxic test for twenty- five chemicals undergoing in vivo carcinogenicity testing. *Environmental Health Perspectives*, 107(10): 805-812.

Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Humpage, A., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J., van der Burg, B., van der Linden, S., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B., Zhang, X. and Leusch, F.D.L. (2014). Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environmental Science & Technology*, 48: 1940-1956.

Escher, B.I., Dutt, M., Maylin, E., Tang, J.Y.M., Toze, S., Wolf, C.R. and Lang, M. (2012a). Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *Journal of Environmental Monitoring*, 14: 2877-2885

Escher, B.I., Dutt, M., Maylin, E., Tang, J.Y.M., Toze, S., Wolf, C.R. and Lang, M. (2012b). Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *J. Environ. Monitor.*, 14(11): 2877-2885.

Escher, B.I., van Daele, C., Dutt, M., Tang, J.Y.M. and Altenburger, R. (2013). Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: the need for effect-based water quality trigger values. *Environmental Science & Technology*, 47(13): 7002-7011.

Giudice, A., Arra, C. and Turco, M.C. (2010). Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. In: *Transcription Factors: Methods and Protocols*, P. J. Higgins (ed.), Springer Science+Business Media, pp. 37-74.

Hallis, T.M., Kopp, A.L., Gibson, J., Lebakken, C.S., Hancock, M., VandenHeuvel-Kramer, K. and Turek-Etienne, T. (2007). An improved beta-lactamase reporter assay: Multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(5): 635-644.

Knight, A.W., Little, S., Houck, K., Dix, D., Judson, R., Richard, A., McCarroll, N., Akerman, G., Yang, C.H., Birrell, L. and Walmsley, R.M. (2009). Evaluation of high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast™ chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55(2): 188-199.

Luckenbach T, Killian M, Triebkorn R, Oberemm A (2001). Fish early life stages tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* (3-4): 355-370

Macova, M., Escher, B.I., Reungoat, J., Carswell, S., Chue, K.L., Keller, J. and Mueller, J.F. (2010). Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*, 44(2): 477-492.

Macova, M., Toze, S., Hodgers, L., Mueller, J.F., Bartkow, M.E. and Escher, B.I. (2011). Bioanalytical tools for the evaluation of organic micropollutants during sewage treatment, water recycling and drinking water generation. *Water Research*, 45(14): 4238-4247.

Martin, M.T., Dix, D.J., Judson, R.S., Kavlock, R.J., Reif, D.M., Richard, A.M., Rotroff, D.M., Romanov, S., Medvedev, A., Poltoratskaya, N., Gambarian, M., Moeser, M., Makarov, S.S. and Houck, K.A. (2010). Impact of environmental chemicals on key transcription regulators and correlation to toxicity end points within EPA's ToxCast program. *Chemical Research in Toxicology*, 23(3): 578-590.

Miller, S.C., Huang, R.L., Sakamuru, S., Shukla, S.J., Attene-Ramos, M.S., Shinn, P., Van Leer, D., Leister, W., Austin, C.P. and Xia, M.H. (2010). Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappa B signaling and their mechanism of action. *Biochemical Pharmacology*, 79(9): 1272-1280.

Nagel R (2002). DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model, *Ecotoxicology and Toxicology*. ALTEX 19, Suppl 1.

Nagy, S.R., Sanborn, J.R., Hammock, B.D. and Denison, M.S. (2002). Development of a greenfluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists. *Toxicological Sciences*, 65(2): 200-210.

Natsch, A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers-functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicological Sciences*, 113(2): 284-292.

Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 13291–13295. OECD (2013). Guideline for testing of chemicals, 236. Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD, Paris, France. <http://www.oecd.org>

Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(3): 241-248.

Scheil V, Zürn A, Triebkorn R, Köhler H-R (2010). Embryo development, stress protein (Hsp70) responses and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos and binary mixtures of them. *Environmental Toxicology* 25: 83-93.

Simmons, S.O., Fan, C.-Y. and Ramabhadran, R. (2009). Cellular Stress Response Pathway System as a Sentinel Ensemble in Toxicological Screening. *Toxicol. Sci.*, 111(2): 202-225.

Sohoni, P. and Sumpter, J. P. (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." *Journal of Endocrinology* 158(3): 327-339.

- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M. and Oehlmann, J. (2011). "Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity." *Water Research* 45(3): 1015-1024.
- Uda, Y., Price, K.R., Williamson, J. and Rhodes, M.J.C. (1997). Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by flavonoids. *Cancer Letters*, **120**(2): 213-216.
- Wagner, M. and Oehlmann, J. (2009). "Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles." *Environmental Science and Pollution Research* **16**(3): 278-286.
- Wagner, M., Schlusener, M. P., Ternes, T. A. and Oehlmann, J. (2013a). "Identification of putative steroid receptor antagonists in bottled water: Combining bioassays and high-resolution mass spectrometry." *Plos One* **8**(8).
- Wagner, M., Vermeirssen, E. L. M., Buchinger, S., Behr, M., Magdeburg, A. and Oehlmann, J. (2013b). "Deriving bio-equivalents from *in vitro* bioassays: Assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting." *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**(8): 1906-1917.
- Wang, X.J., Hayes, J.D. and Wolf, C.R. (2006). Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, **66**(22): 10983-10994.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., and Wolf, C.R. (2006). Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, **66**(22): 10983-10994.
- Yeh, R.Y.L., Farré, M.J., Stalter, D., Tang, J.Y.M., Molendijk, J. and Escher, B.I. (2014). Bioanalytical and Chemical Evaluation of Disinfection By-Products in Swimming Pool Water. *Water Research*, **59**: 172-184.
- Zhang, Q., Pi, J.B., Woods, C.G. and Andersen, M.E. (2010). A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **244**(1): 84-97.

Kapitel 2.2.1: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen

Korrespondenz Wasserwirtschaft (6) · Nr. 8 (2013); DOI: 10.3243/kwe2013.08.001

Rita Triebkorn (Tübingen), Ludek Blaha (Brno/Tschechien), Brigitte Engesser, Hans Güde, Harald Hetzenauer (Langenargen), Anja Henneberg, Heinz-R. Köhler, Stefanie Kraus, Diana Maier, Katharina Peschke, Paul Thellmann, Hans-J. Vogel (Tübingen), Bertram Kuch (Stuttgart), Jörg Oehlmann (Frankfurt), Magali Rault, Séverine Suchail (Avignon/Frankreich), Peter Rey (Konstanz), Doreen Richter, Frank Sacher (Karlsruhe), Michael Weyhmüller (Achberg) und Karl Wurm (Starzach)

Zusammenfassung

Durch den kombinierten Einsatz verschiedener Methoden ist nachweisbar, dass sich Spurenstoffe auf den Gesundheitszustand wasserlebender Organismen und die Integrität aquatischer Lebensgemeinschaft negativ auswirken. Im Projekt SchussenAktiv konnte die Präsenz von Spurenstoffen mit toxischen (z. B. genotoxischen) und hormonellen (z.B. östrogenartigen) Potentialen sowie tatsächlichen Wirkungen in Verbindung gebracht werden. Die große Variabilität im Nachweis östrogenartig wirkender Chemikalien spiegelt sich auch in der Variabilität der nachgewiesenen östrogenen Wirkpotentiale und Wirkungen bei Fischen und Fischnährtieren wider. Die reduzierte Anzahl sensibler Taxa unterhalb der untersuchten Kläranlage Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg) an der Schussen spricht dafür, dass sich negative Effekte bereits auf biozönotischer Ebene manifestiert haben. Ein Zusammenspiel toxischer und hormoneller Einflüsse auf die Organismen in der Schussen ist hierbei aufgrund der erzielten Resultate wahrscheinlich. Für die als Referenzgewässer ausgewählte Argen konnte gezeigt werden, dass die untersuchte Probenahmestelle zwar insgesamt als deutlich weniger belastet gelten kann als die Probenahmestellen an der Schussen, dass aber auch hier Bedarf besteht, bestimmte Expositionen (z. B. β -Sitosterol, Cadmium, Arsen, Quecksilber, Zink) und Effekte (z. B. Acetylcholinesterasehemmung bei Fischen, fehlende Abundanz von Gammariden) genauer zu betrachten um gegebenenfalls ihre Ursachen zu eruieren.

Schlagerwörter: anthropogene Spurenstoffe, Kläranlage, Schussen, Argen, Estrogene, Toxizität, Vorfluter

1. Einleitung

Der Eintrag von Spurenstoffen in Oberflächengewässer ist in den letzten Jahren verstärkt ins Zentrum des Interesses von Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit gerückt [1]. Die geplante Erweiterung der Liste prioritärer Substanzen gemäß Wasserrahmenrichtlinie hat dieses Interesse in jüngster Zeit deutlich verstärkt. Einhergehend mit dem steigenden öffentlichen Interesse und dem Wissenszuwachs

zur Thematik "Spurenstoffe" hat das Land Baden-Württemberg im Jahre 2009 im Rahmen seines Konjunkturprogramms beschlossen, die Nachrüstung einiger Kläranlagen im Einzugsgebiet des Bodensees mit Aktivkohlefiltern zu fördern, um den Eintrag von Spurenstoffen in die Gewässer zu mindern. Im Vordergrund stand hierbei am Bodensee aus Vorsorgegründen das Schutzgut Trinkwasser. Mit Aktivkohlefiltern ausgestattet werden bzw. wurden innerhalb dieses Programms im Bodensee-Einzugsgebiet die Anlagen Esparsingen (Zweckverband Stockacher Aach), Emmingen-Liptingen, Kressbronn-Langenargen sowie Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg). Im Fokus des Projektes SchussenAktiv, das den Erfolg der weiteren Abwasserbehandlung mit Aktivkohle auf Expositions- und Wirkebene überprüfen soll, stand die Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. Diese ist das größte Klärwerk im nördlichen Bodensee-Einzugsgebiet. Es ist schon heute mit einer Sandfiltration ausgestattet und reinigt eine Abwasserfracht von 170.000 Einwohner-Werten (ca. 80.000 Einwohner). Das gereinigte Abwasser wird in die Schussen abgeschlagen, in die neben der Kläranlage Langwiese noch 17 weitere mittlere und kleine Anlagen sowie zahlreiche Regenüberlaufbecken einleiten. In der Schussen wird eine relativ große Anzahl an Spurenstoffen in z.T. recht hohen Konzentrationen nachgewiesen [2]. Dies liegt einerseits an der dichten Besiedelung des 815 km² großen Schussen-Einzugsgebiets und daraus resultierenden hohen Eintragsmengen, andererseits aber auch an einer vergleichsweise geringen Verdünnung des eingeleiteten Abwassers aufgrund relativ niedriger Abflüsse (MQ 9-13 m³/s), die mit den relativ geringen Niederschlagsmengen im nordwestlichen Bodenseegebiet zusammenhängen. Die Argen, die im Projekt als wenig belastetes Vergleichsgewässer herangezogen wird, hat bspw. einen mittleren Abfluss von 22-23 m³/s bei einem Einzugsgebiet von 652 km².

Das Ziel des Projektes SchussenAktiv war es, die Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese mit einer Aktivkohlestufe zu dokumentieren. Da sich die Fertigstellung der Aktivkohle-Anlage in Langwiese allerdings verzögert hat und erst im Sommer 2013 in Betrieb gehen wird, stand im Rahmen des Projektes zunächst die Erfassung des ökotoxikologischen Zustands der Schussen vor dem Ausbau der Kläranlage (KA) im Fokus. Die weiteren Untersuchungen werden von 2012-2014 im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektverbundes "SchussenAktivplus" [3] weitergeführt. In diesem Projekt wird die Effizienz weiterführender Abwassertechniken zur Eliminierung von Spurenstoffen zusätzlich an zwei weiteren Kläranlagen sowie an zwei Regenwasserbehandlungssystemen untersucht.

Innovativ am Forschungsansatz von SchussenAktiv ist die kombinierte Betrachtung
(1) der Exposition mittels chemischer Analytik durch den Nachweis von Spurenstoffen im Kläranlagenablauf und im Oberflächenwasser sowie im Sediment und in Biota,

(2) der Überprüfung von in Umweltmatrices (Kläranlagenabläufe, Oberflächenwasser oder Sediment) vorhandenen toxischen und endokrinen Wirkpotentialen in Labortests und

(3) der tatsächlichen Effekte in Biota aus dem Freiland bzw. solchen Organismen, die aktiv im Freiland in Bypass-Systemen exponiert wurden.

Diese Kombination erlaubt eine komplementäre und umfassende Bewertung der Belastungssituation. Während die chemische Analytik stoffspezifische Fragestellungen nach Präsenz oder Verbleib von Chemikalien in Umweltmatrices beantworten kann, stößt sie an Grenzen, sobald das gesamte Spektrum an vorhandenen chemischen Belastungsfaktoren erfasst werden soll. Grund hierfür ist, dass die Auswahl der zu analysierenden Stoffe a priori die Anzahl potentiell im Gewässer nachweisbarer Chemikalien bestimmt bzw. einschränkt. Zudem ist der chemische Charakter vor allem von Metaboliten und Transformationsprodukten anthropogener Substanzen, wie sie bspw. bei der Ozonung von Abwasser entstehen können, derzeit vielfach noch unbekannt, so dass diese Stoffe analytisch (noch) nicht greifbar sind. Problematisch kann auch sein, dass Stoffe in so niedrigen Konzentrationen vorliegen, dass die Nachweisgrenzen unterschritten werden. Dies ist vor allem in komplizierteren Matrices, wie Sedimenten oder Biota, der Fall. Wirkpotential- und Effektanalysen haben den Vorteil, dass sie über ein je nach Testsystem mehr oder weniger großes und spezifisches Spektrum an Belastungsfaktoren integrieren. Die Potentialanalytik vermittelt hierbei ein Bild vom Belastungszustand der Umweltprobe zum Zeitpunkt der Probenahme im Sinne einer Momentaufnahme. Wirkungen bei Freilandorganismen oder bei Organismen, die aktiv im Freiland exponiert werden, übermitteln komplementär hierzu Informationen zum Belastungszustand der jeweiligen Probestelle bis zum Zeitpunkt der Beprobung im Sinne einer Langzeitaufnahme. Da alle Methoden auf zeitgleich entnommene Umweltproben angewendet wurden, können im Rahmen von SchussenAktiv Querverbindungen zwischen den Ergebnissen geknüpft und Plausibilitätsketten erstellt werden.

2. Methodik

Von 2009 bis 2011 wurden zu neun Zeitpunkten von der KA Langwiese 24h-Mischproben vom KA-Ablauf sowie zeitgleich Wasserproben, Sedimente, Fische und Flohkrebse an mehreren Probestellen an der Schussen und an der Argen (als Referenzgewässer) entnommen. Die Proben wurden für chemische Analysen von Spurenstoffen, Wirkpotentialanalysen und Wirkuntersuchungen genutzt. Zeitgleich wurden alle Probestellen limnochemisch charakterisiert. Die Spurenstoffanalytik fand am DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe statt, limnochemische Untersuchungen wurden von der Universität Tübingen durchgeführt. Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Schneider (*Alburnoides*

bipunctatus) wurden vom Seenforschungsinstitut Langenargen durch Elektrofischung aus den Gewässern entnommen. In vom Bachwasser durchflossenen Aquarien (Bypass-Systeme) an der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese sowie an der Argen bei Wangen (als Referenzgewässer) wurden Bach- und Regenbogenforellen sowie Flohkrebse aktiv exponiert und Embryotests mit Regen- und Bachforelleneiern durchgeführt. Die vorliegende Publikation enthält Daten zu den Kläranlagenabläufen sowie zu den Proben, die unterhalb der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg und an der Argen gewonnen wurden. Die für Wirkpotential- und Wirkanalytik eingesetzten Methoden sowie die bearbeitenden Institutionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Weiterführende Informationen zur Methodik und zum Aufbau der Bypass-Systeme sind [3] zu entnehmen. Die Lage der Probestellen sowie der Bypass-Systeme sind auf Abb. 1 dargestellt.

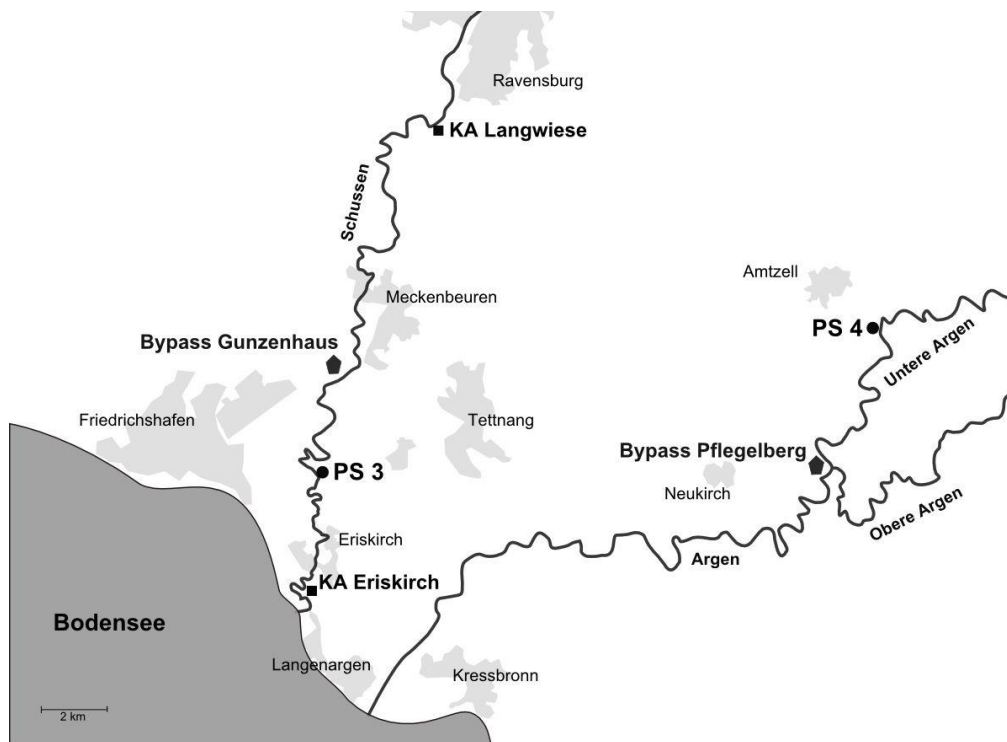


Abb. 1: Lage der Probestellen, für die Ergebnisse beschrieben werden, und der Bypass-Systeme an Schussen und Argen.

Tab. 1: Durchgeführte Untersuchungen im Rahmen von SchussenAktiv

	Potentiale	Effekte	
T O X I S C H E	Gentoxizität umu-Test (Recetox Brno)	Gentoxizität Mikrokerntest (Universität Tübingen)	
	Dioxin-ähnliche Toxizität Reportergeren-Assays (Recetox Brno)	Dioxin-ähnliche Toxizität Cyp-1A-1-Biotransformation/ EROD (Universität Tübingen)	
	Entwicklungstoxizität ELS-Test Zebraabärbling (Universität Tübingen)	Entwicklungstoxizität ELS-Test Forellen (Universität Tübingen)	
		Gewebetoxizität Histopathologie (Universität Tübingen)	
		Proteotoxizität Stressproteine (Universität Tübingen)	
		Neurotoxizität Acetylcholinesterase (Universität Avignon)	
		Integrität Lebensgemeinschaft Makrozoobenthos (GÖL Starzach)	
	E N D O K R I N E	(Anti)-Östrogenität E-Screen, Reportergeren-Assay mit menschlichen Zellen (MVLN, HeLa9903) (Recetox Brno) Reproduktionstests mit der Zwergdeckelschnecke <i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Universität Frankfurt)	Östrogenität Vitellogenin (Universität Tübingen)
			Östrogenität-Androgenität Gonadenhistologie und gonadosomatischer Index Fische, Geschlechterverhältnis und Fekundität Gammariden (Universität Tübingen)

3. Zusammenfassung und Diskussion der Resultate

Das Projekt SchussenAktiv hatte zum Ziel, den ökotoxikologischen Zustand der Schussen im Vergleich zur Argen vor Ausbau der Kläranlage (KA) Langwiese zu beschreiben. Hierzu wurden im KA-Ablauf, im Oberflächenwasser (OFW) und in Sedimenten der Schussen unterhalb der KA (im Vergleich zur Argen) sowie in Biota chemische Analysen auf verschiedene Stoffgruppen durchgeführt. Im Rahmen von Labortests wurden toxische und hormonelle Potentiale im Ablauf der KA und im OFW bzw. Sediment der Schussen (im Vergleich zur Argen) bewertet. Parallel hierzu wurden reale endokrine und toxische Wirkungen bei Freilandtieren oder bei Tieren, die aktiv im Freiland exponiert wurden, untersucht.

3.1 Chemische Analysen

Die chemischen Analysen zeigen ein differenziertes Bild zur Belastungssituation des Oberflächenwassers der Schussen unterhalb der KA Langwiese mit Spurenstoffen im Vergleich zur Argen. Im Ablauf der KA wurden von 75 untersuchten Spurenstoffen 29 Verbindungen in Konzentrationen über der Nachweisgrenze gefunden, im Oberflächenwasser der Schussen traten davon 21 auf (Abb. 2). Der Spurenstoff-"Cocktail" war zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedlich zusammengesetzt. In der Schussen waren insgesamt deutlich mehr Substanzen als in der Argen nachzuweisen (Argen: 12 Stoffe), und diese traten in den meisten Fällen auch in deutlich höheren Konzentrationen auf als an der Argen (Abb. 3). Allerdings waren auch vereinzelt Substanzen in Oberflächenwasser (OFW) bzw. in Biota aus der Argen in höheren Konzentrationen vorhanden als in der Schussen (z. B. das Phytoöstrogen β -Sitosterol oder die Schwermetalle Arsen und Cadmium), was vor dem Hintergrund der deutlich stärkeren Verdünnung von Abwasser in der Argen aufgrund höherer Abflüsse umso bedeutender ist.

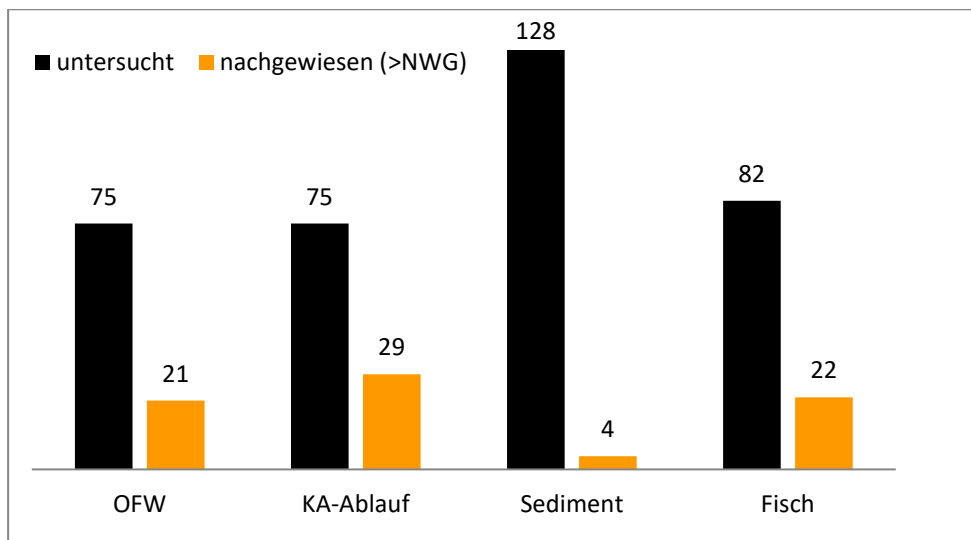


Abb. 2: Anzahl untersuchter und maximal nachgewiesener Substanzen im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser (OFW) und Sediment der Schussen unterhalb der KA Langwiese sowie in unterhalb der KA Langwiese gefangenen Fischen (Döbel und Schneider)

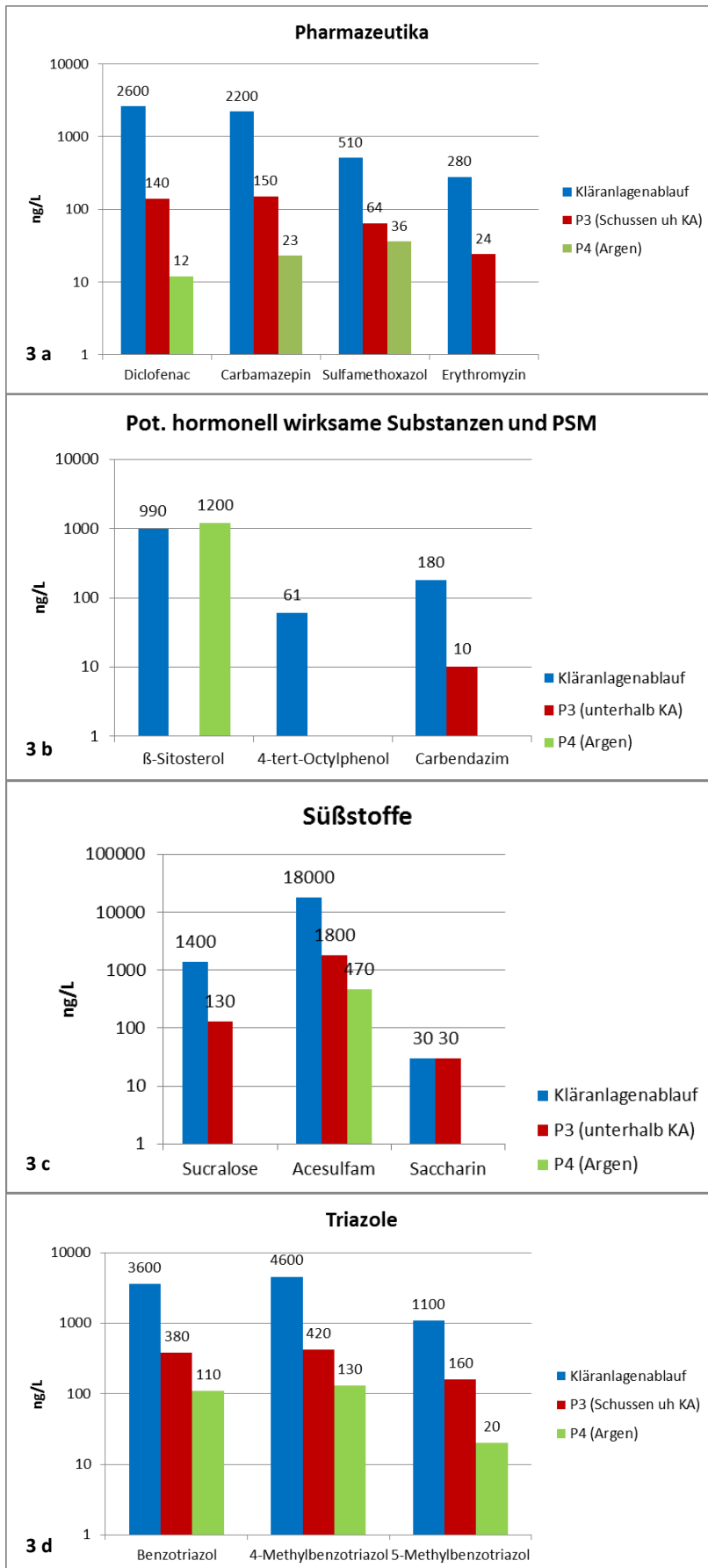


Abb. 3 a-d: Konzentrationen ausgewählter Substanzen (Maximalwerte) im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser der Schussen unterhalb der KA (P3) und in der Argen (P4).

Für mehrere Stoffe (z.B. Carbamazepin, N,N-Dimethylsulfamid, Sucralose, Benzotriazol) konnte der Eintrag über die KA Langwiese als bestimmend für die Konzentration im Vorfluter festgemacht werden. Üblicherweise lagen die Konzentrationen im OFW um den Faktor 3-10 niedriger als im KA-Ablauf, was etwa dem Verhältnis von gereinigter Abwassermenge zur Wasserführung der Schussen entspricht. Stoffe, die im KA-Ablauf in geringen Konzentrationen (z. B. 4-tert-Octylphenol: 61 ng/L; Bisphenol A: 24 ng/L) nachgewiesen wurden, lagen aufgrund des Verdünnungseffekts im OFW meist in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vor. Andere Spurenstoffe, wie z. B. Diclofenac, Ethanolamin oder Coffein waren oberhalb der Kläranlage bereits in vergleichbaren oder sogar etwas höheren Konzentrationen als flussabwärts vorhanden. Hierfür verantwortlich können Einträge bzw. Eintragungsspitzen aus Kläranlagen oberhalb der KA Langwiese sein. Vor dem Hintergrund der vorgeschlagenen Erweiterung der Liste prioritärer Stoffe der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) sowie der zu erwartenden Umweltqualitätsnormen (UQN) würden sich für Diclofenac im Oberflächenwasser der Schussen Grenzüberschreitungen ergeben.

In Fischen konnten 22 von 82 untersuchten Spurenstoffen nachgewiesen werden (Abb. 2). Alle im Projekt erhobenen Daten zu Spurenstoffgehalten in Fischen sind auf das Trockengewicht (TG) bezogen. Es ist davon auszugehen, dass die Messwerte für persistente Stoffe bezogen auf das TG (berechnet für Brachsen aus dem Bodensee) ungefähr um den Faktor 3-4 höher liegen als diejenigen bezogen auf das Frischgewicht (FG) (Hetzenauer, pers. Mitt.). Untersucht wurden von Döbeln primär Leberproben und Muskulatur (Filet), in einigen Fällen auch Gonaden, Darm und Gallenflüssigkeit, bei deren Entnahme die Gallenblase punktiert wurde. Von Schneidern wurde jeweils ein Pool aus 3-4 Fischen *in toto* analysiert.

Die Ergebnisse der Metallanalysen sind in Abb. 4 zusammengefasst. Auffällig ist, dass die Fische aus der Schussen nur für Zink und Kupfer höhere Werte zeigen als die Fische aus der Argen, in denen sehr hohe Gehalte an Arsen, Cadmium und Quecksilber nachgewiesen wurden. Mit max. 750 µg/kg TG (Döbel Schussen) bzw. 910 µg/kg TG (Döbel Argen) liegen die Werte für Quecksilber in Fischen aus Schussen und Argen deutlich über der für dieses Schwermetall existierenden UQN für Biota der WRRL von 20 µg/kg. Sowohl die Zink-, als auch die Kupferkonzentrationen in den Fischen aus der Schussen sind als sehr hoch einzustufen und liegen um den Faktor 4-10 höher als Werte, die für Döbel aus der Mureş in Rumänien (wenig dicht besiedeltes Gebiet) auch unterhalb von Kläranlagen gemessen wurden [4]. Bachforellen, die in einem ebenfalls stark Abwasser-beeinflussten Gewässer, der Körsch bei Stuttgart exponiert waren, akkumulierten nur ein Drittel an Cadmium und Zink. Die Kupferkonzentrationen in Döbeln aus der Schussen sind mehr als 30-fach höher als entsprechende Werte aus Forellen aus der Körsch [5].

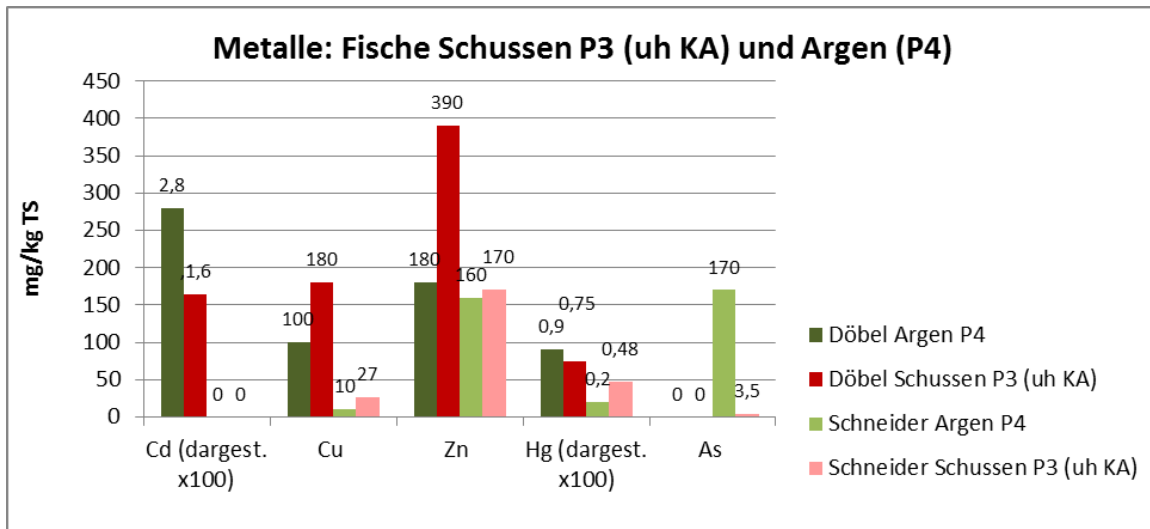


Abb. 4: Metallgehalte (Maximalwerte) in Fischen aus der Schussen unterhalb der KA Langwiese (P3) und Argen (P4)

Die Konzentrationen ausgewählter persistenter Stoffe in Fischproben sind in Abb. 5 zusammengefasst. Der PCB-Gehalt (Summe 6 Indikator-PCB) im Filet der untersuchten Döbelproben liegt im Bereich der Werte, die für Döbel aus verschiedenen tschechischen Gewässern bestimmt wurden [6]. Geht man davon aus, dass die Werte bezogen auf das Frischgewicht ungefähr um den Faktor 3-4 niedriger liegen als diejenigen bezogen auf das Trockengewicht, liegen die Werte für Döbel und Barbe aus der Schussen zwar noch unterhalb, allerdings auch für das Filet bereits im Bereich des von der EU formulierten Höchstwerts von 125 ng/g FG [7]. Werte für Fische aus relativ unbelasteten Gewässern bewegen sich laut Kuch (pers. Mitt.) im Bereich von 5-10 µg/kg FG. Die Messwerte für alle im Projekt untersuchten Fischarten liegen hier deutlich höher, wobei das Filet einer zusätzlich untersuchten Barbe (*Barbus barbus*) mit einer Konzentration von ca. 100 µg/kg FG am stärksten belastet ist. Durchschnittswerte für eine Belastung von Fischen mit DDX liegen laut Kuch (pers. Mitt.) in der Größenordnung von ca. 5 bis 10 ng/g FG. Die Konzentrationen in Schneidern und Döbeln aus der Schussen sind demnach als moderat, diejenigen in der Barbe als eher hoch zu bewerten. Allerdings liegen alle Konzentrationen für Fische aus der Schussen weit unterhalb der Höchstwerte, die in Döbeln aus tschechischen Gewässern gemessen wurden [6]. Die Messwerte für

Methyltriclosan, einem Metaboliten des Antibakterizids Triclosan, liegen im Bereich der aus der Umweltprobenbank für Brassen (*Abramis brama*) aus deutschen Fließgewässern zu entnehmenden Werte [8]. Sie sind deutlich geringer als die Maximalwerte, die von [9] für Karpfen ermittelt wurden (596 µg/kg FG). Triclosan selbst verursacht sowohl cancerogene (Lebertumore), gentoxische als auch endokrine Effekte [10], [11].

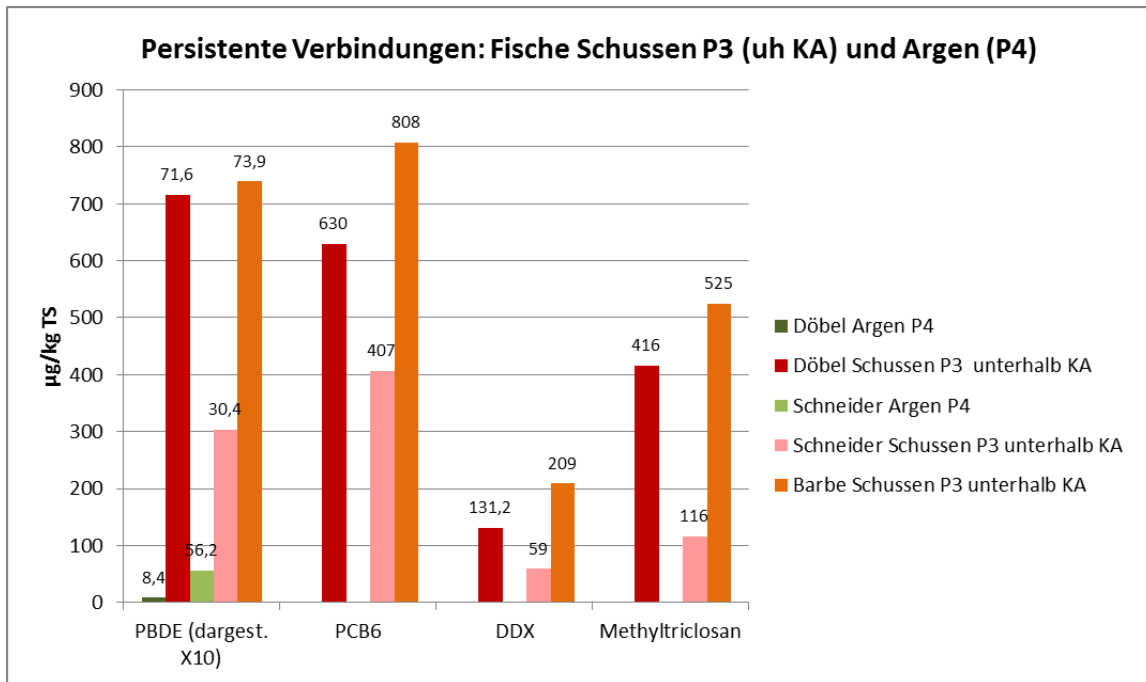


Abb. 5: Konzentrationen von persistenten Verbindungen in Fischen (Maximalwerte) aus der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese (P3) der Argen (P4)

Polybromierte Diphenylether (PBDE) wurden ebenfalls in den höchsten Konzentrationen in Geweben einer Barbe nachgewiesen. Allerdings liegen auch die PBDE-Konzentrationen für Döbel und Schneider weit über der von der EU vorgesehenen (extrem niedrigen) UQN für Biota von 0,0085 µg/g FG [12]. Die Messwerte für Döbel liegen im mittleren Bereich der von [13] erhobenen Werte für Döbel aus der Elbe. Die Messwerte für PBDE in Gammariden, die unterhalb der KA Langwiese entnommen wurden, liegen in der Größenordnung der Werte für Fische an dieser Probestelle. Deutliche Unterschiede zwischen Fischen und Gammariden findet man in der Verteilung der akkumulierten PBDE-Kongenere: Während bei Fischen BDE-47 mehr als 90 % der Gesamt-BDE ausmacht, dominiert bei Gammariden aus der Schussen die wesentlich hydrophobere Verbindung BDE-209. Ob dies mit Kongener-spezifischer Aufnahme bzw. Akkumulation bei den beiden Arten zusammenhängt, ist derzeit nicht bekannt.

Die meisten der untersuchten endokrin wirksamen Verbindungen konnten nicht in den Geweben der untersuchten Fische nachgewiesen werden. In hohen Konzentrationen trat allerdings das Phytoöstrogen β -Sitosterol, in sehr geringen Konzentrationen 4-tert-Octylphenol in Fischen aus Schussen und Argen auf. Die hohen Messwerte für β -Sitosterol in Fischen aus der Argen lassen sich in Zusammenhang mit den im Oberflächenwasser nachgewiesenen hohen Konzentrationen dieser Verbindung bringen (s.o.). Da das östrogene Potential dieses Phytoöstrogens allerdings im Vergleich zu synthetischen oder natürlichen Hormonen um den Faktor 10^4 geringer ist [14], sind von dieser Substanz ausgehende hormonelle Potentiale in Schussen und Argen als eher gering einzuschätzen.

3.2. Hormonelle und toxische Wirkpotentiale und reale Wirkungen

Ein Ziel des Projektes war es, die Relevanz der Ergebnisse aus Wirkpotentialtests im Labor für tatsächliche Wirkungen in Organismen aus dem Freiland (oder solchen, die dort aktiv exponiert wurden) zu überprüfen. Auf Plausibilität beruhende Zusammenhänge mit möglicherweise für die Effekte verantwortlichen, im Rahmen des Projektes in den untersuchten Umweltmatrices nachgewiesenen Chemikalien wurden hergestellt. Hormonelle Potentiale, für welche Chemikalienkonzentrationen sogar unterhalb der chemisch-analytischen Nachweisgrenzen sowie Summeneffekte verantwortlich sein können, wurden im Rahmen von SchussenAktiv mit *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen untersucht. Mit dem E-Screen-Test, der auf der durch endokrin wirksame Chemikalien induzierten vermehrten Teilung menschlicher Brustkrebszellen (MCF-7) basiert, wurde so z.B. eine östrogene Gesamtaktivität von max. 4,6 ng/L Östrogenäquivalente (EEQ) im KA-Ablauf bzw. max. 1,7 ng/L (EEQ) im Oberflächenwasser der Schussen ermittelt. Im Sediment der Schussen wurden mit Reporterassays, welche die transformierte Mammakarzinomzelllinie (MVLN) und die Zelllinie HeLa-9903 nutzen, geringe östrogene und anti-östrogene Potentiale ermittelt (Abb. 6). Vor dem Hintergrund, dass hormonelle Effekte durch Chemikalienkonzentrationen im unteren Nanogramm-Bereich ausgelöst werden können, trägt die biologische Wirkpotentialanalytik, wie sie bspw. vom E-Screen-Test oder den im Projekt eingesetzten Reporterassays geleistet wird, dazu bei, in einem Konzentrationsbereich Vorsorge treffen zu können, der mit instrumenteller Analytik (noch) nicht erfasst werden kann. Durch die *in vivo* durchgeführten Reproduktionstests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* wurden nicht nur, wie mit den Reporterassays, in Sedimenten aus der Schussen, sondern auch in solchen aus der Argen sehr starke östrogenähnliche Potentiale nachgewiesen. Dieser Unterschied ist möglicherweise durch eine sehr viel höhere Sensitivität der im *in vivo*-Tests eingesetzten Testorganismen im Vergleich zu den im *in vitro*-Test verwendeten Zell-Linien zu erklären.

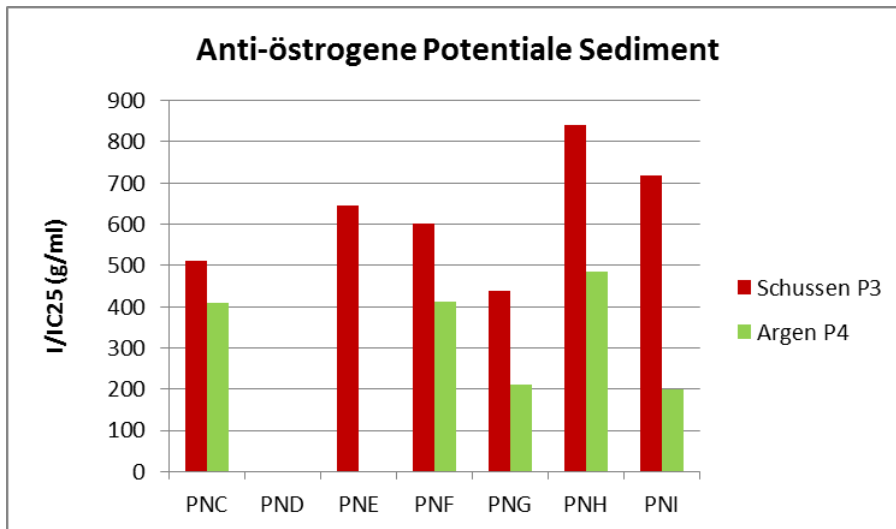


Abb. 6: Anti-östrogene Potentiale im Sediment der Schussen (unterhalb Kläranlage Langwiese) und der Argen zu 7 Probenahmezeitpunkten (PNC-PNI)

Um die Indizienkette von der Präsenz potentiell hormonell wirksamer Substanzen über endokrine Potentiale bis hin zu tatsächlichen Wirkungen bei Freilandorganismen verlängern zu können, wurden Wirkuntersuchungen an Fischen (Döbel, Schneider und Forellen) und Flohkrebse durchgeführt, die entweder aus dem Freiland entnommen oder in Bypass-Systemen aktiv dem Wasser von Schussen oder Argen gegenüber exponiert wurden. Die Induktion der Bildung von Vitellogenin in Jungforellen und die höhere Anzahl an weiblichen Schneidern und Gammariden in der Schussen unterhalb der KA Langwiese lassen vermuten, dass sich an dieser Probenahmestelle östrogene Einflüsse bei Freilandorganismen bereits moderat manifestiert haben. Allerdings sprechen die verzögerte Gonadenreife bei weiblichen Döbeln und der signifikant niedrige gonadosomatische Index bei männlichen und weiblichen Döbeln für zusätzliche antiöstrogene und / oder toxische Einflüsse. Um Giftstoffe zu metabolisieren bzw. diese zu entgiften, setzen Organismen große Teile ihrer Stoffwechselenergie ein. Diese Energie steht in der Folge für Organ- oder Körperwachstum nicht zur Verfügung, so dass z.B. Fortpflanzungsorgane kleiner bleiben (sog. energetischer *trade-off*). Vor diesem Hintergrund ist das signifikant geringere Gonadengewicht bei Döbeln aus der Schussen zu erklären. Die Ergebnisse der biochemischen Glykogennachweise (Abb. 7) sowie die histologisch sichtbaren Veränderungen in der Leber der Fische (Abb. 8) unterstützen diese Hypothese des energetischen Trade-offs, da die Fische aus der Schussen signifikant weniger Glykogen (Speicherkohlenhydrat) in der Leber speichern als Fische aus der Argen.

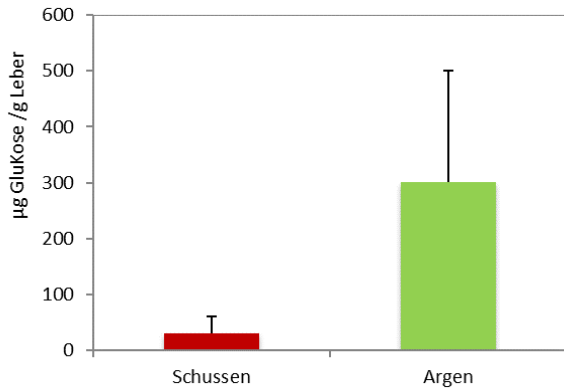


Abb. 7: Glykogengehalt in der Leber von Döbeln aus der Schussen (PS3, unterhalb der Kläranlage Langwiese) und der Argen (PS4)

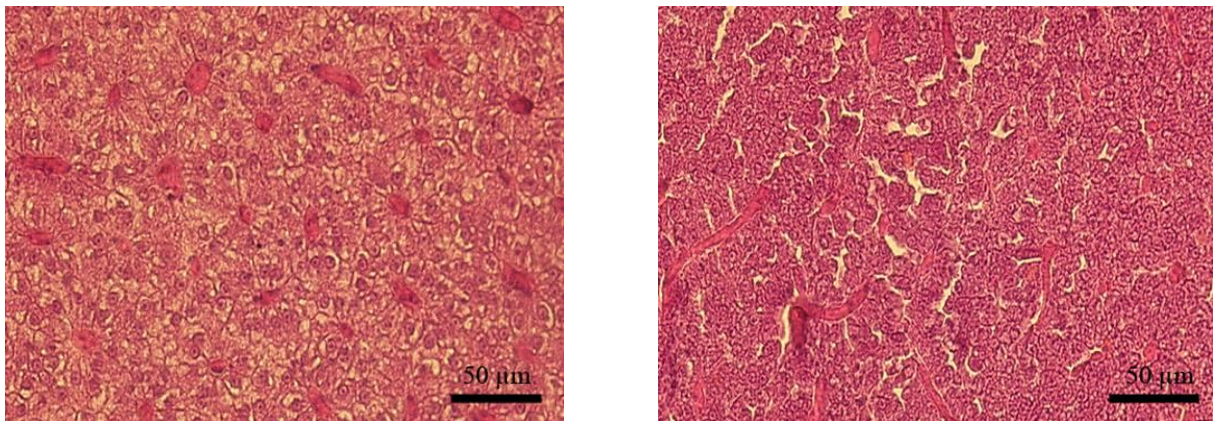


Abb. 8: Leber eines Döbels (a) aus der Argen mit Glykogenspeicher (helle Areale) und (b) aus der Schussen mit stark reduziertem Glykogen und deutlich erweiterten Interzellularräumen.

Bekannt ist allerdings auch, dass tolerante Individuen aus Populationen, die dauerhaft und über viele Generationen hinweg unter Schadstoffeinfluss leben, bei geringerer Körpergröße und in geringerem Alter als üblich bereits reproduzieren können, was als mikroevolutive Anpassung gedeutet wird [15]. Aus der Gruppe der von [10] und [16] als potentiell endokrin wirksam eingestuften Chemikalien wurden im Rahmen des Projektes 4-tert-Octylphenol, Bisphenol A, polybromierte Diphenylether, β -Sitosterol, Methyltriclosan, PCB, Quecksilber, Cadmium und DDX-Verbindungen in mindestens einem der untersuchten Umweltkompartimente nachgewiesen. Im Rahmen des Nachfolgeprojektes wurden zudem das Hormon Estron über der Nachweisgrenze im KA-Ablauf und im Oberflächenwasser der Schussen unterhalb der KA sowie deutliche PFT-Konzentrationen in Fischen aus der Schussen nachgewiesen. Die Konzentrationen der sehr stark wirksamen östrogenen Verbindungen β -Estradiol bzw. 17 α -Ethinylestradiol (EE2) lagen sowohl in den Oberflächenwasserproben als auch in den Ablaufproben der KA unterhalb der Nachweisgrenze.

Dass in der Schussen ein Zusammenspiel von endokrinen und toxischen Einflüssen von Bedeutung ist, ist aufgrund der Ergebnisse dieses Projektes sehr wahrscheinlich. Gewebetoxische Effekte können z.B. durch die nachgewiesenen Arzneimittel Diclofenac oder Carbamazepin hervorgerufen werden [17] [18]. Nach [19] und [20] könnten als Ursache für neurotoxische Effekte Quecksilber, Arsen, Kupfer, Cadmium, oder DDX in Frage kommen, für genotoxische bzw. cancerogene Wirkungen könnten laut [21] Nickel, Arsen oder der Metabolit von DMS, das cancerogene NDMA (n-Nitrosodimethylamin), nach [22], [23] und [24] auch TCPP und Methyltriclosan sowie nach [25] Carbendazim verantwortlich sein. Genotoxische Potentiale, die mittels Reporterassays in der Schussen nachgewiesen wurden, lassen sich dementsprechend einerseits mit der Präsenz dieser Substanzen in Verbindung bringen, andererseits wurden aber auch in Fischen aus der Schussen bzw. in solchen, die aktiv dem Wasser der Schussen gegenüber exponiert waren, genotoxische Effekte nachgewiesen. In den Blutzellen von Döbeln war die Anzahl an Mikrokernen, die DNA-Schädigungen anzeigen, deutlich erhöht.

Inwiefern sich auf Individualebene festgestellte Reaktionen bzw. Schädigungen bei Freilandfischen auf der Ebene der Fischpopulationen widerspiegeln, wurde im Rahmen von SchussenAktiv nicht untersucht. Allerdings liegen von anderer Seite für den Wasserkörper zwischen Mariatal (oberhalb KA Langwiese) und Mariabrunn Daten zur Bewertung des ökologischen Zustands des Gewässers auf der Basis des fischbasierten Bewertungssystems für Fließgewässer (FIBS) vor. Die Stelle "Brugg" oberhalb von Meckenbeuren repräsentiert in diesem Wasserkörper eine Probestelle unterhalb der KA Langwiese. Der Gütezustand dieser Probestelle wurde nach FIBS als "mäßig" eingestuft, wobei einer der Gründe hierfür die starke Dominanz des Schneiders in diesem Teilabschnitt des Wasserkörpers (50 %-75 % aller Fische) war (Dussling, pers. Mitteilung 23. Juli 2012). Ob dieser Befund aus einer eventuellen vergleichsweise hohen Toleranz des Schneiders gegenüber chemischen Belastungen unterhalb der KA Langwiese resultiert, wäre weitergehend zu untersuchen. Bei den histologischen Untersuchungen und Stressproteinanalysen im Rahmen von SchussenAktiv erwies sich der Schneider insgesamt als weniger empfindlich als der Döbel, die Bachforelle oder die Regenbogenforelle.

Die Untersuchung des Makrozoobenthon entlang der Schussen verdeutlicht den Einfluss der Kläranlage Langwiese auf der Ebene der Lebensgemeinschaft. Die geringere Artenzahl und Individuendichte unterhalb der KA Langwiese und hierbei vor allem der sensitiven Artengruppen weist allerdings darauf hin, dass andere Stoffe als die zuvor genannten auf das System negativ einwirken können.

In Tabellen 2 und 3 werden abschließend die chemisch-analytischen Daten und die Ergebnisse der Wirktests zusammenfassend bewertet. Beide Tabellen gemeinsam verdeutlichen, dass sowohl auf der Expositions- als auch auf der Effektseite ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Einflussgrößen die Belastungssymptomatik an Schussen und Argen beschreibt, wobei die Dichte der Einflussgrößen an der Schussen deutlich höher ist.

Tab. 2: Zusammenfassende Bewertung der Relevanz der nachgewiesenen Stoffgruppen im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser und in Biota aus Schussen und Argen

Stoffgruppe	KA-Ablauf	P 3 Schussen (uh KA)	Fische Schussen	Gammariden Schussen	P 4 (Argen)	Fische Argen	Relevante Stoffe
Arzneimittel	Red	Red	Green	Grey	Yellow	Green	Diclofenac, Carbamazepin, Sulfamethoxazol
Phytormone	Orange	Orange	Orange	Grey	Yellow	Orange	β-Sitosterol
PSM	Red	Red	Grey	Grey	Orange	Green	Wasser: Carbendazim, DMS, Mecoprop; Biota: DDX
Süßstoffe	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Acesulfam, Sucralose
Metalle	Orange	Orange	Red	Yellow	Yellow	Red	Zn, Ni, Cu, Cd
Biozide	Grey	Grey	Orange	Grey	Grey	Green	Methyltrichlorosan
Alkylphenole	Orange	Orange	Green	Yellow	Green	Yellow	Oktylphenol
Komplexbildner	Orange	Orange	Yellow	Grey	Yellow	Grey	EDTA, DPTA
Flammenschutzmittel	Orange	Yellow	Red	Red	Green	Red	Wasser: Tris(2-chlorpropyl)phosphat; Biota: PBDE
PCB	Grey	Grey	Orange	Grey	Grey	Green	PCB ₆

Bewertung:

Red	in hohen Konzentrationen nachgewiesen
Orange	regelmäßig in mittleren Konzentrationen nachgewiesen
Yellow	in geringen Konzentrationen nachgewiesen
Green	nicht nachgewiesen

Tab. 3: Zusammenfassung der Resultate der durchgeführten Tests bzw. Untersuchungen vor dem Hintergrund, welche Endpunkte adressiert wurden (toxische/endokrine Potentiale/Wirkungen) und wie stark die Effekte ausfielen

ANALYSEMETHODE	Ablauf KA Langwiese		P 3 (Schussen) / Bypass Gunzenhaus		P 4 (Argen) / Bypass Pfiegelberg	
	toxische Potentiale	endokrine Potentiale	toxische Potentiale	endokrine Potentiale	toxische Potentiale	endokrine Potentiale
E-Screen	(3)	3		2		1
Reportergenassays Östrogenität		2		1		0/1
Reportergenassays Anti-Östrogenität		1		1		0/1
Reportergenassays Anti-Androgenität		0		1		0/1
Reproduktionsstests mit Schnecken	(3)	2		3		3
Vitellogenin						0
Reifezustand, Geschlechterverhältnis, GSI Fische				2		0
Fertilität, Geschlechterverhältnis Gammarus				2		
Reportergenassays dioxinähnl. Potentiale	1		2		1	
Reportergenassays genotoxische Potentiale	1		2		0	
Mikrokernstests Fische				3		1
Acetylcholinesterase				1		2
Stressproteinanalysen				2		1
Histopathologie Fische				3		2
Embryotest Zebraquarienfische	1		1		1	
Embryotest Forellen Bypass				2		2
Parasitierung, Sessproteine Gammariden				1		0
Makrozoobenthos				3		

Bewertung:

0	kein Effekt
1	schwacher Effekt
2	mittlerer Effekt
3	starker Effekt

4 Fazit und Ausblick

Als Ergebnis des Projektes SchussenAktiv lässt sich festhalten, dass es durch den kombinierten Einsatz verschiedener Methoden, die sowohl die Expositions- als auch die Effektseite abdecken, möglich war, zwar nicht im Sinne von Kausalität, wohl aber auf der Basis einer Evidenzkette, die auf Plausibilitätskriterien beruht [26], Zusammenhänge zwischen (1) der Präsenz von Spurenstoffen in Umweltkompartimenten, (2) toxischen und hormonellen Potentialen, (3) toxischen und endokrinen Effekten bei exponierten Organismen sowie (4) dem Zustand der Lebensgemeinschaft in der Schussen herzustellen. So konnte z.B. die Präsenz potentiell genotoxischer Chemikalien in den untersuchten Umweltmatrices mit dem positiven Nachweis genotoxischer Potentiale sowie dem Auftreten genotoxischer Effekte in Blutzellen der untersuchten Fische in Verbindung gebracht werden. Die große Variabilität im Nachweis östrogenartig wirkender Chemikalien spiegelte sich auch in der Variabilität der nachgewiesenen östrogenen Wirkpotentiale und Wirkungen bei Fischen und Fischnährtieren in der Schussen. Die reduzierte Anzahl sensibler Taxa unterhalb der untersuchten Kläranlage an der Schussen spricht dafür, dass sich negative Effekte bereits auf biozönotischer Ebene manifestiert haben.

Ein Zusammenspiel toxischer und hormoneller Einflüsse auf die Organismen in der Schussen ist hierbei aufgrund der erzielten Resultate wahrscheinlich. Für die als Referenzgewässer ausgewählte Argen konnte gezeigt werden, dass die untersuchte Probenahmestelle zwar insgesamt als deutlich weniger belastet gelten kann als die Probenahmestellen an der Schussen, dass aber auch hier Bedarf besteht, bestimmte Expositionen (z.B. β -Sitosterol, Cadmium, Arsen, Quecksilber, Zink) und Effekte (z.B. Acetylcholinesterasehemmung bei Fischen, fehlende Abundanz von Gammariden) genauer zu betrachten um ggf. ihre Ursachen zu eruieren.

Für die Fortführung des Projektes über weitere drei Jahre hinweg konnten Fördermittel vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) eingeworben werden. Die Fragestellung von SchussenAktiv ist hierbei in ein erweitertes Forschungsfeld integriert und wird unter dem Namen "SchussenAktivplus" bis Ende 2014 fortgeführt. Inhalte und Ziel dieses Projektes sind bei [3] beschrieben. Da mit der Fertigstellung des Ausbaus der Kläranlage Langwiese voraussichtlich bis Frühsommer 2013 gerechnet werden kann, wird der Zustand der Schussen noch ein Jahr lang vor dem Ausbau der Kläranlage und danach für zwei Jahre nach dem Ausbau untersucht.

Dank

Unser Dank gilt (1) dem Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg für die Förderung dieses Projektes sowie der Vorstudie, (2) der Stiftung „Natur und Umwelt“ der Landesbank Baden-Württemberg für Teile der Anschubfinanzierung, (3) Herrn Lothar Heissel, Ref. 53.2 des RP Tübingen, und seinen Mitarbeitern für die umfassende Unterstützung beim Aufbau der Freilandstationen; hierbei vor allem Herrn Vollmer für den unkonventionellen Transport des Bauwagens nach Wangen, (4) Frau Regierungsvizepräsidentin Grit Puchan, Abt. 1, und Herrn Dietmar Enkel, Abt. 5 Umwelt des RP Tübingen, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die Projekttreffen sowie für ihr Interesse und für die Unterstützung des Projektes, (5) Herrn Gerd Schröder, ISF Langenargen, für seinen Einsatz für das Projekt, (6) Frau Dr. Ursula Maier vom Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg für die intensive und kritische Durchsicht des Abschlussberichts zu dieser Studie sowie für gute Anregungen, (7) Herrn Ralph-Michael Jung, Stadt Ravensburg für sein Interesse und die Unterstützung des Projektes, (8) den Mitarbeitern der Kläranlagen Langwiese und Pfügelberg sowie des AV Unteres Schussental, ganz besonders den Herren Markus Bertsch, AZV Mariatal und Heiko Kiebler, AV Unteres Schussental für ihre große Kooperationsbereitschaft, (9) den Herren Kurt Sarembe und Andreas Schießl, ISF Langenargen, für den unermüdlischen Einsatz bei den Befischungen, (10) zahlreichen Vertretern der Fischereivereine an Schussen und Argen für wichtige Tipps, (11) Frau Lisa Hanslik, MSc und Herrn Dipl.-Biol. Sebastian Kindermann, Universität Tübingen sowie Frau Dr. Agnes Sieratowicz, Universität Frankfurt / Main für die Projektarbeiten im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten sowie (12) Herrn Matthias Lucht, MSc, Universität Tübingen, für die Vorlage zu Abb. 1.

Literatur

- [1] Brauch H.-J., (2011): *Organische Spurenstoffe in Gewässern. Vorkommen und Bewertung*. Gwf-Wasser/Abwasser, 12, 1206-1211
- [2] Triebkorn R., Hetzenauer H. (2012): *Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefeldler Aach: a literature review. (Mikroverunreinigungen in den drei Bodenseezuflüssen Argen, Schussen und Seefeldler Aach – eine Literaturstudie)*. Environmental Sciences Europe 24, 8 (open access)
- [3] Triebkorn R., Amler A., Blaha L., Gallert C., Giebner S., Güde H., Henneberg A., Hess S., Hetzenauer H., Jedele K., Jung R.-M., Kneipp S., Köhler H.-R., Kraiss S., Kuch B., Lange C., Löffler H., Maier D., Metzger J., Müller M., Oehlmann J., Osterauer R., Peschke K., Raizner J., Rey P., Rault M., Richter D., Sacher F., Scheurer M., Schneider-Rapp J., Seifan M., Spieth M., Vogel H.-J., Weyhmüller M., Winter J., Wurm K. (2013): *SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for*

- further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. Environmental Sciences Europe 25, 2 (open access)*
- [4] Triebkorn R., Sandu C., Telcean I., Casper H., Farkas A., Colarescu O., Dori T., Köhler H.-R. (2008): *Monitoring Pollution in River Mureş, Romania, Part II: Metal accumulation and histopathology. Environmental Monitoring and Assessment 141, 177-188*
- [5] Honnen W., Rath K., Schlegel T., Schwinger A., Frahne D. (2001): *Chemical analyses of water, sediment and biota in two small streams in Southwest Germany. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 8, 195-213*
- [6] Havelková M., Randak T., Blahova J., Slatinska I., Svobodová, Z. (2008): *Biochemical markers for the assessment of aquatic environment contamination. Interdisciplinary Toxicology 1(2), 169-81*
- [7] *Verordnung (EG) Nr. 1259/2011 der Kommission vom 2. Dezember 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) No 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für Dioxine und Dioxin-ähnliche PCB in Lebensmitteln.*
- [8] Umweltprobenbank: http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/investigations/results/analytes?analytes=10100&sampling_area=&sampling_years=&specimen_types=10007
- [9] Leiker T.J., Abney S.R., Goodbred S.L., Rosen M.R. (2009): *Identification of methyltriclosan and halogenated analogues in male common carp (Cyprinus carpio) from Las Vegas Bay and semipermeable membrane devices from Las Vegas Wash, Nevada. Science of the Total Environment 407(6), 2102-2114*
- [10] Brausch J.M., Rand G.M. (2011): *A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. Chemosphere 82(11), 1518-32.*
- [11] Ciniglia C., Cascone C., Giudice R.L., Pinto G., Pollio A. (2005): *Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to C. ehrenbergii. Journal of Hazardous Materials 122(3), 227-32*
- [12] COM 2011/876 (2012): *Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 31.1.2012*
- [13] Hajslová J., Pulkrabová J., Poustka J., Cajka T., Randák T (2007): *Brominated flame retardants and related chlorinated persistent organic pollutants in fish from river Elbe and its main tributary Vltava. Chemosphere 69(8), 1195-203*
- [14] Körner W., Bolz U., Triebkorn R., Schwaiger J., Negele R.-D., Marx A., Hagenmaier H. (2001): *Steroid analysis and xenosteroid potenzials in two small streams in Southwest Germany. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 8(3/4), 215-229*
- [15] Donker M.H., Zonneveld C., van Straalen N.M. (1993): *Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod Porcellio scaber. Oecologia 96, 316-323*

- [16] Landesumweltamt Brandenburg (2010): *Studien und Tagungsberichte Band 26: Endokrin wirksame Stoffe in der Umwelt – Literaturstudie zur Bedeutung dieser Stoffe im Land Brandenburg*. http://www.mugv.brandenburg.de/cms/media.php/2320/lua_bd26.pdf
- [17] Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. (2004): *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. *Aquatic Toxicology* 68(2), 141-150
- [18] Triebkorn R., Casper H., Scheil V. Schwaiger J. (2007): *Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and common carp (Cyprinus carpio)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4), 1405-1416
- [19] Bull S. (2007): *Review of Environmental Chemicals and Neurotoxicity. Focus on Neurological Diseases*. Health Protection Agency, Chilton
- [20] EPA Health Effect Assessment of DD. EPA -540/1-86-026
- [21] Umweltbundesamt (2011): *Karzinogene, mutagene, reproduktionstoxische (CMR) und andere problematische Stoffe in Produkten. Identifikation relevanter Stoffe und Erzeugnisse, Überprüfung durch Messungen, Regelungsbedarf im Chemikalienrecht*. UBA-Texte 18/2011
- [22] Uhl M., Hartl W., Schar S. (2010): *Überprüfung von Babyartikeln auf Schadstoffe*. Umweltbundesamt Wien, Rep-0284. <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REPO284.pdf>
- [23] Anitha D., Shantha S.L., Krishnamurthy V., Vanishree R. (2008): *Triclosan as a genotoxic compound for Drosophila melanogaster*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 1(5), 12-161.
- [24] Lin D, Xie X, Zhou Q, Liu Y. (2012): *Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (Eisenia fetida) using contact and soil tests*. *Environmental Toxicology* 27(7), 385-92
- [25] PAN Europe factsheet on Carbendazim, Brussels, 2nd March 2011
- [26] Triebkorn R., Adam S., Behrens A., Beier S., Böhmer J., Braunbeck T., Casper H., Dietze U., Gernhöfer M., Honnen W., Köhler H.-R., Körner W., Konradt J., Lehmann R., Luckenbach T., Oberemm A., Schwaiger J., Segner H., Strmac M., Schüürmann G., Siligato S., Traunspurger W. (2003): *Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The VALIMAR project*. *Human and Ecological Risk Assessment* 9(1), 171-194

Autoren

Prof. Dr. Rita Triebskorn
Dipl.-Biol. Anja Henneberg
Prof. Dr. Heinz-R. Köhler
Dipl.-Geoökol. Stefanie Kraus
Dipl.-Biol. Diana Maier
Dipl.-Biol. Katharina Peschke
Dipl.-Biol. Paul Thellmann
Physiologische Ökologie der Tiere
Institut für Evolution und Ökologie
Universität Tübingen
Konrad-Adenauer-Straße 2
72072 Tübingen

Prof. Dr. Rita Triebskorn
Steinbeis Transferzentrum
für Ökotoxikologie und Ökophysiologie
Blumenstraße 13, 72108 Rottenburg
Prof. Dr. Ludek Blaha
RECETOX-Research Centre for Toxic Compounds
in the Environment
Faculty of Science
Masaryk University
Kamenice 3, CZ-62500 Brno, Tschechien

Dr. Harald Hetzenauer
Dr. Hans Güde
Brigitte Engesser
ISF (Institut für Seenforschung) der LUBW (Landesanstalt für
Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg
Argenweg 50/1
88085 Langenargen

Dr. Bertram Kuch
ISWA (Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und
Abfallwirtschaft)
Bandtäle, 70569 Stuttgart

Prof. Dr. Jörg Oehlmann
Aquatische Ökotoxikologie
Goethe Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 13
60323 Frankfurt am Main

Dr. Magali Rault
Dr. Séverine Suchail
Université d'Avignon
et des Pays de Vaucluse UMR 7263 CNRS-IRD
IMBE, 301 rue Baruch de Spinoza BP21239
F-84916 Avignon Cedex 09, Frankreich

Dipl.-Biol. Peter Rey
Hydra-Büro
Fürstenbergstraße 25, 78467 Konstanz

Dr. Doreen Richter
Dr. Frank Sacher
TZW (DVGW-Technologiezentrum Wasser)
Karlsruher Straße 84, 76139 Karlsruhe

Dipl.-Biol. Michael Weyhmüller
BBW – Biologiebüro Weyhmüller
Am Königsbühl 15, 88147 Achberg

Dr. Karl Wurm
GLW (Gewässerökologisches Labor Wurm)
Tulpenstraße 4, 72181 Starzach

Dipl.-Ing. Hans-J. Vogel
Regierungspräsidium Tübingen
Referat 54.3
72072 Tübingen

E-Mail: rita.triebskorn@uni-tuebingen.de bzw.

stz.oekotox@gmx.de

blaha@recetox.muni.cz

Brigitte.engesser@lubw.bwl.de

anja.henneberg@googlemail.com

hans.guede@lubw.bwl.de

harald.hetzenauer@lubw.bwl.de

heinz-r.koehler@uni-tuebingen.de

stefanie.krais@uni-tuebingen.de

Bertram.Kuch@iswa.uni-stuttgart.de

dianamaier.mt@gmail.com

oehlmann@bio.uni-frankfurt.de

katharina.peschke1@googlemail.com

rault@avignon.inra.fr

p.rey@hydra-institute.com

doreen.richter@tzw.de

sacher@tzw.de

suchail@avignon.inra.fr

info@biologiebuero-weyhmueller.de

GLW.K.Wurm@t-online.de

hans-joachim.vogel@rpt.bwl.de W

Kapitel 2.2.2: Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream?

International Journal of Water and Wastewater Treatment 3(2), (2017); DOI: <http://dx.doi.org/10.16966/2381-5299.1>

Paul Thellmann¹, Katharina Greiner-Perth¹, Stefanie Jacob¹, Marina Knoll¹, Manuela Schäfer¹, Michael Stängle¹, Michael Ziegler¹, Marco Scheurer², Heinz-R. Köhler¹ and Rita Triebkorn^{1,3}

¹Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, D-72076 Tübingen, Germany

²Water Technology Centre Karlsruhe (TZW), Karlsruher Straße 84, D- 76139 Karlsruhe, Germany

³Steinbeis Transfer-Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany

Keywords: waste water treatment, tertiary treatment, powdered activated carbon, fish embryo test, sediment, surface water

Abstract

Advanced waste water treatment technologies based on e.g. an additional powdered activated carbon stage are in the focus of today's science and politics. Despite the abundance of detailed information on the efficiency of these new technologies in the literature, little is known about their effects on the connected surface waters. The present study focuses on a large waste water treatment plant in Ravensburg (Southern Germany), which has been equipped with an additional cleaning stage (powdered activated carbon in late autumn 2013). Within the scope of a pre-post study, effluent samples of this WWTP as well as sediment and surface water samples from the connected River Schussen were investigated by chemical analysis and the fish embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) over a period of 2 years prior and after the WWTP upgrade. Our results clearly show the additional purification step based powdered activated carbon to result not only in a considerable reduction of micropollutants in the wastewater treatment plant effluent and surface water, but also to improve sediment and surface water quality in respect to a significant reduction of embryotoxic effects. Our study thus revealed the ecological and toxicological relevance of the PAC adsorption technology in wastewater treatment.

Introduction

Although waste water treatment technologies have been continuously improved over the past 40 years, a large proportion of anthropogenic substances that are present in European surface waters are still released via waste water treatment plants (WWTPs) (e.g. Luo et al., 2014). The reason for this fact is rooted in the incomplete elimination of various substances during conventional waste water

treatment processes (Göbel et al., 2007; Abegglen, 2010; Mousel et al., 2017). As a consequence, anthropogenic substances like personal care products, pharmaceuticals, industrial agents or their transformation products were and are still continuously discharged into the aquatic environment (da Silva et al., 2011; Vieno & Sillanpää, 2014).

For example, the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac is a worldwide used pharmaceutical which is often detected in WWTP effluents and in many European surface waters (Vieno & Sillanpää, 2014; Lonappan et al., 2016). Studies of Schwaiger et al. (2004), Triebkorn et al. (2007) and Birzle (2015) have demonstrated that even low and environmentally relevant concentrations of diclofenac can lead to adverse effects in exposed fish. Endocrine disrupting chemicals (EDCs), like 17 α -ethinyl estradiol (EE2) which is a frequent constituent of contraceptives can also be found in many surface waters and WWTP effluents (e.g. Johnson et al., 2013; Avar et al., 2016). Several studies have demonstrated that already low concentrations (ng/L range) of EE2 are able to adversely affect fish endocrinologically (Huang et al., 2015; Feswick et al., 2016; Nikoleris et al., 2016). Since many years, environmental pollution with trace substances and waste water treatment with different cleaning technologies have been in the focus of today's scientists and politicians. This rising interest has various reasons. Probably the most important one is that water resources will play a limiting factor for many regions in the future, especially in the case when the production of raw and drinking water originates from waste water treatment (Joss et al., 2005). Particularly in the case of densely populated catchment areas with intense industrial or agricultural land use, the degree of surface waters pollution becomes a crucial factor. In order to improve waste water treatment processes and to meet the requirements of the European Water Framework directive (WFD) additional wastewater treatment technologies based on ozonation or powdered activated-carbon (PAC) were and are currently under research in many studies (Meinel et al., 2014; Henneberg & Triebkorn, 2015; Lüddeke et al., 2015; Bonvin et al., 2016). The advantages, the efficiency, the necessity, and the appropriate application of the available technologies for the reduction of micropollutants and pathogens are a late-breaking topic in sanitary environmental engineering and a matter of intense scientific discussion (Margot et al., 2013; Molinos-Senante et al., 2013; Logar et al., 2014; Eggen et al., 2014). Whether, and how fast this additional wastewater treatment technologies result in an improvement of ecosystem health, however, is far from being understood.

The present work is part of the joint research program "SchussenAktivplus". It aims at investigating and assessing differently sized WWTPs in Southern Germany that have been equipped with additional wastewater treatment technologies such as ozonation, powdered activated-carbon (PAC) or granulated activated-carbon (GAC) filtration. The present study focuses on a large WWTP (WWTP Langwiese near Ravensburg, Southern Germany) and the effects of its effluent on the receiving stream,

the Schussen River, prior and after the upgrade of the WWTP with an activated carbon stage. The Schussen River is the largest German tributary to Lake Constance, the largest reservoir of drinking water in Germany. The catchment area of the Schussen represents a densely populated and intensely used area which experiences a lot of anthropogenic influences due to the discharge of municipal waste waters. In total 19 WWTPs and 216 stormwater overflow basins (SOBs) release their discharges into this river. The WWTP Langwiese represents a large scale plant with a cleaning capacity of 170,000 population equivalents. In late autumn 2013 this WWTP has been upgraded with an additional adsorptive PAC stage. In order to investigate the effects of this additional filtration stage on the toxicity of water and sediment of the receiving water course, samples from four sites at the Schussen River – upstream and downstream of the WWTP Langwiese, prior and after upgrading – were investigated over a period of 2 years by means of the fish embryo test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). Additionally, effluent samples from different cleaning stages at the WWTP Langwiese were also investigated with the FET. In summary, our study aimed at assessing the embryotoxic potentials in effluent samples, surface water, and sediment samples of the field sites and, thus, the ecotoxicological benefit of the upgrade of a large WWTP with PAC technology.

Material and Methods

Characterization of the WWTP Langwiese

The WWTP Langwiese represents a large-sized facility with a cleaning capacity of 170.000 population equivalents. It is located at the Schussen River downstream of the city of Ravensburg (Germany). The WWTP had been a conventional facility (according to the German standard) equipped with a mechanical, a biological, and a chemical purification step followed by sand filtration with combined flocculation as the final cleaning stage. In autumn 2013, it was upgraded with an additional adsorptive PAC stage in order to reduce the concentrations of trace substances in its effluents.

Sampling sites and dates

Four field sampling sites were investigated up- and downstream of the WWTP Langwiese (Figure 1). The sampling sites S0 and S1 are situated upstream of the WWTP Langwiese. S0 is also located upstream of the stormwater overflow basin (SOB) Mariatal which is connected to the WWTP Langwiese. S1 is situated downstream of the SOB Mariatal. The sites S3 and S6 are located 5 km and 17 km downstream of the WWTP Langwiese, respectively. The S6 site is also located downstream of another WWTP at Eriskirch near the Schussen estuary into Lake Constance. Additionally, a reference site (named S4) at the Argen River, another large tributary to Lake Constance, was investigated, since

a literature review by Triebkorn & Hetzenauer (2012) revealed the Argen River to be a less polluted stream. All sampling dates are listed in Table 1.

At the WWTP Langwiese, samples from different positions (Figure 2) in the process of sewage cleaning were investigated: a) influent with untreated sewage; b) effluent after biological/ activated sludge treatment; c) effluent of the final purification step (sand filtration and combined flocculation); d) effluent of PAC Filter after upgrade with PAC filter; e) effluent of the final purification step after upgrade with PAC filtration.

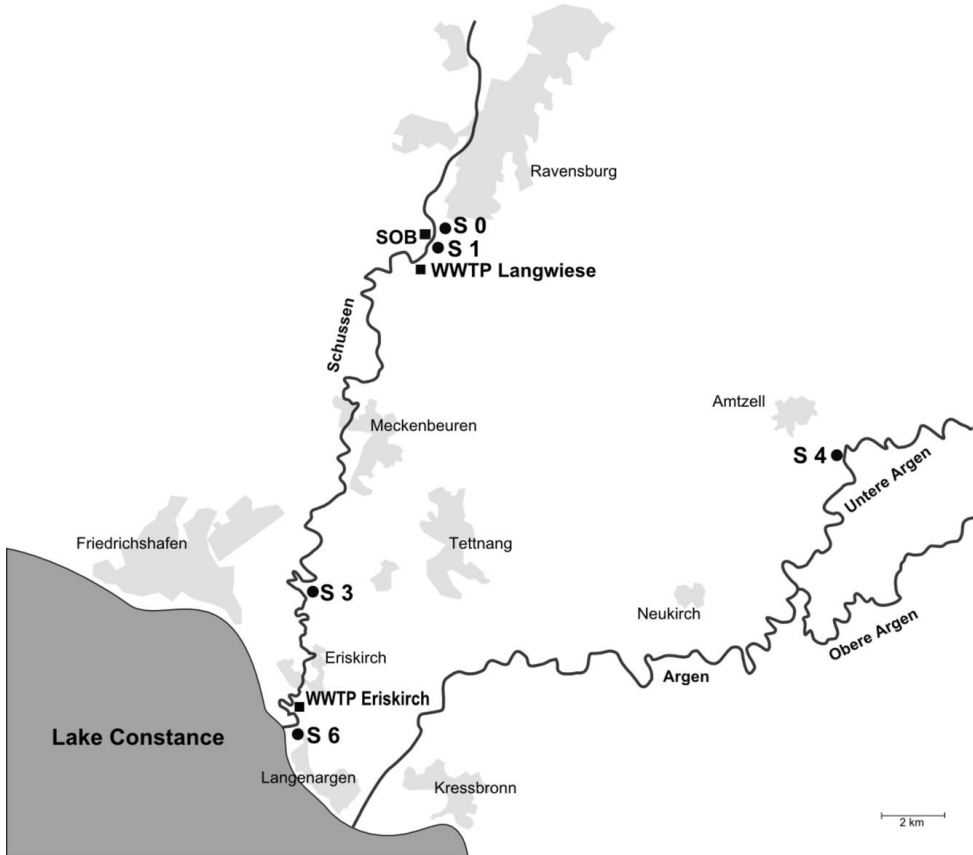


Figure 1: Field sampling sites at Schussen River (up- and downstream of the WWTP Langwiese) and at the reference site at Argen River

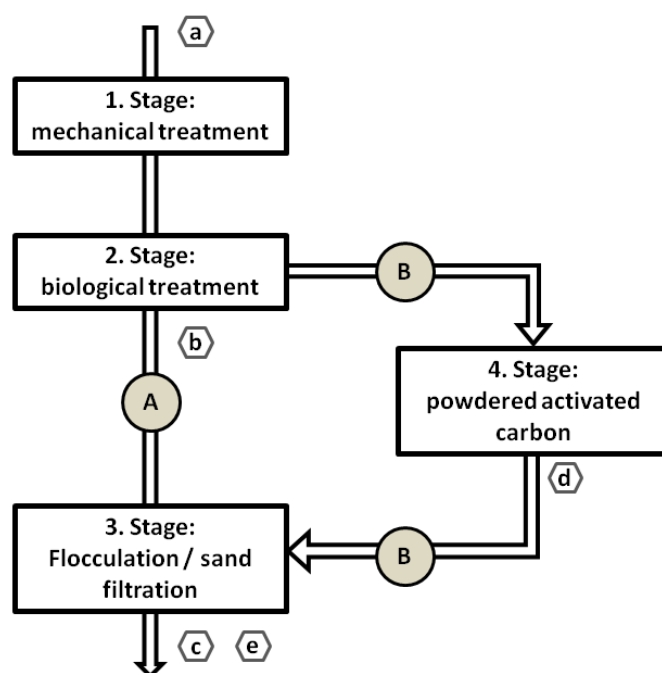


Figure 2: Sampling sites at WWTP Langwies; A: Prior WWTP upgrade; B: After WWTP upgrade. Sampling was conducted at a) influent with untreated sewage; b) effluent after biological/ activated sludge treatment; c) effluent of the final purification step (sand filtration and combined flocculation); d) effluent of PAC Filter after upgrade with PAC filter; e) effluent of the final purification step after upgrade with PAC filtration

Table 1: Sampling events during the investigation period; x = sampled; - = no sampling

	Sampling date	Field sites	WWTP Langwiese
Prior to WWTP upgrade	July 2012	x	x
	October 2012	x	-
	May 2013	x	-
	July 2013	x	x
After WWTP upgrade	November 2013	x	x
	May 2014	x	x
	July 2014	x	x

Sampling

Sediment and surface water samples were taken at each field sampling site. Sediment sampling was performed close to the riverside, where the top 2 to 4 cm of the riverbed were taken. In order to obtain representative sediment samples of each sampling site, all sediment samples were randomly collected (multiple spots within each investigated field site) over a distance of 15 to 30 meters.

Subsequently, the collected samples of each field site were homogenized in a stainless steel bucket and divided into three batches of 100 g, wrapped in aluminum foil (Roth, Germany). Batches were used for the application in the FET. Water was sampled at a depth of 10 to 15 cm from the river surface. All flasks were rinsed with river water before sampling. At each field site and sampling event, three 250 mL sterilized glass flasks (Schott Duran, Germany) were filled with surface water.

Regarding the sampling at the WWTP Langwiese, also three glass flasks (250 mL, Schott Duran, Germany) per sampling event were filled with the corresponding water of each of the investigated cleaning stages. The collected samples represented 24h bulk samples that were taken by installed automatic samplers at each of the investigated cleaning stages. In order to prevent artificial amplification of microorganisms in the samples, they were stored in a cool box at 4 °C during sampling and transport and subsequently frozen at -20 °C after arrival at the laboratory.

Physicochemical analyses in the field

Water pH, oxygen concentration, conductivity, and water temperature were measured directly in the stream during each sampling event. For additional measurements 1 L of river water (per sampling site and event) was sampled in a sterile glass flask and transported to the laboratory. In the laboratory, the concentrations of nitrate, nitrite, ammonium, phosphate, chloride were determined photometrically by using tube test kits (NANOCOLOR® tube tests) and a compact filter photometer (Compact photometer PF-12Plus) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Carbonate and total hardness were determined titrimetrically with test kits (MColortest™) from Merck (Darmstadt, Germany). All measured data were assessed and evaluated according to the guidance values defined by the German Working Group on Water Issues (LAWA;LUBW; 2008) and the German Act for the Regulation of Surface Waters of 2011 (OgewV, 2011).

Chemical analyses

Chemical analysis of wastewater samples from the WWTPs Langwiese was performed with high-performance liquid chromatography (HPLC, 1200 or 1290 series Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) separation coupled to tandem mass spectrometry (API 4000 and 5500 series, AB Sciex, Framingham, USA). Prior analyses samples were pre-concentrated with solid phase extraction (SPE). A detailed description of all analytical methods for benzotriazoles, and pharmaceuticals and antibiotics (including SPE protocol, gradient program and analytical columns) can be found in Thellmann et al. (2015). WWTP influent samples were diluted by a factor of ten and effluent samples by a factor of five, respectively, prior SPE.

Zebrafish maintenance and breeding

Adult and juvenile zebrafish (Westaquarium strain) were reared and stocked at the Animal Physiological Ecology Section of Tübingen University. All fish were kept in 100–240 L tanks at water temperatures of 26 ± 0.5 °C and adequate oxygen supply. The fish tanks contained filtered tap water (AE-2L water filter equipped with an ABL-0240-29 activated carbon filter, 0.3 μm ; Reiser, Seligenstadt, Germany). The quality of the filtered tap water was maintained at 8 to 12 °dH total hardness (equivalent to 1.43 to 2.14 mM CaCO_3), a conductivity of 260–350 $\mu\text{S/cm}$, and pH 7.4 ± 0.2 . Concentrations for nitrite and nitrate were kept below critical values (nitrite 0.025 to 0.1 mg/L; nitrate 1 to 5 mg/L). Every 14 days, 30 % of the water volume was exchanged. The tanks were exposed to an artificial dark–light cycle of 12:12 h. Adult zebrafish were fed three times daily (about 3 % of fish weight per day) with dry flake food (TetraMin™, Tetra, Melle, Germany). Additionally, once in a week and prior to spawning events, the fish were fed frozen food (mosquito larvae) to stimulate optimal egg production. In order to prevent unwanted spawning, tanks did not contain any sediment substrates, plants, and decoration. Breeding boxes, which were used for egg production, were positioned at the bottom of the aquaria the evening before spawning was desired. The breeding boxes consisted of plastic trays topped with stainless steel grids (mesh size 1.5 mm). The steel grids allowed the passage of eggs into the trays and protected them against predation by adult zebrafish. In order to stimulate spawning, a green plastic imitation plant was positioned on top of the steel grids.

Fish embryo test

The fish embryo tests generally followed the procedure of the OECD Guideline 236 (OECD, 2013), and were applied and modified as sediment contact assays according to the work of Hollert et al. (2003). Criteria for the validation of the test were the same as described in the OECD Guideline 236. All samples were collected in triplicates. Therefore, three independent test runs were conducted for each sampling site and event (three tests on different dates). Tests were conducted as described in the work of Thellmann et al. (2015). For each of the tested sampling sites (in the field and at the WWTP Langwiese) five glass Petri dishes (30 mm diameter, Schott Duran, Germany) were filled with the respective sample. For the testing of the field samples, all dishes were filled with 2.5 g of the sediment sample and overlaid with the corresponding surface water from the same sampling site and event. Reconstituted water (according to ISO 7346/3) was used as negative control. At defined time points, lethal and sublethal endpoints (hatching rate; developmental delays, and failures) as well as developmental stages were observed (Table 2) with a stereomicroscope (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany).

Table 2: Observed developmental stages and endpoints during fish embryo test with *Danio rerio*; indicators of lethality, when absent, are marked with *

Endpoints	Hours post fertilization (hpf)							
	8h	12h	24h	48h	60h	72h	84h	96h
Mortality/Coagulation*	X	X	X	X	X	X	X	X
Hatching					X	X	X	X
Developmental retardations								
Epiboly	X							
Gastrulation		X						
Formation of somites*			X					
Tail detachment*			X					
Spontaneous movements			X					
Eye development			X					
Heart rate (beats/min)*				X				
Otolith formation					X			
Occurrence of melanocytes					X			
Developmental failures								
Oedema (heart and yolk)					X			
Malformation of eyes					X	X	X	X
Tail deformation					X	X	X	X
Spinal deformation (Scoliosis)					X	X	X	X
Pigmentation failures					X	X	X	X

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SAS JMP version 11.0 (SAS Institute GmbH, Böblingen, Germany). For the analyses of data from the investigated sampling sites at the rivers Schussen and Argen, the entire dataset for all sampling events and all test runs were assessed by the Likelihood-ratio test. The entire dataset recorded for the tested effluent samples from the WWTP Langwiese were analyzed by Fisher's exact test. The significance level was set to $\alpha=0.05$. To correct for multiple testing, the Holm–Bonferroni method was applied to adjust the significance levels.

Results

Physicochemical water parameters

Generally, the recorded data indicated a good ecological condition of both streams according to the guidance values defined by LAWA (LUBW, 2008) and the 2011 German Regulation Act for Surface Waters (OGewV, 2011)(Table 3). The only exception from this was the nitrate concentration at each of the investigated Schussen River sites, for which a good ecological condition was not achieved. The mean values of data from all sampling events are summarized in Table 3.

Table 3: Physicochemical water parameters at each of the six field sites, prior to and after the upgrade of the WWTP Langwiese in Ravensburg. Data represent mean values of all conducted measurements. All measured values were assessed and evaluated according to the guidance values defined by LAWA (German Working Group for Water Issues; LUBW2008) and the German Regulation for Surface Waters of 2011 (OGewV 2011). Blue marked values point to very good ecological conditions, green marked values point to good ecological conditions, while orange marked arrays indicate that a good ecological condition is not achieved

	Prior to upgrade					After upgrade				
	S0	S1	S3	S6	S4	S0	S1	S3	S6	S4
Conductivity [µs/cm]	651.2	633.8	639	675.8	480.4	605	603.5	610.25	628.5	504.5
Water temperature [°C]	14.46	14.88	15.00	15.48	13.30	12.45	12.28	12.70	12.90	12.50
O₂ saturation [%]	101.68	99	101.42	90.94	103.58	103.6	99.95	98.5	90.65	106.62
O₂ content [mg/L]	9.88	9.50	9.87	8.73	10.24	10.48	10.23	9.95	9.21	10.29
NH₄-N [mg/L]	0.050	0.052	0.037	0.051	0.028	0.035	0.045	0.038	0.053	0.035
NO₂-N [mg/L]	0.021	0.024	0.021	0.027	0.008	0.019	0.019	0.019	0.019	0.009
NO₃-N [mg/L]	3.063	2.932	3.369	3.384	0.902	2.875	2.825	3.275	3.675	0.900
PO₄-P [mg/L]	0.06	0.05	0.06	0.06	0.04	0.07	0.06	0.07	0.07	0.03
Carbonate hardness [°dH]	19.80	19.60	20.20	20.00	17.00	20.25	18.50	18.50	18.50	16.50
Overall hardness [°dH]	21.00	20.80	20.20	20.20	18.80	21.75	21.50	21.75	21.50	18.25
pH	8.23	8.24	8.22	8.16	8.26	8.22	8.21	8.26	8.02	8.25
Chloride [mg/L]	23.40	23.40	26.00	27.80	13.00	21.75	22.25	24.00	30.00	9.50

Chemical Analyses

Within the frame of the SchussenAktiv*plus* project, chemical analyses were conducted for more than 100 common substances. In this work, only the data recorded for six frequently occurring substances (1H-benzotriazole, 4-methyl benzotriazole, 5-methyl benzotriazole, carbamazepine, diclofenac and sulfamethoxazole) are presented in the Figures 3 to 5 and Table 4. These substances were selected as representatives for all anthropogenically introduced compounds. Data presented in the Figures 3 to 4 and in Table 4 clearly show that the concentrations of all these substances decreased in the effluent and in the field due to the use of the additional PAC stage. The additional elimination rates varied between 59 and 91 % depending on the respective substance (Table 4). A summary of measurement data and elimination rates is given in Table 4. At sampling site 6, which is located downstream of the WWTP Eriskirch, a decrease of the concentrations was only observed for three substances (1H-benzotriazole, 5-methyl benzotriazole, sulfamethoxazole), whereas the concentrations for carbamazepine and diclofenac increased after the upgrade of the WWTP Langwiese (Figure 5).

Table 4: Measured concentrations (in µg/L) and elimination rates [%] of 1H-benzotriazole, 4-methyl benzotriazole, 5-methyl benzotriazole, carbamazepine and diclofenac in the influent and the effluent of different purification steps of the WWTP Langwiese prior to and after the upgrade with an additional PAC stage. Abbreviations: SC= secondary clarifier; SF= sand filter; PAC= powdered activated carbon

	Influent	Effluent SC	Effluent SC + SF	Effluent SC +SF + PAC	Additional elimination by PAC [%]
1H-benzotriazole	9.90	4.30	4.40	0.95	78.41
4-methyl benzotriazole	1.80	1.20	1.60	0.25	84.38
5-methyl benzotriazole	2.7	0.9	0.89	0.08	91.01
carbamezepine	0.66	0.55	0.56	0.09	83.93
diclofenac	1.9	1.3	0.91	0.37	59.34
sulfamethoxazole	0.39	0.27	0.34	0.13	61.76

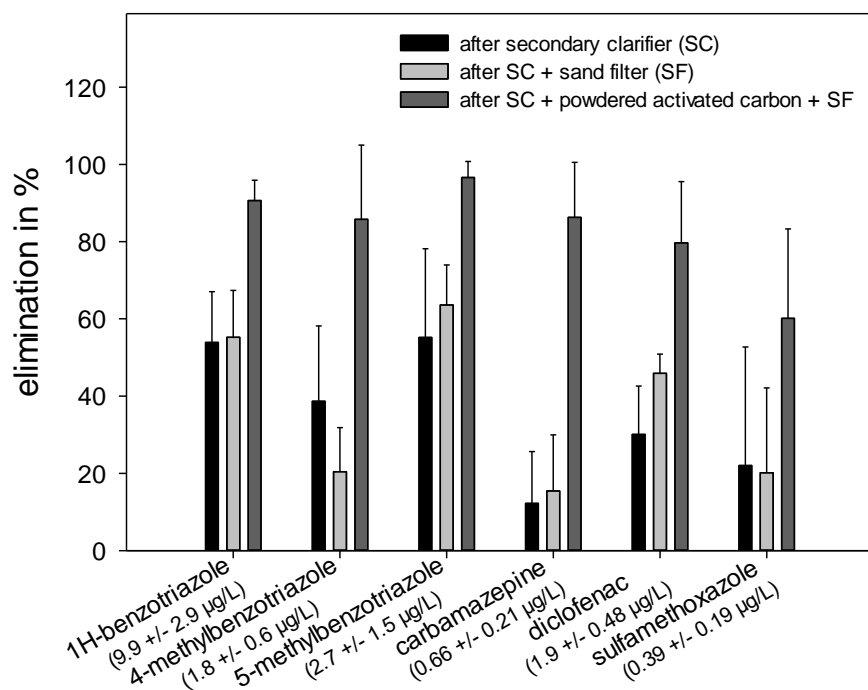


Figure 3: Removal rates of six micropollutants in the WWTP Langwiese after activated sludge treatment (AST), AST + sand filtration (SF), and AST + powdered activated carbon and SF. Values in parentheses indicate concentration in the WWTP influent

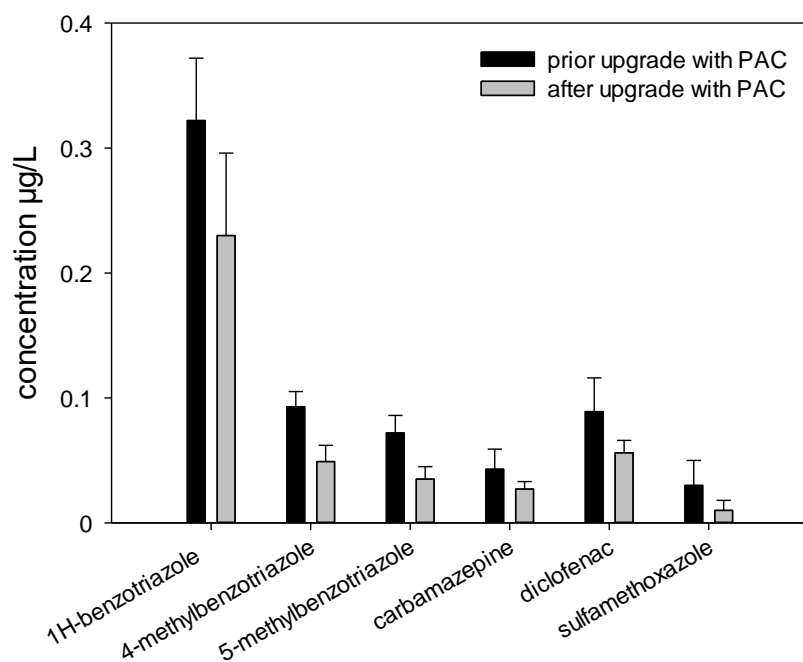


Figure 4: Concentrations of six micropollutants in surface water samples from the Schussen River; sampled at sampling site 3 (downstream of the WWTP Langwiese)

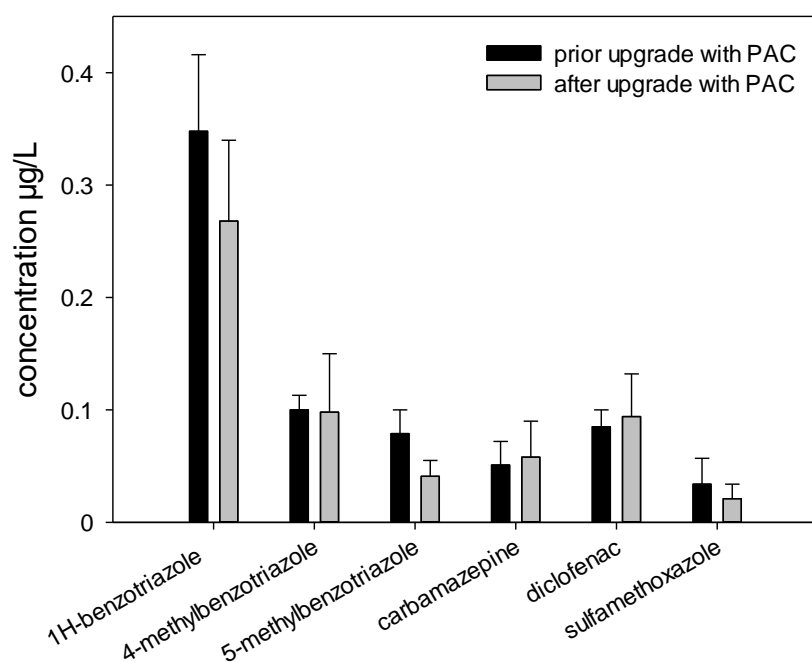


Figure 5: Concentrations of six micropollutants in surface water samples from the Schussen River; sampled at sampling site 6 (downstream of the WWTP Eriskirch and WWTP Langwiese) near estuary into Lake Constance

Fish Embryo Test

Only low embryotoxic potentials were found in the samples from the investigated WWTP effluents prior and after the WWTP upgrade. With regard to the mortality rate of the exposed zebrafish embryos, no differences were found between the investigated effluents and the control treatment. Concerning the sublethal endpoints of the test, only low rates of developmental delays (lack of tail detachment) and developmental failures (edema, spinal deformations) were observed. Both, the developmental failure rate and the rate of developmental delays, were similar to those from embryos of the control treatment. The hatching rate showed the most prominent differences between the investigated effluents. Here, a steady increase of the hatching rate from the secondary clarifier up to the final purification step (upgraded with PAC) was apparent (Figure 6). The results also demonstrate that the variability of zebrafish embryo responses decreased in consequence of sewage cleaning by PAC.

The investigation of native sediment and surface water samples from the field sites led to more clear results in respect to the benefit of the additional purification step with PAC. For both endpoints, the mortality and the hatching rate, a significant improvement was observed for the sampling sites S3 and S6 downstream of the WWTP Langwiese. Samples from these sites, taken after the upgrade of the

WWTP, resulted in significantly lower mortality rates and significantly elevated hatching rates in exposed embryos compared to those samples that have been tested before the upgrade (Figure 7). The opposite was apparent for embryos exposed to samples from sampling sites 0, 1, and 4. In these cases, sediment and surface water samples taken after the upgrade of the WWTP Langwiese, respectively after autumn 2013, resulted in significantly elevated mortality rates and significantly reduced hatching rates in exposed embryos compared to the corresponding samples that were tested prior to the upgrade (Figure 6). Except for site 0, samples taken from all sites exerted a significantly lower developmental delay rate after the upgrade of the WWTP Langwiese in autumn 2013 than corresponding samples have done before.

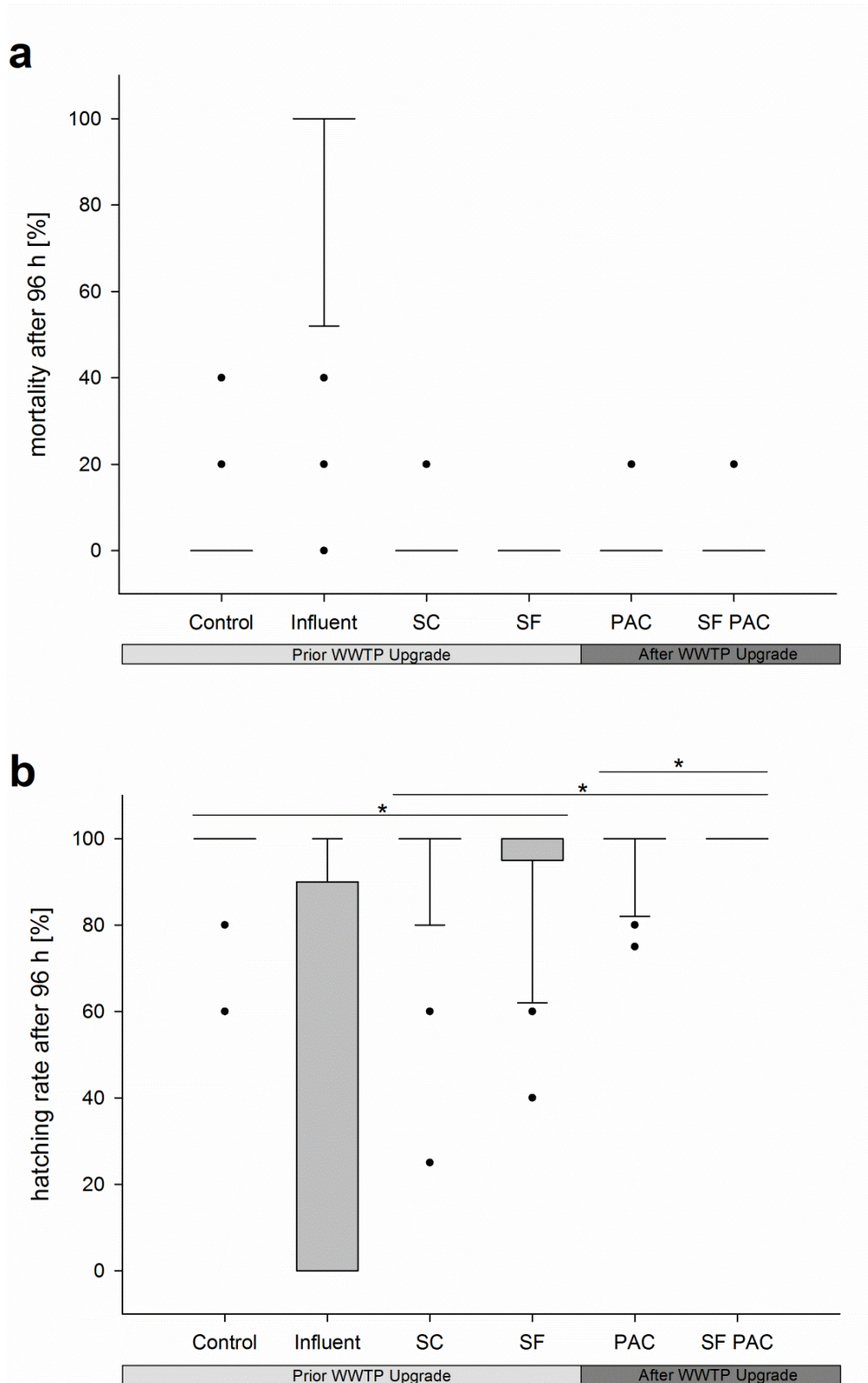


Figure 6: Mortality rates (a) and hatching rates (b) of zebrafish embryos exposed to samples from different effluents of the WWTP Langwiese. Significant differences (* $p < 0.05$) were found between (1) SC and control treatment; (2) SC and SF PAC; (3) PAC and SF PAC. The entire dataset recorded for all sampling events and test runs were assessed by Fisher's exact test. In order to correct for multiple testing, the Holm-Bonferroni method was applied. Abbreviations: SC= secondary clarifier; SF= sand filter; PAC= activated carbon; PAC SF = powdered activated carbon followed by sand filtration

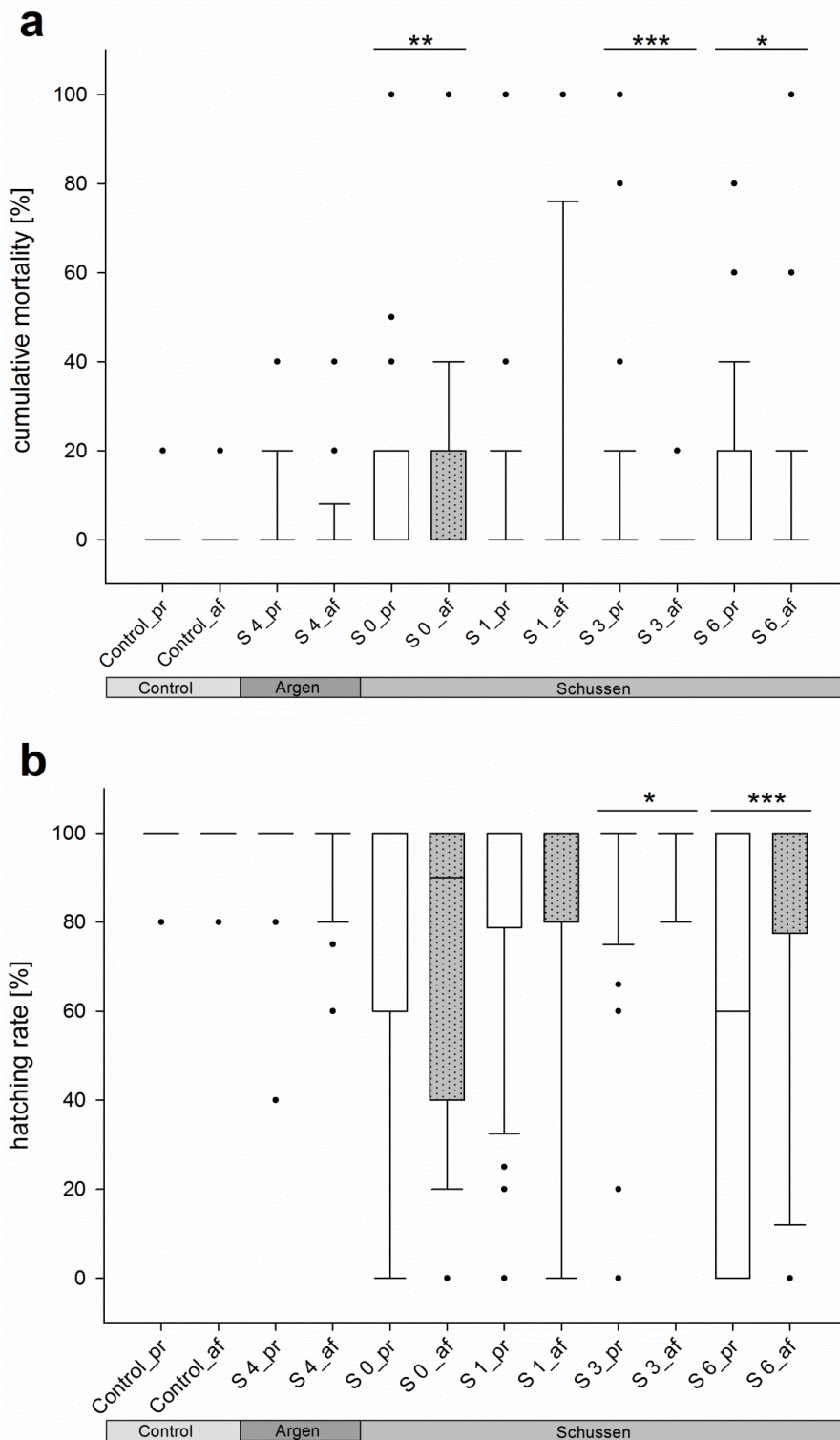


Figure 7: Mortality rates (a) and hatching rates (b) of zebrafish embryos exposed to native sediment and surface water samples from the rivers Schussen and Argen. Significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$) were found at sampling sites 0, 3, and 6 at the Schussen River. The entirety of data for all sampling events and test runs were assessed by the Likelihood ratio test. Treatment description: treatments ending with **_b** = prior to WWTP upgrade with PAC; treatments ending with **_a** = after WWTP upgrade with PAC**

Discussion

The physicochemical measurements did not reveal any differences between the investigated sampling sites. With exception of the elevated nitrate concentrations at the Schussen River, all measured values indicated a good ecological condition according to the guidance values defined by the German Working Group on Water Issues (LAWA) (LUBW, 2008) and the German Regulation Act for Surface Waters of 2011 (OGewV, 2011). The elevated nitrate concentrations at the Schussen River can likely be attributed to humic substances which occur naturally in the Schussen River and also to intense agricultural land use in the Schussen catchment area. Nevertheless, it was obvious that differences in zebrafish development as recorded in the FETs on environmental samples cannot be reasonably attributed to these physicochemical parameters.

Data from the chemical analyses clearly demonstrate that the additional purification step with PAC results in a further reduction of the measured chemical substances in both the effluent of the WWTP Langwiese and in samples of the sampling sites 3 and 6 (see Table 4 and Figures 3 - 5). However, at sampling site 6, the concentrations for two compounds (diclofenac and carbamazepine) were slightly increased after the upgrade of the WWTP Langwiese. This increase can mainly be explained by the discharges of the WWTP Eriskirch, which is has not been upgraded with an additional cleaning stage. The obtained data are particularly important with regard to frequently used compounds like carbamazepine, benzotriazole, diclofenac, and many other substances which are not or only insignificantly reduced during conventional waste water treatment, even in WWTPs equipped with 3 purification steps. With regard to the reduction of trace substances and toxic effects, the effectivity of an additional PAC stage in waste water treatment (pilot- and full-scale studies) has been previously described in several studies such as, e.g., Boehler et al. (2012), Margot et al. (2013, 2013), Altmann et al. (2014), or Mailler et al. (2015). All of these studies highlighted the importance of the additional purification step for a sufficient and sustainable waste water treatment. However, studies addressing the impact of such WWTP upgrades on the toxic potential in compartments of connected ecosystems are rare.

Studies on effluent samples from the WWTP Langwiese revealed only minor effects on zebrafish embryogenesis. Even though mortality did not differ significantly between conventional and advanced treatment, with regard to sublethal endpoints an elevated hatching rate in embryos exposed to PAC-treated wastewater was observed. This result points to a slight but still recognizable further reduction of embryotoxic potentials due to the use of the additional PAC-based purification step. In this context it needs to be considered that the 'conventional' treatment steps in a technologically highly developed country (tertiary treatment with sand filtration and combined flocculation) already resulted in a distinct reduction of embryotoxic potentials during the purification process. Nevertheless, our data

show, even at this high technological level, that a further reduction of embryotoxic potentials in effluents can be achieved by PAC-technology.

In addition, fish embryo tests with native sediment and surface water samples from the investigated field sites revealed even clearer effects. Here, a significant reduction of embryotoxic effects was observed in samples of the sampling sites 3 und 6 (downstream of the WWTP), after the upgrade of the WWTP Langwiese, which is particularly indicative for the improvement at these downstream locations as the sampling sites 0, 1 (upstream of the WWTP), and 4 (reference site) that are not influenced by this WWTP showed the opposite trend at the same time. For this reason, the improvement of the situation at sites 3 and 6 cannot result from a general fluctuation of environmental parameters from year to year but rather has to be related to the specific location of these two downstream sites. Sediments provide a large number of binding sites for several contaminants due to their composition by inorganic and organic components (Gerbersdorf et al., 2011; Hollert et al., 2009). Thus, they are able to temporally integrate over the toxicity exerted by pollutant burdens over a longer time span. They also deliver more information about pollution levels than a 24 h bulk sample taken from a WWTP effluent. The chemical analytics identified several substances like the widely used pharmaceuticals diclofenac and carbamazepine in the effluent of the WWTP Langwiese. Many of the substances originating from municipal wastewaters are known for their lipophilicity and low degradability in the environment and, therefore, are able to accumulate in stream sediments (Burke et al., 2014; Kunkel und Radke, 2012; Löffler et al., 2005). A general statement about the accumulation or biodegradation of substances in the environment cannot be made, as both parameters depend on many factors like pH, charge of the compound, total organic carbon (TOC) and oxygen conditions (Koumaki et al., 2016; Svahn und Björklund, 2015). Furthermore, most of the sediments in European rivers - including the Schussen River - already contain persistent and harmful substances like PAHs, PBDEs, and also abandoned compounds like PCBs (e.g. Barceló, 2007; Hafner et al., 2015) which interact with the effects of substances deriving from current waste water release. In the past years a number of studies have been published that demonstrated the effects of the above-mentioned substances on the health and the development of exposed zebrafish embryos. For instance, Perrichon et al. (2014) exposed zebrafish embryos to fluoranthene-spiked sediments and observed increased mortality rates and various developmental alterations. Similar observations were made by Usenko et al. (2011) in zebrafish embryos exposed to different PBDE congeners. However, it is documented that these compounds which have been identified as priority pollutants often only count for a minor part of the biological response (e.g. Wölz et al., 2008; Liu et al., 2014). A recent study of Qiang et al. (2016) showed that even low and environmentally relevant concentrations of carbamazepine are able to affect zebrafish development on the molecular level. In this study, already 1 µg/L carbamazepine impaired the expression pattern of neural-related genes in zebrafish embryos. Schwaiger et al. (2004)

exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different concentrations of diclofenac. The authors observed alterations in gills and kidney of rainbow trout after exposure to diclofenac in the lower µg/L range. Similar observations were made by Hoeger et al. (2005) after exposure of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) to different and environmentally relevant concentrations of diclofenac. The above-mentioned examples and also many other studies demonstrate that numerous anthropogenic substances which are released into rivers by WWTPs are able to affect not only the health and the development of the model organism zebrafish, but also the health of feral organisms. Since it is impossible to cover the entirety of pollutants present in the environment by chemical analytics, it cannot be decided which of these substances finally contributed to the observed effects in our experiments. Therefore, the studied effects have to be attributed to the entirety of factors present in water and sediment, including mixture effects and interactions of chemicals with confounding factors. In this case, the fish embryo test with the zebrafish and native sediment and surface water samples represents an adequate research method since it integrates over the impact of all compounds present in an environmental sample.

The obtained results revealed a positive development of the ecotoxicological situation at sites 3 and 6, downstream of the WWTP effluent. This positive effect can likely be attributed to the upgrade of the WWTP with an additional PAC stage in autumn 2013, because the WWTP Langwiese is, by far, the largest sewage treatment plant at the Schussen River and its released waste waters represent 50 percent of the total wastewater load in this stream. It is noteworthy that this significant reduction of effects in samples of sites 3 and 6 after the upgrade of the WWTP Langwiese was visible despite the presence of 17 other, smaller WWTPs upstream of the WWTP Langwiese releasing their effluents into the Schussen River. The efficiency of this WWTP upgrade with a PAC stage was also demonstrated by Maier et al. (2016) and Peschke et al. (2016) who observed a distinct reduction of dioxin-like potentials in the WWTP effluents and an improvement of invertebrate's health and diversity in the Schussen River, respectively. In general, the positive long-term effects of WWTP upgrading with powdered activated-carbon was demonstrated in the works of Triebkorn et al. (2014) and Thellmann et al. (2015). The river Schmiecha, also located in Southwest Germany, which has been in the focus of the aforementioned studies, was historically highly polluted by waste waters released from textile industry. The stream was reported to appear 'stained in all colours' in these days, and higher organisms were not able to survive in the polluted water (Thellmann et al., 2015). In order to reduce the toxicity of effluents from the local textile industry, the connected WWTP in Albstadt-Ebingen (Schmiecha River) was equipped with a PAC stage and combined flocculation more than 20 years ago. Measurement data of Vogel et al. (2014) have proven an effective reduction of micropollutants by the powdered activated carbon stage in the WWTP Albstadt-Ebingen. The upgrade with the additional PAC stage also resulted

in a highly efficient recovery of the ecosystem as shown in the works of Thellmann et al. (2015) and Triebkorn et al. (2014).

Conclusions

Our results clearly demonstrate that an additional cleaning stage based on powdered activated carbon (PAC) represents an efficient and adequate technology for the reduction of trace substances in the treated waste water and also, notably, for the reduction of embryotoxic potentials in stream sediments. Activated carbon filtration is an advanced technology which takes advantage of the adsorption of contaminants onto a large inner surface of PAC that is between 300 und 2000 m² per gram, due to the high porosity of the particles. Adsorption of substances to PAC, particularly organic chemicals that may exert embryotoxicity, but also other chemicals like chlorine or fluorine is based on van der Waals forces. This method has been shown to be very effective in removing organic chemicals in high concentrations, e.g. dyes, from wastewater (Malik, 2004). The positive effects of the additional PAC stage on indigenous fish and invertebrates has been demonstrated in the works of Henneberg and Triebkorn (2015), Maier et al., (2016) and Peschke et al., (2016). Our results indicate that this additional wastewater treatment technology is not only of high relevance for the sustainable protection of aquatic biota, but is also of high relevance for humans. The latter is particularly the case when surface waters are used for drinking water supply. With regard to the demands of the EU Water Framework Directive (WFD), advanced waste water treatment with powdered activated carbon has to be regarded as an efficient technology for the sustainable protection of surface waters and aquatic biota. Furthermore, the FET with the zebrafish (*Danio rerio*) applied to native surface water and sediment samples proved to be a useful tool to assess the impact of WWTP effluents on the ecotoxicology of connected streams.

Acknowledgements

The authors want to thank Hans Güde (ISF Langenargen), Sabrina Giebner (Frankfurt U), Hans-J. Vogel (Regional Council Tübingen), Andreas Dieterich, Anja Henneberg, Stefanie Kraus (all Tübingen U), and all other colleagues for their support during the sampling campaigns.

Funding

The project SchussenAktivplus was funded by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and co-founded by the Ministry for the Environment, Baden-Württemberg. The project was connected to the BMBF action plan “Sustainable water management (NaWaM)” and was integrated in the BMBF frame programme “Research for sustainable development FONA”. Contract period: 1/2012

to 12/2014, Funding number: 02WRS1281A. Furthermore, financial contribution has been provided by Jedele & Partner GmbH, the AZV Mariatal, the city of Ravensburg, Ökonsult GbR, and the AV Unteres Schussental.

Also, we acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests. The funders had no role in study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript.

References

Abegglen C. (2010). Mikroverunreinigungen in Kläranlagen: Technische Verfahren zur Elimination von organischen Spurenstoffen. *Gas Wasser Abwasser*, 90(7), 587-594.

Altmann J, Ruhl AS, Zietzschmann F, & Jekel M. (2014). Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. *Water Research*, 55, 185-193.

Avar P, Zrínyi Z, Maász G, Takátsy A, Lovas S, G.-Tóth L, & Pirger Z. (2016). β -Estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11630-11638. doi:10.1007/s11356-016-6276-2

Barceló D. (2007). Effect-Directed Analysis of Key Toxicants in European River Basins. A Review (9 pp). *Environmental Science and Pollution Research - International*, 14(1), 30-38. doi:10.1065/espr2006.08.329

Birzle C. (2015). Etablierung und Validierung quantitativ-morphologischer Parameter bei Regenbogenforellen im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen - Inaugural Dissertation: Verlag Dr. Hut.

Boehler M, Zwicklenpflug B, Hollender J, Ternes T, Joss A, & Siegrist H. (2012). Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. *Water Science and Technology*, 66(10), 2115-2121.

Bonvin F, Jost L, Randin L, Bonvin E, & Kohn T. (2016). Super-fine powdered activated carbon (SPAC) for efficient removal of micropollutants from wastewater treatment plant effluent. *Water Research*, 90, 90-99.

Burke V, Greskowiak J, Asmuß T, Bremermann R, Taute T, & Massmann G. (2014). Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Science of the Total Environment*, 482, 53-61.

da Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, & Barceló D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 85(8), 1331-1339.

Eggen RI, Hollender J, Joss A, Schärer M, & Stamm C. (2014). Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: the benefits of upgrading wastewater treatment plants. *Environmental science & technology*, 48(14), 7683-7689.

Feswick A, Loughery JR, Isaacs MA, Munkittrick KR, & Martyniuk CJ. (2016). Molecular initiating events of the intersex phenotype: Low-dose exposure to 17 α -ethinylestradiol rapidly regulates molecular networks associated with gonad differentiation in the adult fathead minnow testis. *Aquatic toxicology*, 181, 46-56. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.021>

Gerbersdorf SU, Hollert H, Brinkmann M, Wieprecht S, Schüttrumpf H, & Manz W. (2011). Anthropogenic pollutants affect ecosystem services of freshwater sediments: the need for a “triad plus x” approach. *Journal of Soils and Sediments*, 11(6), 1099-1114.

Göbel A, McArdell CS, Joss A, Siegrist H, & Giger W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 372(2–3), 361-371. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.07.039>

Hafner C, Gartiser S, Garcia-Käufer M, Schiwy S, Hercher C, Meyer W, . . . Keiter S. (2015). Investigations on sediment toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16358-16370.

Henneberg A, & Triebkorn R. (2015). Efficiency of advanced wastewater treatment technologies for the reduction of hormonal activity in effluents and connected surface water bodies by means of vitellogenin analyses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Environmental Sciences Europe*, 27(1), 1.

Hoeger B, Köllner B, Dietrich DR, & Hitzfeld B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic toxicology*, 75(1), 53-64. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.07.006>

Hollert H, Ernst M, Seiler T-B, Wölz J, Braunbeck T, Kosmehl T, . . . Erdinger L. (2009). Strategien zur Sedimentbewertung—ein Überblick. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 21(2), 160-176. doi:10.1007/s12302-009-0045-5

Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, & Braunbeck T. (2003). A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments*, 3(3), 197-207. doi:10.1065/jss2003.09.085

Huang B, Sun W, Li X, Liu J, Li Q, Wang R, & Pan X. (2015). Effects and bioaccumulation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 169-176. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.004

Johnson AC, Dumont E, Williams RJ, Oldenkamp R, Cisowska I, & Sumpter JP. (2013). Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards? *Environ Sci Technol*, 47(21), 12297-12304. doi:10.1021/es4030035

Joss A, Keller E, Alder AC, Göbel A, McArdell CS, Ternes T, & Siegrist H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39(14), 3139-3152. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.031

Koumaki E, Mamais D, & Noutsopoulos C. (2016). Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. *Journal of hazardous materials*.

Kunkel U, & Radke M. (2012). Fate of pharmaceuticals in rivers: deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Research*, 46(17), 5551-5565.

Liu L, Chen L, Shao Y, Zhang L, Floehr T, Xiao H, . . . Wu L. (2014). Evaluation of the Ecotoxicity of Sediments from Yangtze River Estuary and Contribution of Priority PAHs to Ah Receptor-Mediated Activities. *PLoS ONE*, 9(8), e104748. doi:10.1371/journal.pone.0104748

Löffler D, Römbke J, Meller M, & Ternes TA. (2005). Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental science & technology*, 39(14), 5209-5218.

Logar I, Brouwer R, Maurer M, & Ort C. (2014). Cost-benefit analysis of the Swiss national policy on reducing micropollutants in treated wastewater. *Environmental science & technology*, 48(21), 12500-12508.

Lonappan L, Brar SK, Das RK, Verma M, & Surampalli RY. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International*, 96, 127-138. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014

LUBW. (2008). Bewirtschaftungsziele für Fließgewässer. Arbeitshilfe zur Erstellung der Maßnahmenprogramme im Rahmen des ersten Bewirtschaftungsplans zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (German).

Lüddeke F, Heß S, Gallert C, Winter J, Guede H, & Loeffler H. (2015). Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, 69, 243-251.

Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, . . . Wang XC. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473, 619-641.

Maier D, Benisek M, Blaha L, Dondero F, Giesy JP, Köhler H-R, . . . Triebkorn R. (2016). Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 47-58.

Mailler R, Gasperi J, Coquet Y, Deshayes S, Zedek S, Cren-Olivé C, . . . Caupos E. (2015). Study of a large scale powdered activated carbon pilot: removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, 72, 315-330.

Malik PK. (2004). Dye removal from wastewater using activated carbon developed from sawdust: adsorption equilibrium and kinetics. *Journal of hazardous materials*, 113(1), 81-88.

Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, De Alencastro LF, . . . Schärer M. (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Science of the Total Environment*, 461, 480-498.

Meinel F, Ruhl AS, Sperlich A, Zietzschmann F, & Jekel M. (2014). Pilot-Scale Investigation of Micropollutant Removal with Granular and Powdered Activated Carbon. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(1), 2260. doi:10.1007/s11270-014-2260-y

Molinos-Senante M, Reif R, Garrido-Baserba M, Hernández-Sancho F, Omil F, Poch M, & Sala-Garrido R. (2013). Economic valuation of environmental benefits of removing pharmaceutical and personal care products from WWTP effluents by ozonation. *Science of the Total Environment*, 461–462, 409-415. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.009

Mousel D, Palmowski L, & Pinnekamp J. (2017). Energy demand for elimination of organic micropollutants in municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 575, 1139-1149. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.197

Nikoleris L, Hultin CL, Hallgren P, & Hansson MC. (2016). 17 α -Ethinylestradiol (EE2) treatment of wild roach (*Rutilus rutilus*) during early life development disrupts expression of genes directly involved in the feedback cycle of estrogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 180, 56-64. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.12.002>

OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test: OECD Publishing.

OGewV. (2011). Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV). doi:<https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ogewv/gesamt.pdf> (German).

Perrichon P, Le Bihanic F, Bustamante P, Le Menach K, Budzinski H, Cachot J, & Cousin X. (2014). Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 13703-13719. doi:10.1007/s11356-014-3502-7

Peschke K, Burmester J, Hermann M, Köhler H-R, Reitter K, Scheurer M, . . . Tribskorn R. (2016). Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe (German). *gwf - Wasser|Abwasser*, 157(04), 370-379.

Qiang L, Cheng J, Yi J, Rotchell JM, Zhu X, & Zhou J. (2016). Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*, 25(7), 1426-1437.

Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, & Negele RD. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic toxicology*, 68(2), 141-150. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.014>

Svahn O, & Björklund E. (2015). Describing sorption of pharmaceuticals to lake and river sediments, and sewage sludge from UNESCO Biosphere Reserve Kristianstads Vattenrike by chromatographic asymmetry factors and recovery measurements. *Journal of Chromatography A*, 1415, 73-82.

Thellmann P, Köhler H-R, Rößler A, Scheurer M, Schwarz S, Vogel H-J, & Tribskorn R. (2015). Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16405-16416. doi:10.1007/s11356-014-3785-8

Triebskorn R, Casper H, Scheil V, & Schwaiger J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1405-1416. doi:10.1007/s00216-006-1033-x

Triebskorn R, & Hetzenauer H. (2012). Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe*, 24(1), 1-24.

Triebskorn R, Thellmann P, Vogel H-J, & Wurm K. (2014). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie? (German). *Korrespondenz Wasserwirtschaft*, 7(10), 1-13.

Usenko C, Robinson E, Usenko S, Brooks B, & Bruce E. (2011). PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(8), 1865-1872. doi:10.1002/etc.570

Vieno N, & Sillanpää M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International*, 69, 28-39. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021

Vogel H-J, Baur S, Triebskorn R, Rößler A, & Metzger S. (2014). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: 20 Jahre Pulveraktivkohleeinsatz im Vollstrom (German). *Korrespondenz Abwasser, Abfall*, 61(10), 902-907.

Wölz J, Engwall M, Maletz S, Olsman Takner H, van Bavel B, Kammann U, . . . Hollert H. (2008). Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine — a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(7), 536. doi:10.1007/s11356-008-0056-6

Kapitel 2.3.1: Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie?

Korrespondenz Wasserwirtschaft (7) · Nr. 10 (2014); DOI: 10.3242/kwe2014.10.004

Rita Triebkorn, Paul Thellmann, Hans-J. Vogel, Karl Wurm

Schlagwörter: Ökotoxikologie, Gewässerökologie, Pulveraktivkohle, Spurenstoffe, Fischgesundheit, Makrozoobenthos

Zusammenfassung

Ökotoxikologische und gewässerökologische Untersuchungen an der Schmiecha oberhalb und unterhalb der seit über 20 Jahren mit Pulveraktivkohleanlage ausgestatteten Kläranlage (KA) Albstadt-Ebingen, Baden-Württemberg, zeigten keinen negativen Einfluss der KA auf das Gewässerökosystem. Dies konnte durch (1) limnochemische und physikochemische Gewässeruntersuchungen, (2) Studien zum Gesundheitszustand von Fischen (Histologie und Stressprotein-Nachweise innerer Organe, Mikrokerne als Nachweis genotoxischer Effekte, Embryotests zum Nachweis entwicklungstoxischer Potentiale) ebenso wie durch die Gütecharakterisierung des Fischbestands und der Makrozoobenthosgemeinschaft (Saprobienindex, Anzahl sensibler Taxa) nachgewiesen werden. Der langjährige Betrieb der KA Albstadt-Ebingen mit einer Pulveraktivkohlestufe im Vollstrom erweist sich somit als nachhaltiger Erfolg für die Fischgesundheit und das Gewässerökosystem im angeschlossenen Gewässersystem der Schmiecha.

1 Einleitung

Um einen guten ökologischen und chemischen Zustand unserer Oberflächengewässer entsprechend den Vorgaben der WRRL nachhaltig garantieren zu können, müssen Stoffeinträge sowohl an ihrer Quelle auf Notwendigkeit und Qualität hin überprüft und ggf. reduziert als auch durch moderne Reinigungstechnologien im Abwasserbereich minimiert werden. Durch konventionelle Kläranlagen (KA) wurde der Eintrag von Nährstoffen (Stickstoff- und Phosphorverbindungen) in Oberflächengewässer in den vergangenen Jahrzehnten zwar deutlich verringert, doch werden Stoffe, wie z.B. Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel oder andere Haushaltschemikalien oftmals nicht vollständig bzw. nur unzureichend in der konventionellen Abwasserreinigung eliminiert [1]. Zusätzliche Reinigungsstufen (Ozonung, Aktivkohle- und Sandfiltration) können solche Spurenstoffe in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffklasse entweder vollständig entfernen oder zumindest drastisch reduzieren [2, 3, 4].

Im Gebiet der Stadt Albstadt befinden sich zwei Kläranlagen, die seit 1992 mit einer weiteren Reinigungsstufe ausgestattet sind, die sich aus Aktivkohleadsorption, chemischer Flockung und

Filtration zusammensetzen. Die kleinere der beiden Anlagen ist die Verbandskläranlage Albstadt-Lautlingen mit 36000 EW, die Größere die Kläranlage Albstadt-Ebingen mit 125000 EW, um die es im Folgenden geht. Der Ausbau hatte ursprünglich zum Ziel, aus Textilfabriken stammende Farbstoffe und biologisch schwer abbaubare Substanzen zu eliminieren und so die Wasserqualität der aufnehmenden Gewässer zu verbessern. Die Dosierung der Pulveraktivkohle erfolgt bisher im Vollstrom in Abhängigkeit von der Farbigkeit. In den Werksferien der Textilbetriebe und in größeren Regenwetterphasen wurde daher bislang keine Kohle zugegeben, die aber aufgrund der Rückführung in den Schlammkreislauf noch länger adsorptiv wirkt.

Der Anteil des Textilabwassers ist in den vergangenen Jahren stark gesunken. Heute ist davon auszugehen, dass durch die zusätzlichen Reinigungsstufen auch weitere Spurenstoffe, wie bspw. Arzneimittel oder Biozide dem Abwasser entzogen werden, da nur noch wenige Einträge aus der Textilindustrie erfolgen. Für das angeschlossene Gewässersystem der Schmiecha bedeutet dies, dass die unterhalb dieser Kläranlagen lebenden Organismen langfristig relativ geringeren Konzentrationen an Spurenstoffen gegenüber exponiert waren bzw. sind und damit einen Gesundheitszustand aufweisen sollten, der diese relativ geringe Belastung mit Spurenstoffen widerspiegelt. Oberhalb der Kläranlage Albstadt-Ebingen gibt es nur noch Entlastungen aus der Regenwasserbehandlung. Gleichzeitig sollten auch der Zustand der Fischpopulationen sowie verschiedene Gewässergütekriterien den Erfolg langfristiger Spurenstoffentnahme dokumentieren. Ob dies der Fall ist, wird in der vorliegenden Arbeit exemplarisch für die KA Albstadt-Ebingen sowie das angeschlossene Gewässersystem der Schmiecha untersucht.

Es wurden hierzu limnologische, gewässerökologische und ökotoxikologische Untersuchungen ober- und unterhalb der Einleitung der KA Albstadt-Ebingen sowie als Referenz an einer nicht durch Einträge belasteten Probestelle im Oberlauf der der Schmiecha durchgeführt.

2 Material und Methoden

A) Die Kläranlage Albstadt-Ebingen

Die Kläranlage Albstadt-Ebingen (Trockenwetterabfluss 440 L/s; Regenwetterabfluss 980 L/s), die schon in den Sechzigerjahren über eine biologische Abwasserreinigung verfügte und heute einen Anschlusswert von 125000 Einwohnerwerten hat, wurde 1992 mit einer Pulveraktivkohlestufe mit anschließender Sandfiltration ausgestattet. Dies zielte ursprünglich auf die Elimination von Farbrückständen aus der Textilindustrie. Das Ablaufschema ist in Abb. 1 dargestellt.

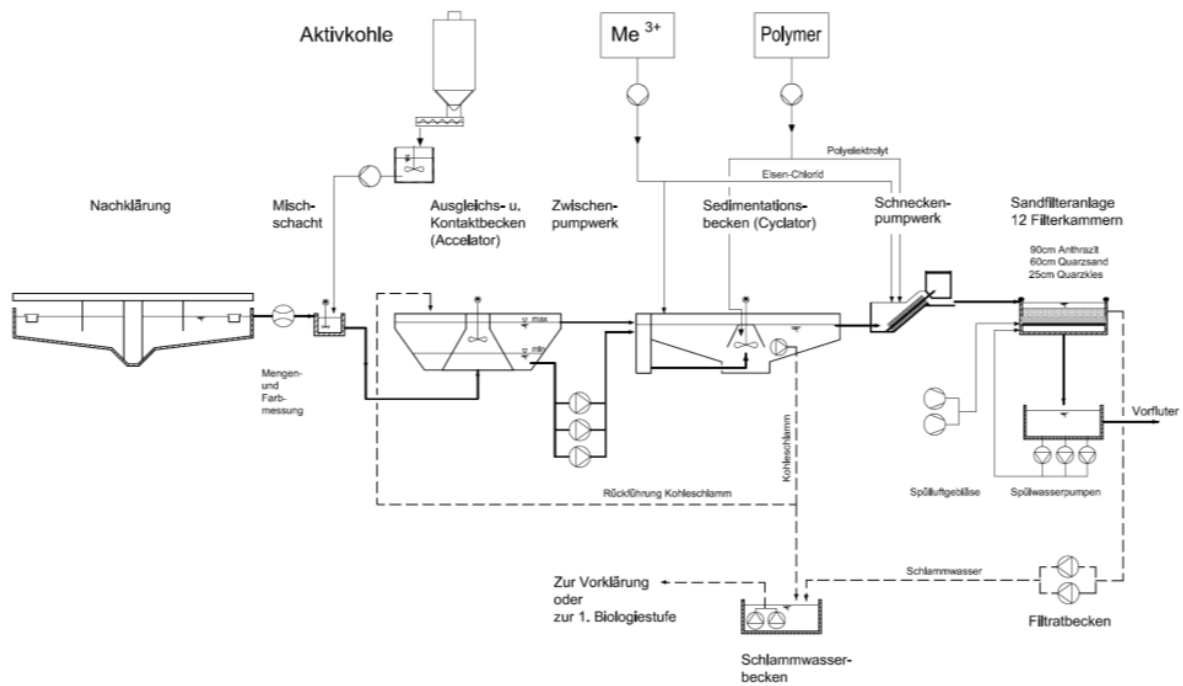


Abbildung 1: Ablaufschema der KA Albstadt-Ebingen (Quelle SAG)

B) Probestellen

An der Schmiecha (Wasserabflüsse: MQ 656 L/s; MNQ 64 L/s) wurden zwei Probestellen oberhalb und eine Probestelle unterhalb der KA untersucht (Abb. 2), wobei die oberste Stelle (nahe der Quelle) als Referenzstelle gewählt wurde, da sie sich oberhalb aller Regenüberlaufbecken befindet und somit nicht durch Abwasser beeinträchtigt ist. Für die Probestellen wurden folgende Codes gewählt:

SO2 Schmiecha in Albstadt-Onstmettingen; Referenzstelle

SO Schmiecha in Albstadt-Ebingen; oberhalb der Einleitung der KA Ebingen

SU Schmiecha bei Ebingen; unterhalb der Einleitung der KA Ebingen

Zusätzlich wurde eine Ablaufprobe der KA limnochemisch und ökotoxikologisch charakterisiert.

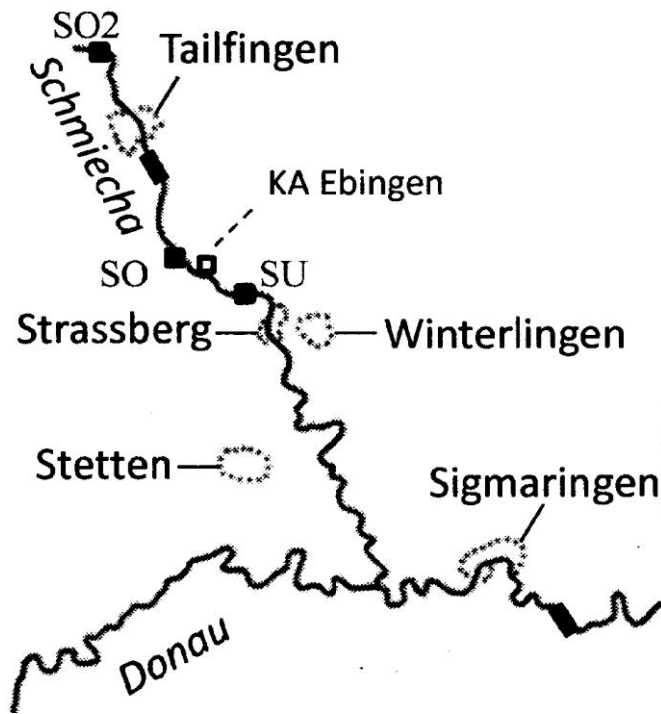


Abbildung 2: Die Probestellen an der Schmiecha

C) Probenentnahme für ökologische und ökotoxikologischen Tests

Gewässerökologische Untersuchungen

An den drei Standorten wurden in der Schmiecha zur Bestimmung der Gewässergüte (Modul Saprobie) und der Intaktheit des Gewässers (Modul „Allgemeine Degradation“) quantitative und qualitative Untersuchungen des Makrozoobenthos durchgeführt. Zusätzlich wurden elektrofischereiliche Erhebungen der Fischfauna durchgeführt. Dabei wurde sowohl die Größe als auch die längen- bzw. altersmäßige Zusammensetzung des Fischbestandes bestimmt.

Ökotoxikologische Untersuchungen

An jeder Probestelle wurden (1) Wasser- und Sedimentproben zur Durchführung von Fischembryotests im Labor sowie (2) 10 Bachforellen (Alter ca. 2 bis 3 Jahre) mittels Elektrofischung entnommen. Die Tiere wurden nach Betäubung und Tötung vor Ort präpariert. Es wurden von jedem Tiere Gewebeprobe von Leber, Kieme, Niere und Gonade für histologische und biochemische (Stressproteine) Untersuchungen sowie je eine Blutprobe für den Nachweis genotoxischer Effekte entnommen.

D) Limnochemische und physikochemische Analysen

An allen Probestellen sowie im KA-Ablauf wurden vor Ort die Leitfähigkeit, Temperatur, pH-Wert sowie Sauerstoffsättigung und Sauerstoffgehalt bestimmt. Die entnommenen Proben wurden im Labor auf folgende Parameter hin untersucht: Nitrat-Stickstoff, Nitrit-Stickstoff, Ammonium-Stickstoff, Ortho-Phosphat-Phosphor, Chlorid, Carbonat- und Gesamthärte. Die Bewertung der Messwerte für die freilandprobestellen erfolgte auf der Basis der LAWA-Orientierungswerte aus dem Jahre 2008 [5] sowie der Oberflächengewässerverordnung von 2011 [6].

E) Untersuchungen des Makrozoobenthos

Die Probenahme des Makrozoobenthos erfolgte gemäß des Moduls „Makrozoobenthos“ der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL). Die quantitative Aufnahme des Makrozoobenthos wurde flächen- und substratbezogen nach den Vorgaben des Multi-Habitat-Sampling-Verfahrens durchgeführt, wobei zusätzlich eine Belegsammlung angelegt wurde. Die Ermittlung der Gewässergüte sowie weiterer ökologischer und statistischer Indices zum Makrozoobenthos erfolgte mithilfe der Software ASTERICS (AQEM/STAR Ecological River Classification System) Version 3.1.1 nach dem deutschen Fließgewässer-Bewertungssystem Perloides (s. <http://www.fliessgewaesserbewertung.de>).

F) Untersuchungen der Fischpopulationen

Für die elektrofischereiliche Bestandsaufnahme wurde ein stationäres 8 KW-Gleichstromgerät (Fa. EFKO, Typ FEG 8000) mit den Spannungsbereichen 150-300/300-600 VDC verwendet. Bei der Wat-Fischerei wurde stets gegen die Strömung gefischt, um Trübungen durch Sedimentaufwirbelungen zu verhindern. Die gefangenen Fische wurden entnommen und die Gesamtlängen bestimmt. Die Populationsstruktur der Fischbestände wurde über die Längen-Häufigkeits-Verteilung ermittelt.

G) Embryotests mit dem Zebrafisch

Befruchtete Eier des Zebrafisches (*Danio rerio*) wurden für 96 h gegenüber Wasser- und Sedimentproben der drei Probestellen, einer Stichprobe des KA-Ablaufs sowie gegenüber einer Negativkontrolle (Kunstwasser nach ISO 7346/3) exponiert. Die Tests erfolgten in Anlehnung an den Embryotest DarT [7] sowie den „Fish Early-life Stage Toxicity Test“ nach OECD [8]. Die Anwendung des Embryotests auf Sedimente erfolgte dabei nach der Modifikation von Hollert [9]. Zu definierten Zeitpunkten wurden entwicklungsrelevante Endpunkte (z.B. Schwanzablösung, Ausbildung von Somiten, Herzschlagrate, Schlupfrate, Ödeme, Fehlbildungen) untersucht. Mit jeder Probe wurden drei unabhängige Tests durchgeführt.

H) Histologische Untersuchungen

Leber und Kieme der Forellen wurden entnommen und in 2% Glutardialdehyd (in 0,1M Cacodylat-Puffer, pH 7,6) fixiert. Die Präparate wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet, geschnitten (Schnittdicke 2 µm), mit Hämatoxylin-Eosin (Übersichtsfärbung) bzw. PAS-Alcianblau (Nachweis von Glykogen und Schleimen) gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Bewertung des Gesundheitszustandes erfolgte entsprechend Triebkorn et al. [10] mithilfe einer fünfstufigen Klassifizierungsskala (1: Kontrollzustand; 3: Reaktionszustand; 5: Destruktionszustand).

I) Stressproteinnachweise

Zum Nachweis des Stressproteins Hsp70 wurden Proben von Kieme, Leber, Niere und Gonaden vor Ort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Labor biochemisch entsprechend der von Köhler et al. beschriebenen Methode [11] analysiert. Die Stressproteine wurden immunologisch detektiert, die Quantifizierung der Signale erfolgte über die Bestimmung des optischen Volumens der Proteinbanden relativ zu einem Hsp70-Standard.

J) Der Mikrokerntest zum Nachweis gentoxischer Effekte

Der Nachweis von Mikrokernen (DNA-Fragmente des Zellkerns nach Einfluss gentoxischer Noxen) in Blutzellen erfolgte nach der Methodik von Bolognesi & Hayashi [12]. Blutausstriche der Fische wurden vor Ort mit Methanol fixiert und im Labor mit GIEMSA-Lösung gefärbt. Von jeder Probe wurden 2000 Erythrozyten auf Mikrokerne hin untersucht.

K) Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme JMP 11.0 und Excel verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Tests: Die Analysen der Herzschlagdaten aus den Embryotests sowie der Daten aus den histologischen und proteotoxischen Untersuchungen startete mit einem Test auf Normalverteilung mithilfe des D'Agostino-Pearson Omnibus Test. Anschließend erfolgte die Prüfung der Varianzhomogenität mithilfe des Levene-Tests. Waren eine Normalverteilung sowie eine Varianzhomogenität gegeben, wurde eine Anova gefolgt von einem Tukey-Kramer post hoc Test herangezogen um die Herzschlagraten der einzelnen Behandlungsgruppen miteinander zu vergleichen. Im Falle von nicht normalverteilten und varianzhomogenen Daten wurde ein Kruskal-Wallis Test gefolgt von einem Steel-Dwass post-hoc Test herangezogen. Daten für Mortalitäts- und Schlupfraten wurden mithilfe der "Cox-Regression" analysiert. Für die statistische Analyse der

Entwicklungsdefizite (nach 24 h) und Fehlbildungen (nach 96 h) wurde der "Fisher's exact test" mit anschließender Bonferroni-Holm Anpassung durchgeführt.

3 Resultate

A) Limnologie

Die Messwerte an allen Probestellen ober- und unterhalb der Einleitung der KA Albstadt-Ebingen liegen für alle gemessenen Parameter nach [5, 6] in einem Bereich der einem guten bis sehr guten ökologischen Zustand entspricht (Tab. 1). Auch die Ablaufwerte der Kläranlage Albstadt-Ebingen sprechen für eine sehr gute Reinigungsleistung.

Tabelle 1: Limnochemische und physikochemische Messergebnisse für die drei Probestellen an der Schmiecha sowie den Ablauf der Kläranlage Albstadt-Ebingen. Blau unterlegt: sehr guter ökologischer Zustand; grün unterlegt: guter ökologischer Zustand des Gewässers nach LAWA-Orientierungswerten bzw. Oberflächengewässerverordnung

	SO2	SO	SU	KA-Ablauf
Leitfähigkeit [$\mu\text{s}/\text{cm}$]	564	652	720	889
Wassertemp. [$^{\circ}\text{C}$]	10,7	9,6	9,60	-
Sauerstoffsätt. [%]	91	97	101	-
Sauerstoffgehalt [mg/L]	9,09	10,2	10,3	-
NH ₄ -N [mg/L]	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
NO ₂ -N [mg/L]	0,004	0,004	0,003	0,004
NO ₃ -N [mg/L]	<0,3	1,7	3,5	7,9
PO ₄ -P [mg/L]	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Carbonathärte $^{\circ}\text{dH}$	20	17	17	14
Gesamthärte $^{\circ}\text{dH}$	23	19	19	18
pH-Wert	8,18	7,49	7,75	7,11
Chlorid [mg/L]	8	36	65	113

B) Makrozoobenthos

Die Schmiecha bewegt sich in dem nicht durch die Siedlungsentwässerung beeinflussten Oberlauf bei Onstmettingen (SO2) noch in der „sehr guten“ saprobiellen Zustandsklasse und an den beiden Untersuchungsstellen ober- (SO) und unterhalb (SU) der KA Ebingen in dem nach WRRL mindestens geforderten „gute saprobiellen Zustand“. Als Ursache für die leichte Verschlechterung der Saprobie und der Trophie zwischen der Referenzstelle (SO2) und der Untersuchungsstelle SO (oberhalb der KA) sind an erster Stelle die Einträge aus der Siedlungsentwässerung und an zweiter Stelle die

landwirtschaftlichen Einflüsse anzuführen. Die KA Ebingen bewirkt keine merkliche Erhöhung der sauerstoffzehrenden organischen Belastung in der Schmiecha. Der Anstieg des Saprobienindex um 0,1 unterhalb der KA-Einleitung ist als nicht signifikant einzustufen. Auch die eutrophierungsanzeigenden Arten weisen eine deutliche Tendenz zur Abnahme der Populationsdichte unterhalb der KA auf.

Die biologischen Indikatororganismen zeigen weiter an, dass die Schmiecha sowohl ober- als auch unterhalb der KA Ebingen ganzjährig „sehr gute“ Sauerstoffverhältnisse aufweist. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, dass die Artenzahl des Makrozoobenthos zwischen der Referenzstelle SO₂ und der Untersuchungsstelle SO von 27 auf 35 deutlich ansteigt und dass die Artenzahl unterhalb der KA Ebingen nur geringfügig abnimmt. Dieser Anstieg beruht auf einer Zunahme der Besiedlungsmöglichkeiten und der Nahrungsgrundlage entlang des Fließgewässerkontinuums ab dem quellnahen Bachoberlauf und ist somit als natürlich zu werten. Während die EPT Taxa keine wesentlichen Veränderungen zwischen den drei Untersuchungsstellen aufweisen, zeigen die besonders sensitiven Arten (nach der Austria-Liste) eine leichte Abnahme entlang des Untersuchungsabschnittes in der Schmiecha (Abb. 3).

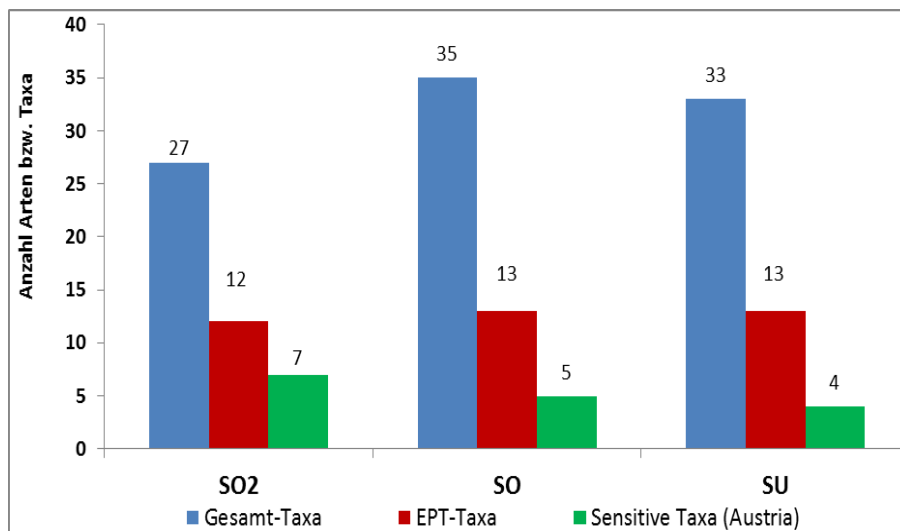


Abbildung 3: Die Veränderung der Gesamtartenzahl, der EPT-Taxa und der verschmutzungssensitiven Arten (Austria-Liste) innerhalb des Makrozoobenthos an den drei Untersuchungsstellen in der Schmiecha nach der biologischen Aufnahme am 17.10.2013

C) Fischpopulationen

Die Fischfauna setzt sich in der Oberlaufregion eines Fließgewässers natürlicherweise nur aus zwei Arten zusammen: der Bachforelle (*Salmo trutta*) und der Groppe (*Cottus gobio*). Im Referenzabschnitt bei Onstmettingen wurde ein der Gewässergröße entsprechender Bachforellenbestand nachgewiesen. Im Befischungsabschnitt oberhalb der KA Ebingen setzte sich der Bachforellenbestand überwiegend

aus zweisömmrigen Fischen zusammen. In diesem teilweise stark ausgebauten Teilstück der Schmiecha ist der Lebensraum für größere Fische deutlich eingeschränkt. Erschwerend kommt hinzu, dass in den sommer- und herbstlichen Niedrigwasserperioden die Wasserführung der Schmiecha oberhalb der KA-Einleitung sehr stark zurückgeht. Für das geringe Vorkommen einsömmriger Bachforellen sind dagegen im Wesentlichen nicht strukturelle Defizite verantwortlich, sondern Stoßbelastungen aus der Regenwasserbehandlung.

Unterhalb der Einleitung der KA Ebingen trat im Gegensatz zur Vergleichsstrecke oberhalb der KA ein sehr guter Sömmerlingsbestand der Bachforelle in der Schmiecha auf (Abb. 4). Das bedeutet, dass von der Kläranlage keine Beeinträchtigung der natürlichen Fortpflanzung der Bachforelle ausgeht. Vielmehr wird durch die KA-Einleitung die Stoßbelastung aus dem Oberlauf der Schmiecha erheblich verringert. Auch bei der Groppe wurde oberhalb der KA Ebingen nur noch ein ganz kleiner Bestand von 2 Gropen auf einer Gewässerstrecke von 100 Metern festgestellt. Unterhalb der Kläranlage verbesserte sich auch die Bestandssituation deutlich auf 11 Gropen pro 100 Meter (Abb. 5).

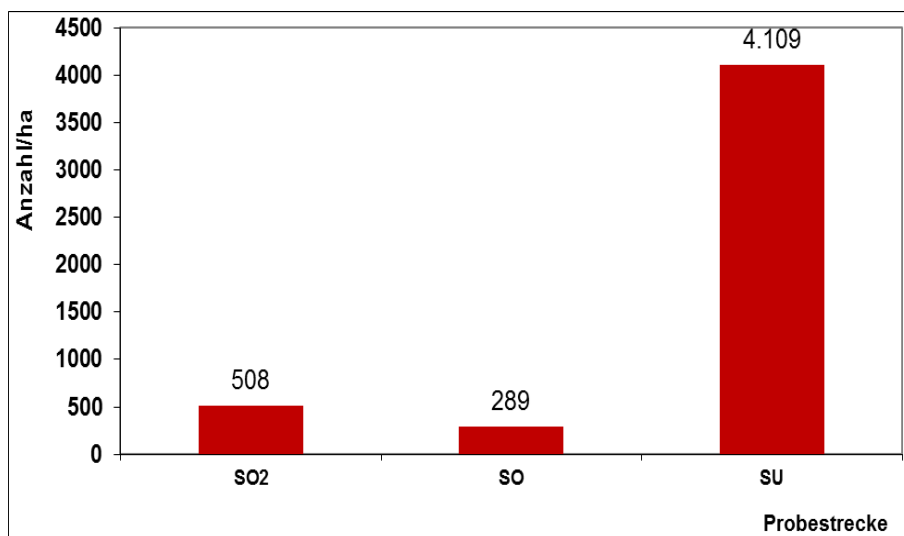


Abbildung 4: Die Anzahl der Bachforellensömmerlinge bezogen auf 1 ha in den drei Untersuchungsstrecken der Schmiecha nach der elektrofischereilichen Aufnahme am 26.06.2013

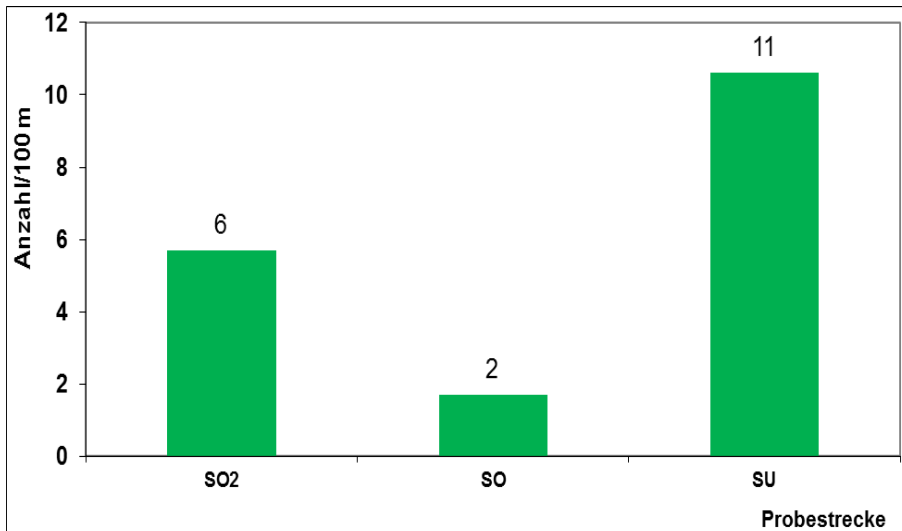


Abbildung 5: Die Anzahl der Groppe bezogen auf 100 m Fließstrecke in den drei Untersuchungsstrecken der Schmiecha nach der elektrofischereilichen Aufnahme am 26.06.2013

D) Embryotests mit dem Zebraföhrbling

Für keinen der untersuchten entwicklungsrelevanten Endpunkte konnten signifikante Unterschiede zwischen den drei Probestellen an der Schmiecha, der Laborkontrolle und dem Ablauf der Klöranlage festgestellt werden. Die Mortalitätsrate war in allen Expositionen sehr niedrig und lag zwischen 0 und 4 %. Exemplarisch sind in Abb. 6 und 7 die Ergebnisse für die Herzschlagrate und den Schlupferfolg eines Testdurchlaufs dargestellt.

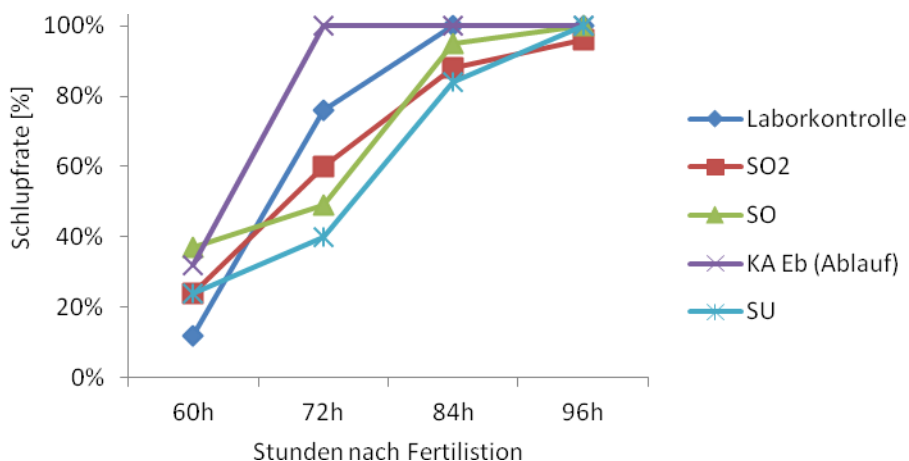


Abbildung 6: Schlupfrate der Embryonen nach Exposition gegenüber Proben des Klöranlagenablaufs sowie Proben der drei Probestellen (Sediment und Oberflächenwasser) und der Laborkontrolle; dargestellt ist einer von drei durchgeföhrten Testdurchläufen

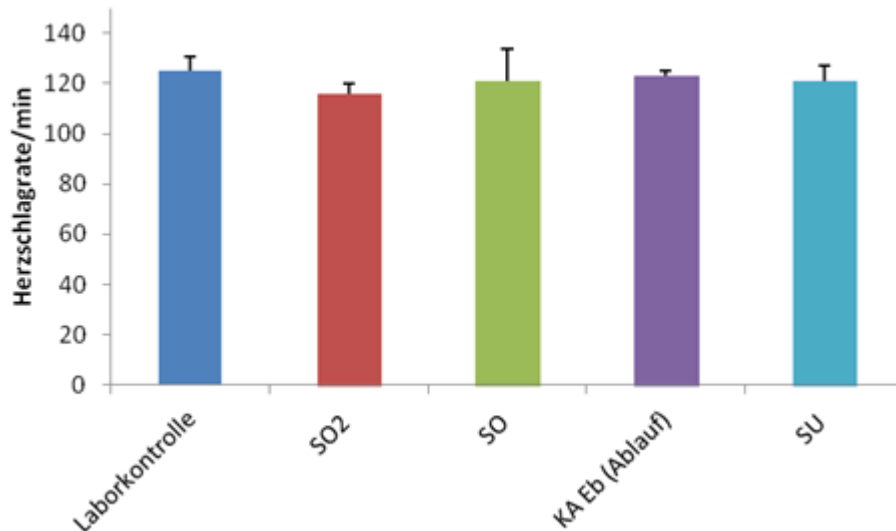


Abbildung 7: Herzschlagrate der Embryonen nach Exposition gegenüber einer Probe des Kläranlagenablaufs sowie gegenüber Proben der drei Probestellen (Sediment und Oberflächenwasser) und der Laborkontrolle; dargestellt ist einer von drei durchgeführten Testdurchläufen

E) Gesundheitszustand der Fische

Histologisch zeigten weder die Lebern noch die Kiemen der untersuchten Forellen signifikante Unterschiede zwischen den Probestellen. In beiden Organen wurden meist leichte, nur selten mäßige Veränderungen beobachtet, die aber nicht mit dem Einfluss der KA in Verbindung zu bringen sind, sondern die natürliche Variabilität des Gesundheitszustandes der Gewebe widerspiegeln. Dieser kann z.B. auch durch Parasiten oder durch den Ernährungszustand der Tiere beeinflusst werden. In der Leber waren dies kleinere Entzündungsherde, lokal leicht hypertrophe Zellkerne, Vakuolisierungen, stellenweise leicht erweiterte Kapillaren oder Variationen im Glykogengehalt. In der Kieme traten z.T. vergrößerte oder vermehrte Epithelzellen, leichte Fusionen der Sekundärlamellen sowie an einigen Stellen das Epithellifting auf. Für beide Organe lag die Bewertung des Gesundheitszustandes zwischen 2 und 2,5 (Abb. 8). Forellen, die am Bodenseezufluss Schussen aktiv exponiert waren, zeigen im Vergleich hierzu einen Gewebezustand, der z.T. schlechter als 4 bewertet wurde.

Auch hinsichtlich der **Stressproteingehalte** in den vier untersuchten Organen konnten zwischen den Probestellen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 9). Lediglich bei den Nieren lässt sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg von der Probestelle SO₂ bis hin zur Probestelle SU erkennen.

Gentoxische Effekte konnten in den Fischen aus der Schmiecha nicht nachgewiesen werden. In allen Blutastrichen konnten im Bereich von 0,2 % aller roten Blutzellen Mikrokerne nachgewiesen werden (Abb. 10). Dies liegt im Bereich von natürlicherweise vorkommenden Werten, wie sie z.B. von Al-Sabti & Metcalfe [13] beschrieben sind.

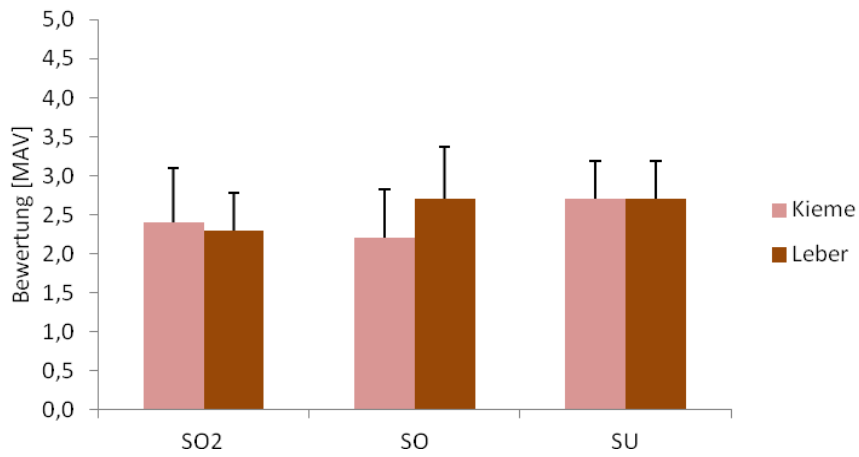


Abbildung 8: Bewertung der Histologischen Befunde in Leber und Kieme der untersuchten Bachforellen aus der Schmiecha

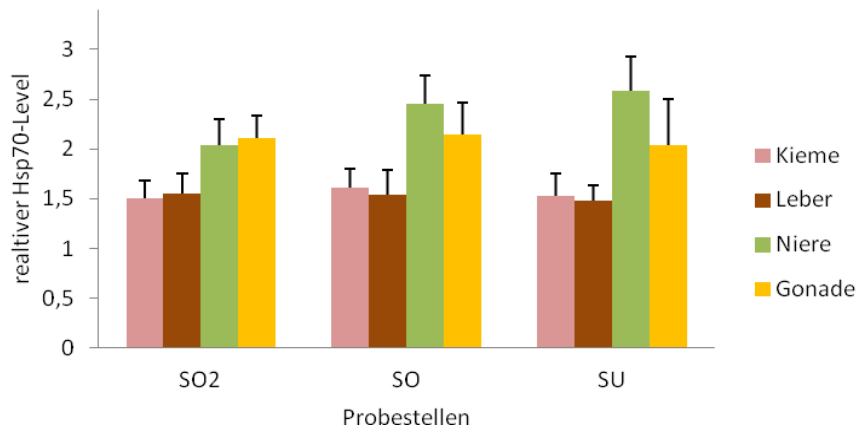


Abbildung 9: Stressproteinlevel in den Organen der untersuchten Bachforellen aus der Schmiecha

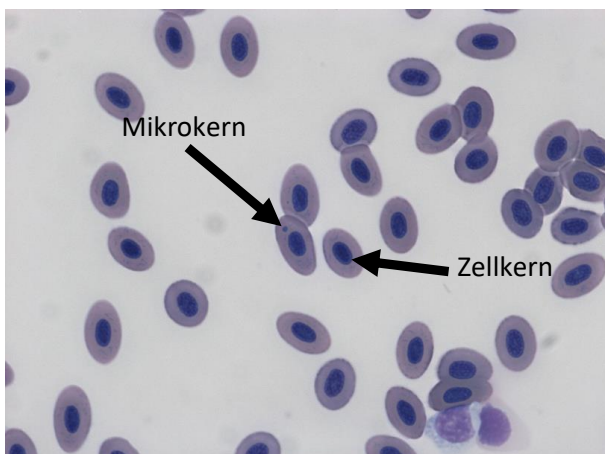


Abbildung 10: Rote Blutzellen einer Bachforelle aus der Schmiecha

4 Zusammenfassung der Resultate, Fazit und Ausblick

Die alle Ergebnisse zusammenfassende Tabelle 2 macht deutlich, dass die KA Albstadt-Ebingen keinen negativen Einfluss auf das Gewässerökosystem der Schmiecha nimmt. Der Gesundheitszustand der Fische ist an allen Stellen als zwar nicht optimal, aber als gut zu bewerten. Die Fischpopulationen entsprechen unterhalb der KA Ebingen den natürlichen Referenzverhältnissen dieses Gewässertyps. Es waren keine negativen Auswirkungen der Einleitung der KA Ebingen auf den Fischbestand und das Makrozoobenthos der Schmiecha feststellbar.

Tabelle 2: Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse; blau: sehr guter Zustand; grün: guter Zustand; gelb: mittelmäßiger Zustand; orange: mäßiger Zustand; rot: schlechter Zustand

	SO2	SO	SU
Limnochemische Parameter	blau	blau	grün
Physikochemische Parameter	blau	blau	blau
Makrozoobenthosgemeinschaft	blau	grün	grün
Fischpopulationen	blau	grün	blau
Gesundheitszustand der Fische	grün	grün	grün

Es liegt nahe, dass der langjährige Einsatz der Aktivkohle auf der KA die Stoffeinträge in die Schmiecha langfristig deutlich vermindert hat und dadurch der Zustand des Gewässersystems zwar nicht als vollkommen unbelastet (da ubiquitäre Einträge nicht reduziert werden), jedoch als relativ „gesund“ bewertet werden kann.

Für künftige Ausbaumaßnahmen auf Kläranlagen liefert die vorliegende Untersuchung das Signal, dass sich die Investition in die weiterführende Abwasserreinigung langfristig positiv auf Ökosysteme auswirken kann und dadurch ein Beitrag zur Erreichung der Ziele der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie geleistet wird.

5 Literatur

- [1] Heberer T., (2002): Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131, 5-17
- [2] Joss A., Siegrist H., Ternes T.A., (2008): Are we about to upgrade wastewater treatment for removing organic micropollutants? *Water Science and Technology*, 57(2), 251-255
- [3] Reungoat J., Macova M., Escher B.I., Carswell S., Mueller J.F., and Keller J., (2010): Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*, 44 (2), 625-637

- [4] Luo Y., Guo W., Ngo H.H., Nghiem L.D., Hai F.I., Zhang J., Liang S., Wang X.C., (2014): A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473-474, 619–641
- [5] LUBW (2008): Maßnahmenbedarf und Zielwerte für Maßnahmen an Fließgewässern in Baden-Württemberg, 29 S.
- [6] OGeV (2011): <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ogewv/gesamt.pdf>
- [7] Nagel R., (2002): DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio*– a General Model, *Ecotoxicology and Toxicology*. ALTEX 19, Suppl 1
- [8] OECD (1992): OECD Guideline 210 for testing of chemicals: Fish Early-life Stage Toxicity Test. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948269.pdf>
- [9] Hollert H., Keiter S., König N., Rudolf M., Ulrich M., Braunbeck, T., (2003): A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3, 197-207
- [10] Triebkorn R., Telcean I., Casper H., Farkas A., Sandu C., Stan, G., Colarescu G., Dori T., Köhler H.-R., (2008). Monitoring Pollution in River Mures, Romania, Part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*, 141(1-3), 177-188
- [11] Köhler H-R, Bartussek C, Eckwert H, Farian K, Gränzer S, Knigge T, Kunz N (2001): The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosys. Stress Recov.* 8, 261-279.
- [12] Bolognesi C., Hayashi M., (2011): Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26 (1), 205-213.
- [13] Al-Sabti K., Metcalfe C.D., (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343, 121-35

Danksagung

Unser Dank gilt dem Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg sowie der Stadt Albstadt-Ebingen für die Förderung dieses Projektes. Herrn Krause, KA Albstadt-Ebingen danken wir für die Unterstützung bei der Beprobung und für die zur Verfügung gestellte Literatur. Allen MitarbeiterInnen der Physiologischen Ökologie der Tiere danken wir für die tatkräftige Unterstützung bei der Beprobung.

Autoren

Prof. Dr. Rita Triebkorn, Dipl.-Biol. Paul Thellmann, Physiologische Ökologie der Tiere, Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen, Konrad-Adenauer-Str. 20, 72072 Tübingen

Dipl.-Ing. Hans-J. Vogel, Regierungspräsidium Tübingen, Referat 54.3, 72072 Tübingen

Dr. Karl Wurm, GLW (Gewässerökologisches Labor Wurm), Tulpenstr. 4, 72181 Starzach

E-Mail:

rita.triebskorn@uni-tuebingen.de

paul.thellmann@gmx.de

GLW.K.Wurm@t-online.de

hans-joachim.vogel@rpt.bwl.de

Kapitel 2.3.2: Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies

Environmental Science and Pollution Research 22:21 (2015); DOI: 10.1007/s11356-014-3785-8

Paul Thellmann^{1*}, Heinz-R. Köhler¹, Annette Rößler², Marco Scheurer³, Simon Schwarz¹, Hans-Joachim Vogel⁴, Rita Triebkorn^{1,5}

¹ Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Str.20, Tübingen D-72072, Germany

² Competence Centre for Trace Substances Baden-Württemberg (KomS), c/o University of Stuttgart, Bandtäle 2, D-70569 Stuttgart, Germany

³ Water Technology Centre Karlsruhe (TZW), Karlsruher Straße 84, Karlsruhe D-76139, Germany

⁴ Regional Commission (RP) Tübingen, Konrad-Adenauerstr. 20, Tübingen D-72072, Germany

⁵ Steinbeis Transfer- Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13. D-72108 Rottenburg, Germany

*Corresponding Author. Present address: Animal Physiological Ecology, Institute for Evolution and Ecology, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Strasse 20, Tübingen 72072, Germany

Tel.: +4970717573557. E-mail address: paul.thellmann@student.uni-tuebingen.de

Keywords: sediment, toxicity, fish embryo test, wastewater, powdered activated carbon

Abstract

In order to evaluate surface water and the sediment quality of rivers connected to wastewater treatment plants (WWTPs) with different treatment technologies, fish embryo tests (FET) with *Danio rerio* were conducted using native water and sediment samples collected upstream and downstream of four WWTPs in Southern Germany. Two of these WWTPs are connected to the River Schussen, a tributary of Lake Constance, and use a sand filter with final water purification by flocculation. The two others are located on the Rivers Schmiecha and Eyach in the area of the Swabian Alb, and were equipped with a powdered activated carbon stage twenty years ago, which was originally aimed at reducing the release of stains from the textile industry. Several endpoints of embryo toxicity including mortality, malformations, reduced hatching rate, and heart rate were investigated at defined time points of embryonic development. Higher embryotoxic potentials were found in water and sediments collected downstream of the WWTPs equipped with sand filtration than in the sampled downstream of both WWTPs upgraded with a powdered activated carbon stage.

Keywords: sediment, toxicity, fish embryo test, wastewater, powdered activated carbon

1. Introduction

In accordance with the requirements of the European Water Framework Directive (WFD), the quality of European surface waters has consistently improved during the last few decades. This is mostly due to the decreased discharge of oxygen-depleting compounds by wastewater treatment plants (WWTPs). Activities to further upgrade WWTPs with the aim of also reducing micropollutants (pharmaceuticals, pesticides, biocides, industrial agents, human care products) in effluents will contribute to an additional improvement of surface waters in the future (Reungoat et al., 2010; Luo et al., 2014). Such activity is of great importance for sustainable water management, since current wastewater treatment does not completely eliminate these substances (Abegglen et al., 2010), thus resulting in their continuous discharge into the aquatic environment (da Silva et al., 2011). The efficiency of additional wastewater treatment technologies such as, for example, ozonation or adsorption by sand filters and/or activated carbon with respect to reducing micropollutant releases is currently under research (Abegglen et al., 2010; Triebkorn et al., 2013). In addition to WWTPs, storm water overflow basins (SOBs) also contribute to the discharge of pollutants into surface waters (Steinmetz and Dittmer, 2010) because untreated wastewater may reach surface waters after heavy rainfall events. New technologies to improve the elimination of pollutants in these systems are also under investigation (Triebkorn et al., 2013).

Despite the improvement of surface water quality, stream sediments are still a matter of concern since they are known to be sinks for both currently released and already abandoned chemicals (Förstner et al., 2004; Brinkman et al., 2010). In this context, organic and inorganic compartments of sediments are known to possess a large number of binding sites for contaminants (Gerbersdorf et al., 2009; Hollert et al., 2009). Since sediment-bound pollutants can be remobilized by bioturbation (Power and Chapman, 1992) or flood events (Hollert et al., 2000; Oetken et al., 2005; Gerbersdorf et al., 2011) they can become available to and thus hazardous for aquatic biota (Bartzke et al., 2010). The presence of pharmaceuticals in the aquatic environment and the effects of polluted sediments have already been demonstrated in the studies by Keiter et al. (2006), Triebkorn and Hetzenauer (2012), and Vincze et al. (2014).

Embryotoxic effects resulting from micropollutant releases into aquatic ecosystems are of major concern with respect to the protection of the endemic fish fauna. The Fish Embryo Test (FET) with *Danio rerio* is a suitable tool for assessing embryotoxic potentials in water and sediments (Hollert et al., 2003). The present study therefore uses this test with the aim of evaluating the surface water and sediment quality of three streams which are connected to WWTPs using different treatment technologies. One of the investigated streams is the River Schussen, a major tributary of Lake Constance. The two WWTPs situated between the selected sampling sites at the River Schussen use a

sand filter with flocculation as the final purification stage. The impact of an SOB connected to one of these WWTPs was also included in this study. The two other streams, Schmiecha and Eyach, are located in the Swabian Alb area. They are both connected to WWTPs that have been equipped with a powdered activated carbon stage for more than twenty years with the aim of reducing the release of stains from the local textile industry.

2. Methods

Sampling locations

At three rivers in Southern Germany, the Schussen, the Schmiecha, and the Eyach, different field sites both upstream and downstream of wastewater treatment plants (WWTPs) were selected with the aim of investigating the embryotoxic potential of surface water and sediment in streams influenced by WWTPs using different treatment technologies. At the Schussen (mean flow rate: 11000 L/s), a tributary of Lake Constance, four sampling sites (SU1–SU4) both upstream and downstream of the WWTPs Langwiese (outflow in dry periods: 350 L/s) and Eriskirch were selected (Fig. 1). These two WWTPs represent conventional facilities equipped with a mechanical, a biological, and a chemical purification step followed by sand filtration and flocculation as the final cleaning stages. Both SU1 and SU2 are located upstream of the WWTP Langwiese. SU1 is situated upstream of the SOB Mariatal (which is connected to the WWTP Langwiese), and SU2 is located downstream of it. Regarding the fact that SOBs occasionally release untreated wastewater into the connected rivers, it was also of great importance to investigate the impact of the SOB Mariatal. SU3 and SU4 are both located downstream of the WWTP Langwiese: SU3 is about 5 km downstream, and SU 4 is about 17 km downstream of it. SU4 is, in addition, located directly downstream of the WWTP Eriskirch near the Schussen estuary, which opens out onto Lake Constance.

At each of the two rivers, the Schmiecha and Eyach, three sampling sites were defined upstream and downstream of the respective sewage treatment plant (Fig. 1). The River Schmiecha (mean flow rate: 660 L/s) is connected to the WWTP Ebingen (outflow in dry periods: 440 L/s), whereas the River Eyach (mean flow rate: 419 L/s) receives treated wastewater from the WWTP Lautlingen (outflow in dry periods: 125 L/s). Both WWTPs were equipped with powdered activated carbon cleaning stages and combined flocculation more than twenty years ago in order to reduce the toxicity of effluents from the local textile industry. Through improved wastewater treatment the water quality of these two streams has macroscopically improved (with no more staining of the water) over the last 20 years. In order to investigate whether active charcoal filters can further improve the ecological condition of streams by reducing the release of micropollutants in the long run, the two Rivers, Schmiecha and Eyach, were chosen. Sampling site SA1 is located close to the source of Schmiecha River (Fig. 1). This site is not influenced by any SOBs or WWTPs. It therefore serves as a reference site. Sampling sites SA2 and SA3

are located upstream and downstream, respectively, of the WWTP Ebingen (Fig. 1). At the Eyach, three sampling sites were examined, among which EY1 is located close to the source of the river (Fig. 1). This site is also not influenced by SOBs and WWTPs. The two other sites are located about 500 m upstream (EY2) and downstream (EY3) of the discharge of the WWTP Lautlingen (Fig. 1).

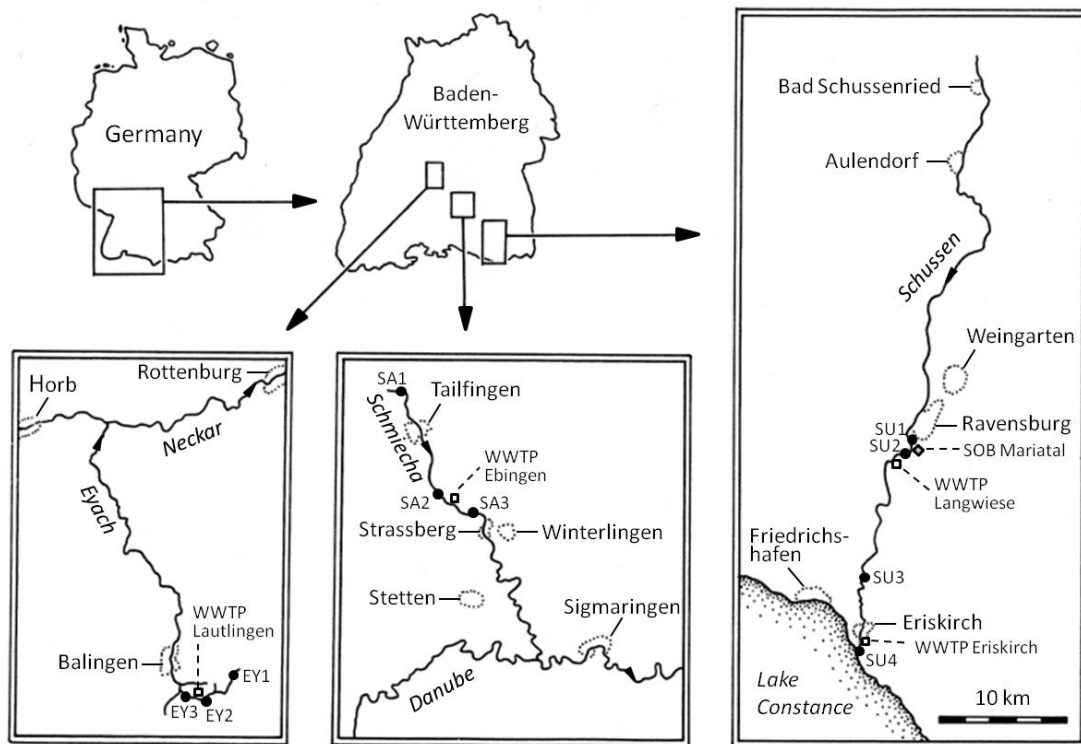


Fig. 1 Sampling sites at the Rivers Eyach, Schmiecha and Schussen; scaling is valid for all three maps

Sampling events

Samples were taken from the Schussen, Eyach, and Schmiecha on 14 May 2013, 28 June 2013, 9 July 2013, and 19 July 2013 (two sampling events on the Schussen). Water levels were in a “normal” range on these days, and no heavy rainfall events occurred two weeks prior to the sampling.

At each sampling site, water (750 ml) and sediment samples (300 g) were taken between May and July 2013. Surface water was sampled in the main current at a depth of 10 centimetres. Sediment samples were collected close to the riverside, where the first three to four centimetres were sampled. Three sterile 250 ml glass flasks were filled with surface water (Schott Duran, Mainz, Germany) and sediment was divided into batches of 100 g, wrapped in aluminium foil (Roth, Karlsruhe, Germany). During transportation to the laboratory, the samples were kept in a cool box at 4 °C. After arrival at the lab,

water and sediment were frozen immediately at -20 °C. The duration of freezing was two to eight weeks. For each of the three conducted test runs, one glass flask with surface water and one aluminium package with sediment was thawed 4 days prior to the test.

Physico-chemical water parameters

During the sampling events, water temperature, pH, conductivity, and oxygen concentration were measured directly in the water current at all sampling sites. Measurements were conducted at the same spots where sediment and water samples for embryo tests were taken. Furthermore, 1 litre of river water was sampled in a sterile glass flask at each field site for additional limnological investigations. These water samples were transported to the laboratory in a cool box at 4 °C. The levels of nitrate, nitrite, ammonium, phosphate, chloride (test kits from Macherey-Nagel, Düren, Germany), carbonate, and total hardness (test kits from Merck, Darmstadt, Germany) were determined. The assessment of the measured values was based on the new guidance values defined by the German Working Group on Water Issues (LAWA; LUBW, 2008) and the German Act for the Regulation of Surface Waters of 2011 (OGewV, 2011).

Chemical Analyses

Chemical analyses of effluent samples were conducted by the DVGW Water Technology Center (TZW) in Karlsruhe, Germany. All analytical methods are based on high-performance liquid chromatography (HPLC, 1200 or 1290 series Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) separation coupled to tandem mass spectrometry detection (API 4000, 4500 and 5500 series, AB Sciex, Framingham, USA). WWTP effluents were diluted by factor 5 and limits of quantification (LOQ) were 50 ng/L for micropollutants. In detail, for the analysis of X-ray contrast media 200 mL sample volume was used for solid phase extraction (SPE). Prior to extraction with styrene-divinylbenzene (SDB) sorbent material (200 mg, 6 mL, J.T.Baker, Philipsburg, USA) pH of the samples was set to 3.0 with hydrochloric acid. Likewise applying to all the methods described below, the SPE sorbent was dried in a gentle stream of nitrogen, cartridges were eluted with an organic solvent, and the eluate was blown down to dryness. For analysis of X-ray contrast media the residue was reconstituted with 0.5 mL of ultra pure water. Separation of the analytes was achieved with a Hypersil GOLD HPLC column (100 x 2.1 mm, 3 µm, Thermo Scientific, Waltham, USA). Ultra pure water (A) and methanol (B), both with 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid, were used as HPLC buffers.

Sample preparation and analysis for 1H-benzotriazole comprised the SPE extraction of 10 mL sample (pH 7) with a modified SDB polymer sorbent (Priority PolLutant (PPL) Bond Elut, 200 mg, 3 mL, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Here the sample was reconstituted with 100 µL of ultrapure water. The column used for separation of 1H-benzotriazole from other benzotriazole compounds was a

Kinetex C18 (100 x 2.1 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Buffers used for HPLC were 2 mM ammonium carbonate in ultra pure water (A) and 2 mM ammonium carbonate in methanol (B). Carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and metoprolol were also enriched with PPL Bond Elut sorbent material (200 mg, 3 mL). Samples for metoprolol were set to pH 7, samples for the three other compounds were set to pH 3 with hydrochloric acid. A sample volume of 250 mL was used for SPE. After extraction and elution, the dry residue was reconstituted with 50 μ L methanol followed by 50 μ L ultrapure water. The buffers for HPLC consisted of 10 mM ammonium acetate in ultra pure water (A) and 10 mM ammonium acetate in a mixture of acetonitrile/methanol (2/1; v/v,). For the separation of betablocker compounds a C18 Gemini column (250 x 2 mm, 5 μ m,) and, for other analytes, a Luna C18 (250 x 2 mm, 5 μ m both Phenomenex) were used. For the analysis of sulfamethoxazole 0.13 g of the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid were added to a sample volume of 50 mL. The pH was set to 5 and SPE was performed with a polymeric sorbent (Strata-X, 200 mg, 6 mL, Phenomenex). After complete drying of the eluate, the residue was reconstituted with 40 μ L acetonitrile and 160 μ L buffer A (see below). Separation from other macrolides was achieved using a C18 Aqua Perfect HPLC column (250 x 2.1 mm, 5 μ m, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Buffers were 20 mM ammonium acetate in ultra pure water set to pH 5 with acetic acid (A) and 20 mM ammonium acetate in a mixture of acetonitrile/methanol (2/1; v/v, B).

Fish maintenance and breeding of zebrafish

Adult zebrafish (Westaquarium strain) were reared at the Animal Physiological Ecology section of Tübingen University and kept in 100–240 L tanks at water temperatures of 26 ± 1 °C. The fish tanks contained filtered tap water (AE-2 L water filter equipped with an ABL-0240-29 activated carbon filter, 0.3 μ m; Reiser, Seligenstadt, Germany), whereby 30% of the water volume was exchanged every 14 days. The quality of the filtered tap water was maintained at 8 to 12 °dH total hardness, 260–350 μ S/cm (conductivity), pH 7.4 ± 0.2 , and $100 \pm 5\%$ oxygen saturation during rearing. Oxygen saturation in test dishes was measured at the beginning of the experiment and was between 86 and 98%. Concentrations for nitrite and nitrate were kept below critical values (nitrite: 0.025 to 0.1 mg/L; nitrate: 1 to 5 mg/L). Breeding tanks contained neither sediment substrates nor plants and decoration. The aquaria were isolated from daylight and exposed to an artificial dark–light cycle of 12:12-h. The Zebrafish were fed three times daily (about 3% of fish weight per day) with dry flake food (TetraMin™, Tetra, Melle, Germany) and, additionally, with freshly hatched *Artemia* larvae (Sanders, Mt. Green, MT, USA). Prior to spawning events, the fish were fed with frozen food (mosquito larvae) to stimulate optimal egg production.

For egg production, breeding boxes were positioned at the bottom of the aquaria on the evening before spawning was desired. The breeding boxes consisted of plastic trays with applied stainless steel

grids (mesh size 1.5 mm) to allow the passage of fertilized eggs into the tray and protect the eggs from predation by adult zebrafish. A green plastic imitation plant, positioned on top of the steel grids, served as a spawning stimulus. Spawning and fertilization started the next morning after the onset of light and lasted for 30 to 60 minutes.

Experimental design

The conducted fish embryo tests generally followed the procedure of the OECD Guideline 236 (OECD, 2013) and were modified as sediment contact assays according to the work of Hollert et al. (2003). For each sampling event, three independent test runs (three tests at different time points) were performed. Four days in advance to the start of each test, frozen water samples (250 ml glass flasks, Schott Duran) were thawed slowly in a fridge at 7 °C to prevent possible colonization with microorganisms. One day prior to the test, for each field site, five glass Petri dishes (30 mm diameter, Schott Duran) were filled with 2.5 g of the appropriate sediment and overlaid with the respective river water from the same sampling site and event. As a negative control, five additional Petri dishes were saturated with reconstituted water (according to ISO 7346/3). All test dishes were transferred into a heated cabinet (Aqualytic, Dortmund, Germany) and incubated at 26 °C ± 1 °C until the next day.

Immediately prior to the start of the experiment, sediment and water were replaced by fresh material. The Petri dishes of the negative control were also filled with fresh reconstituted water. Fertilized eggs were collected from the aquaria 60 minutes after the onset of light. In order to select for viable eggs, a pre-exposure experiment was conducted for 2 h at 26 °C in 90 mm glass Petri dishes filled with river water from the respective sampling sites or with reconstituted water for the negative control. Subsequently, fertilized eggs were transferred to the respective final test dishes (5 eggs per dish, 5 dishes per treatment), which contained native sediment and water from the above-mentioned sampling sites or reconstituted water. Thus, the test was conducted with a total of 25 eggs per treatment and control group. During the experiment, the embryos were kept in a heated chamber at 26 °C ± 1 °C for a period of 96 h with a 12:12-h artificial dark–light cycle. During that time, the Petri dishes were only removed from the heated cabinets for observation of the developmental stages at defined time points of 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, and 96 hours post fertilization (hpf) using binoculars (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany).

The mortality of the embryos (coagulation) was recorded at all the defined time points, and coagulated embryos were removed at any time of observation in order to avoid contamination of the medium. Developmental delays and failures as well as heart rate and hatching were recorded at the defined time points (Tab. 1). Developmental delays and failures were calculated as the percentage of the maximal possible retardation and failure rates at this time point (Tab. 1). The heart rate was

determined at 48 hpf and counted for 20 s for each embryo. To cope with possible temperature effects, the test dishes were assessed randomly. The hatching rate was recorded from 60 to 96 hpf and expressed as a percentage of the maximal possible number of hatched larvae.

Table 1 Observed endpoints during fish embryo test with *Danio rerio*; indicators of lethality are marked with *

Endpoints	Hours post fertilization (hpf)							
	8h	12h	24h	48h	60h	72h	84h	96h
Mortality/Coagulation*	X	X	X	X	X	X	X	X
Hatching					X	X	X	X
Developmental retardations								
Epiboly	X							
Gastrulation		X						
Exogastrulation		X						
Formation of somites*			X					
Tail detachment*			X					
Spontaneous movements			X					
Eye development			X					
Heart beat rate (beats/min)*				X				
Otolith formation					X			
Occurrence of melanocytes					X			
Developmental failures								
Oedema (heart and yolk)					X			
Malformation of eyes					X	X	X	X
Tail deformation					X	X	X	X
Spinal deformation (Scoliosis)					X	X	X	X
Pigmentation failures					X	X	X	X

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using SAS JMP version 11.0 (SAS Institute GmbH, Böblingen, Germany). Data for mortality rates were analysed by Cox's proportional hazards analysis, which considers multiple observation events. Analyses of data for heart rates started with a test for normal distribution using the d'Agostino-Pearson omnibus test, followed by Levene's test to check for homogeneity of variance. If normal distribution and homogeneity of variance were given, an ANOVA followed by an all pairs Tukey–Kramer post hoc test was carried out to compare all treatment groups. If data were non-normally distributed with homogenous variance, the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a Steel–Dwass post hoc test was conducted. To check for the influence of the test run as an additional factor, a two-way ANOVA was applied. For the statistical analysis of data for the hatching rate after 96 hpf, developmental delays at 24 hpf, and developmental failures at 96 hpf, Fisher's exact tests were conducted, whereby all groups were compared to each other. The significance

level was set to $\alpha = 0.05$. To correct for multiple testing, the Holm-Bonferroni method was applied to adjust the significance levels.

3. Results

Physico-chemical water parameters

All sampling sites of the present study were in a good ecological condition according to the new guidance values defined by LAWA (LUBW, 2008) and the 2011 German Regulation Act for Surface Waters (OGewV, 2011) with very high oxygen concentrations and adequate water temperatures (Tab. 2). Except for the phosphate-P concentration at sampling site EY3, data obtained for pH, ammonium-N, and phosphate-P indicated a good ecological condition for the three rivers. Data are summarized in Table 2.

Table 2 Limnochemical data at the 10 field sites. Values are evaluated and assessed according to the new guidance values defined by LAWA (German Working Group for Water Issues; LUBW, 2008) and the German Regulation for Surface Waters of 2011 (OGewV, 2011). Blue marked values point to very good ecological conditions, green marked values point to ecological conditions that are at least good, while orange marked arrays indicate that a good ecological condition is not achieved

	Schmiecha River			Eyach River			Schussen River			
	SA1	SA2	SA3	EY1	EY2	EY3	SU1	SU2	SU3	SU4
Conductivity [$\mu\text{s}/\text{cm}$]	564	652	720	484	509	681	591	587	606	607
Water temperature [$^{\circ}\text{C}$]	10,7	9,6	9,60	13,5	15,2	16	11,6	11,8	12,4	n.m.
O ₂ saturation [%]	91	97	101	97	107,5	101,9	102,0	104,0	103,0	99,0
O ₂ content [mg/L]	9,09	10,2	10,3	9	10,1	9,35	10,50	10,70	10,60	10,20
NH ₄ -N [mg/L]	< 0,04	< 0,04	< 0,04	<0,04	<0,04	<0,04	0,070	0,060	0,050	0,060
NO ₂ -N [mg/L]	0,004	0,004	0,003	0,006	0,005	<0,05	0,023	0,025	0,021	0,042
NO ₃ -N [mg/L]	< 0,3	1,7	3,5	0,8	0,7	4,3	3,000	3,000	3,200	3,400
PO ₄ -P [mg/L]	< 0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,09	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Carbonate hardness [$^{\circ}\text{dH}$]	20	17	17	14	13	14	20	21	23	21
Overall hardness [$^{\circ}\text{dH}$]	23	19	19	17	16	18	17	17	17	17
pH	8,18	7,49	7,75	7,9	8,2	7,6	8,20	8,30	8,30	8,30
Chloride [mg/L]	8	36	65	13	28	55	19	19	22	22

Chemical analyses

Chemical analyses were conducted for ten frequently used pharmaceuticals and the corrosion inhibitor benzotriazole. Concentrations of carbamazepine, diclofenac, metoprolol, and benzotriazole were found to be much lower in the effluents of the WWTP Ebingen than in the effluents of the WWTPs Langwiese and Eriskirch (Tab. 3). Concentrations of ibuprofen were below the limits of quantification in all effluent samples (Tab. 3). A summary of measurements for all substances is given in Table 3.

Table 3 Measured concentrations of pharmaceuticals and the corrosion inhibitor benzotriazole in the effluent of WWTP Ebingen on the Schmiecha River and WWTPs Langwiese and Eriskirch on the Schussen River

Substances	Measured effluent concentrations [ng/L]					
	WWTP Ebingen		WWTP Langwiese		WWTP Eriskirch	
	minimal	maximal	minimal	maximal	minimal	maximal
Carbamazepine	< 50	< 50	450	630	n.d.	600
Diclofenac	< 50	130	730	920	n.d.	1100
Ibuprofen	< 50	< 50	< 50	< 50	n.d.	< 50
Metoprolol	< 50	< 50	410	500	n.d.	850
Sulphamethoxazole	< 50	58	180	330	n.d.	85
Amidotrizoic acid	60	410	2100	2200	n.d.	500
Iohexol	< 50	< 50	n.d.	310	n.d.	< 50
Iomeprol	280	1500	3800	5000	n.d.	1400
Iopamidol	100	850	550	1300	n.d.	< 50
Iopromid	63	220	< 50	420	n.d.	90
Benzotriazole	< 50	73	4400	4600	n.d.	2800

Fish embryo test

Generally, higher embryotoxic potentials were found in samples from the four field sites at the Schussen River than in samples from the Rivers Schmiecha and Eyach. Samples taken at the sites SU4, SU2, and SU1 resulted in a significantly higher mortality rate (coagulated embryos) in exposed embryos compared to the negative control (Fig. 2). The highest mortality rates were found in embryos exposed to sediment and water from the sampling sites SU2 (downstream of SOB Mariatal) and SU4 (downstream of WWTP Eriskirch). Developmental retardations (Tab. 1) were recorded from 8 to 60 hpf. In all treatment groups the highest rates of developmental retardation could be detected at the age of 24 hpf. Embryos exposed to samples from the sites SU2 and SU4 at the Schussen River still showed high rates of developmental retardation at 60 hpf. These retardations might have led to significantly elevated developmental failure rates and significantly reduced hatching rates (Figs. 3, 4). During embryonic development various developmental failures (spine deformations, yolk and pericardial oedema, failure and absence of pigmentation) were observed in embryos exposed to

samples from the Schussen River. In particular, exposure to samples from the SU4 site resulted in a significantly increased developmental failure rate compared to the negative control (Fig. 3). The hatching success of surviving individuals was recorded from 60 to 96 hpf. Each control treatment resulted in hatching rates from 99 to 100%. Fish embryos exposed to sediment and water from sampling sites SU2 and SU4 showed significantly reduced hatching rates at the age of 96 hours (Fig. 4). Furthermore, embryos exposed to samples from the sites SU2 und SU4 at the Schussen River showed significantly and distinctly reduced heart rates in all conducted test runs. Although the heart rates were counted randomly and the exposed embryos were kept inside a climate chamber until investigation, data recorded for this parameter differed strongly between the conducted test runs.

In contrast to this, only low mortality rates (Fig. 2) and few developmental failures (mostly oedema) could be determined in embryos exposed to samples from the Schmiecha and Eyach Rivers (Fig. 3). Additionally, only a few or no developmental retardations could be detected at 24 hpf. At later time points the prevailing retardations diminished rapidly. Regarding the hatching rates, no significant differences could be observed between the treatment groups and the negative control (Fig. 4).

Furthermore, no significant differences could be observed between the heart rates of embryos exposed to samples from the Schmiecha and the heart rate of embryos exposed to the negative control. At the Eyach, in two of three conducted test runs, a slight but significant difference could be observed between the negative control and the sampling site EY3. Additionally, it has to be mentioned that the counted heart rates differed strongly between the replicated test runs (see example in Fig. 5).

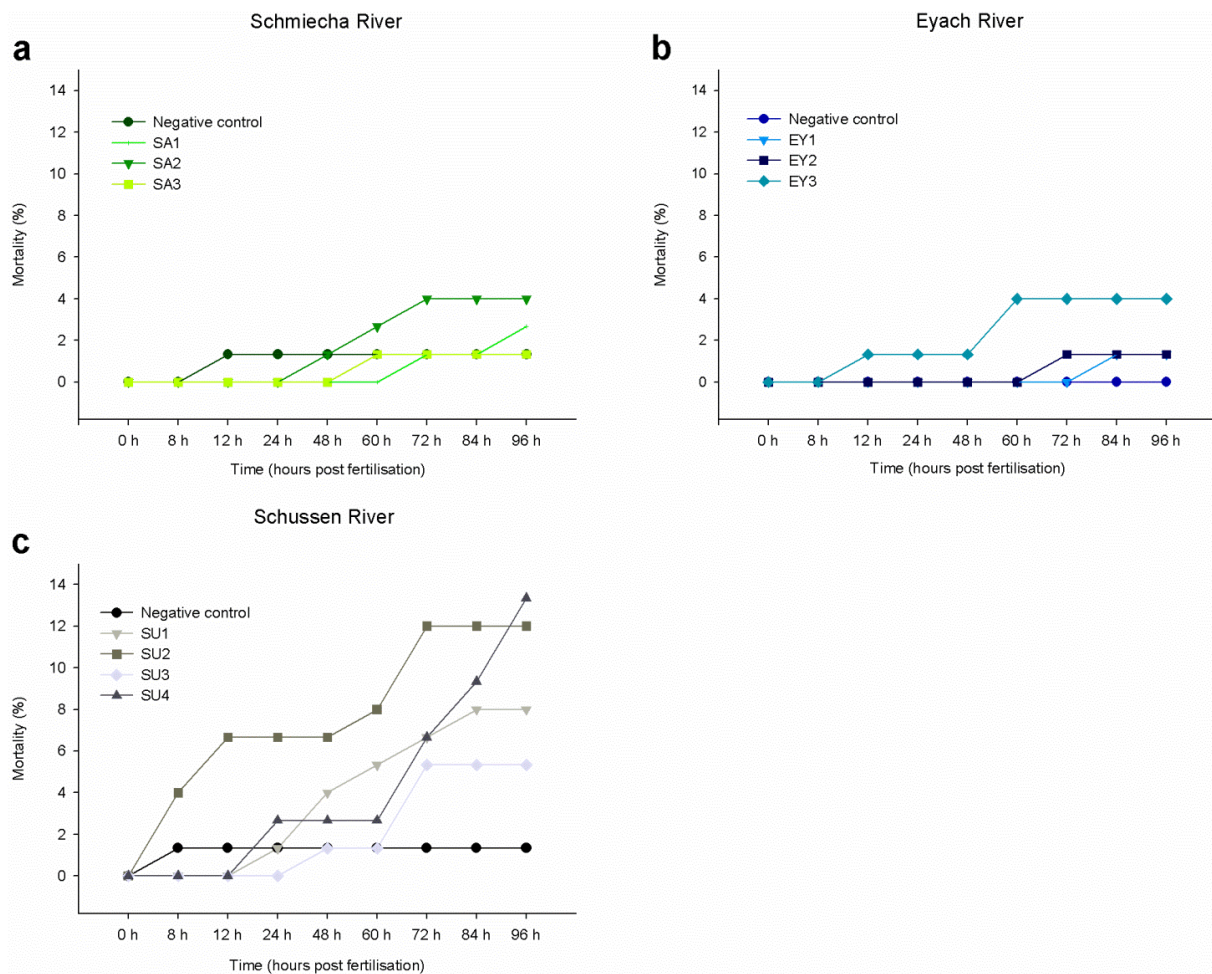


Fig. 2 Mortality rates during fish embryo test. Zebrafish embryos exposed to water and sediment samples of the (a) Schmiecha, (b) Eyach, and (c) Schussen Rivers. Significant differences ($*p < 0.05$) were found between sampling sites SU1, SU2, and SU4 at the Schussen River and the negative control. The combined data of three test runs (six test runs for the Schussen) were assessed by the Cox proportional hazards survival model, which considers multiple observation events

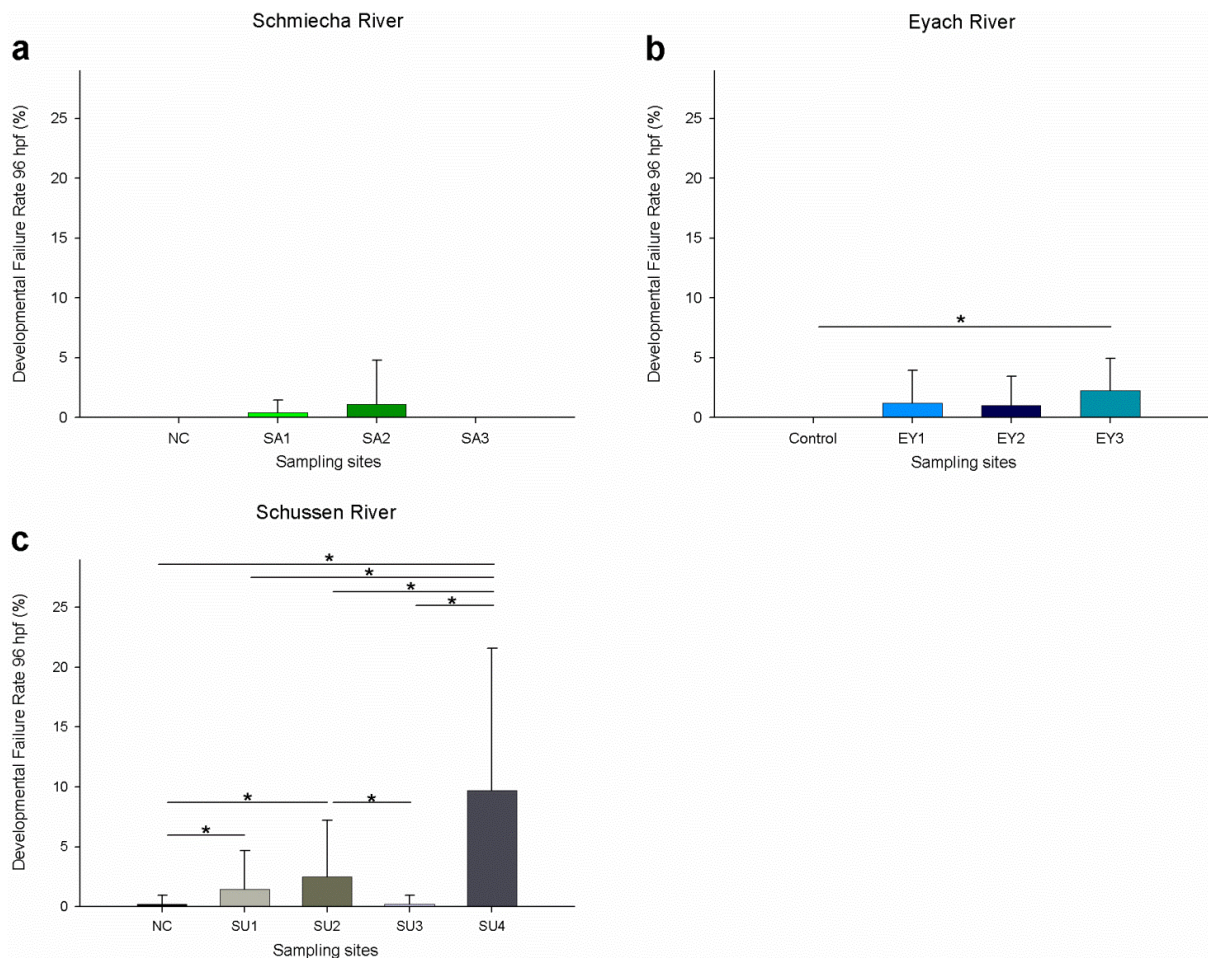


Fig. 3 Developmental failure rate 96 hpf. Zebrafish embryos exposed to water and sediment samples of the (a) Schmiecha, (b) Eyach, and (c) Schussen Rivers. The analysis showed significant differences ($*p < 0.05$) between sampling sites SU1, SU2, and SU4 at the Schussen River and the negative control. Also a significant difference ($*p < 0.05$) was found between the EY3 site at the Eyach River and the negative control. Developmental failure rate is given as percentage of the observed failures divided by the maximal possible ones at 96 hpf. Vertical bars show the mean of three test runs (six Test runs with Schussen samples). There were significant differences ($*p < \alpha$ when adjusted according to Holm–Bonferroni's method) between sampling sites at the Schussen River and the negative control at 96 hpf, assessed by Fisher's exact test

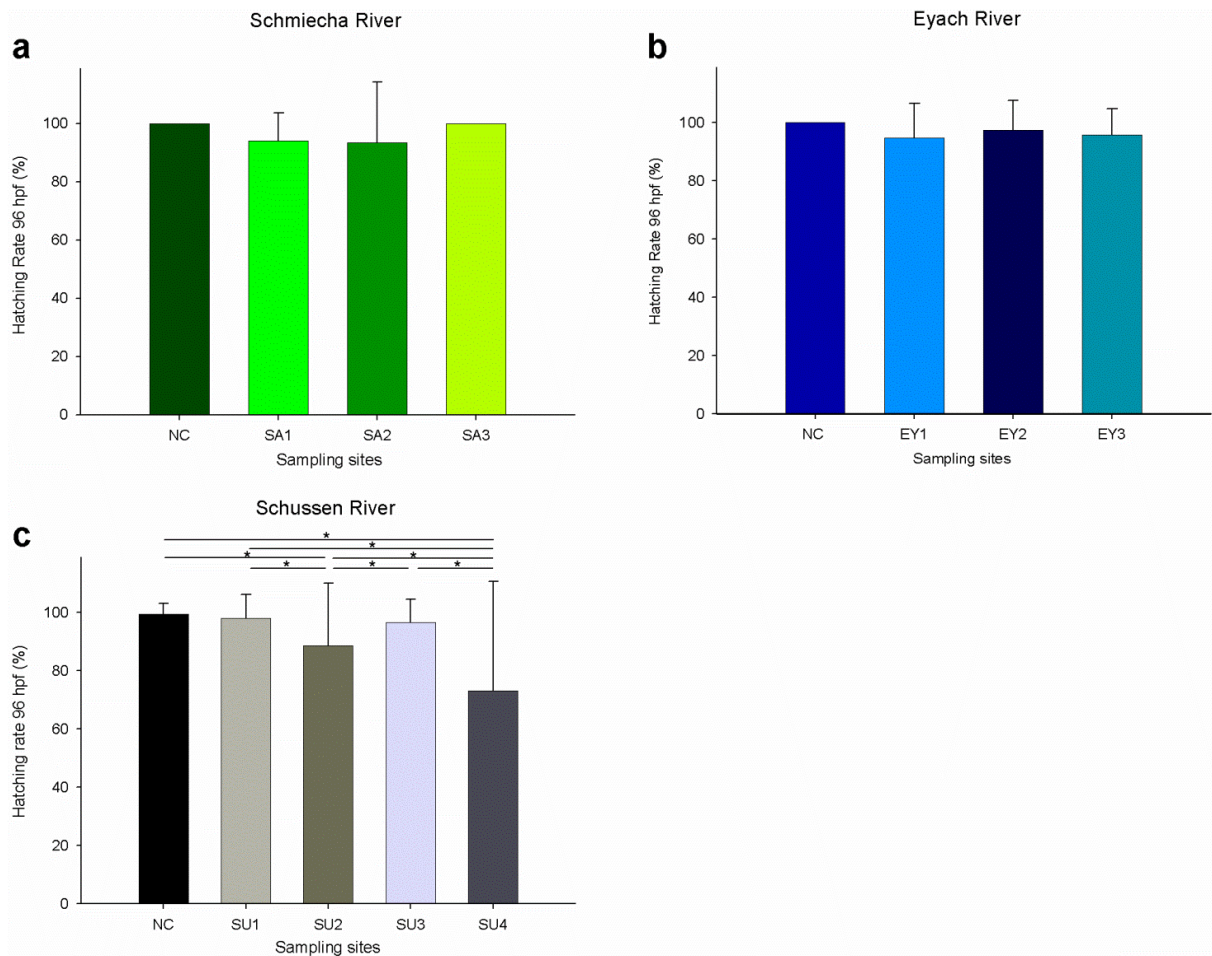


Fig. 4 Hatching rate of exposed zebrafish during fish embryo test. Zebrafish embryos exposed to water and sediment samples of the (a) Schmiecha, (b) Eyach, and (c) Schussen Rivers. Significant differences (* $p < 0.05$) were found between the sampling sites SU2 and SU4 at the Schussen River and the negative control (NC). Analyses of data for the hatching rates were conducted by using Fisher's exact tests, whereby all groups were compared to each other. To correct for multiple testing, the Holm-Bonferroni method was applied to adjust the significance levels

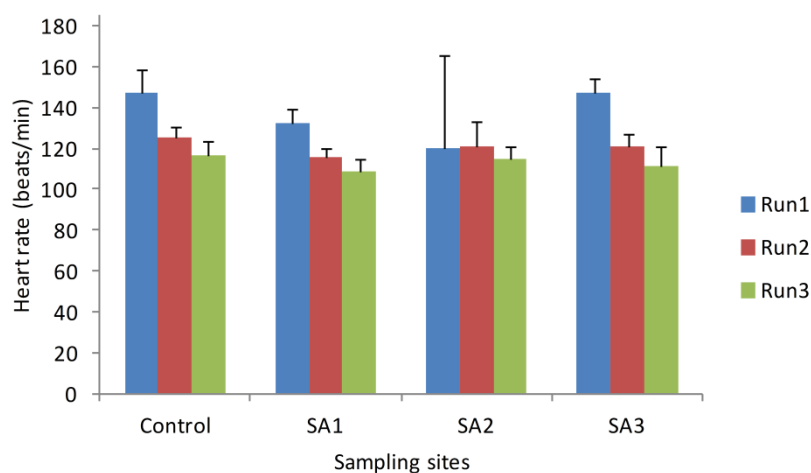


Fig. 5 Overall Comparison of heart rates of zebrafish embryos exposed to samples of Eyach River. The analysis showed a significant effect of the factor “test run”

4. Discussion

Chemical analyses

The comparison of the measured concentrations of pharmaceuticals and the corrosion inhibitor benzotriazole in the effluents of three investigated WWTPs makes it evident that these substances are generally discharged to a lower degree at the WWTP Ebingen (equipped with a powdered activated carbon step; dosage about 20 mg/L) than at the other two WWTPs. This is especially important with regard to substances like carbamazepine, benzotriazole, and diclofenac. These substances are known for their low degradability in the environment and are, therefore, very persistent in riverine sediments (Burke et al., 2014; Kunkel and Radke, 2012; Lahti and Oikari, 2011; Löffler et al., 2005) where they can accumulate. Triebkorn et al. (2007) have already shown that environmentally relevant concentrations of metoprolol, diclofenac, and carbamazepine can lead to severe tissue lesions in rainbow trout. Efficient micropollutant removal by powdered activated carbon (PAC) has already been described by Margot et al. (2013), Nowotny et al. (2007), and Ternes et al. (2002). Iodinated contrast media, however, were found not to be entirely eliminated by this new WWTP technology.

Fish embryo test and physico-chemical water parameters

Altogether, the samples from the Schussen River caused higher effects in zebrafish embryos than samples from the Rivers Schmiecha and Eyach (Tab. 4). The above-mentioned effects, observed for the sampling sites SU2 and SU4, probably occurred due to the fact that these sites are directly located downstream of the stormwater overflow basin (SOB) Mariatal or the wastewater treatment plant (WWTP) Eriskirch, respectively, and are therefore (due to heavy rainfall events or incomplete elimination), exposed to anthropogenic pollutants. The importance of SOBs as point sources for

micropollutants released into aquatic environments has to be stressed here. Additionally, it has to be mentioned that the catchment area of the Schussen River is both extensively and intensively used by agriculture, which contributes to a further, diffuse release of pollutants, particularly pesticides, into the Schussen during rain events.

Zebrafish embryos exposed to samples from the Rivers Schmiecha and Eyach showed only slight effects regarding the rates of hatching, mortality, and developmental failures. This indicates a low contamination of the respective surface waters and sediments, and thereby underlines the efficiency of the WWTPs Ebingen and Lautlingen, which have been upgraded by powdered activated carbon stages long ago. The efficiency of this technology has also been described in the literature (Abegglen et al., 2010; Boehler et al., 2012). Although heart rates were counted randomly and the exposed embryos were kept inside a climate chamber until investigation, data recorded for this parameter differed strongly between the conducted test runs (see example in Fig. 5). This phenomenon can be ascribed to the ambient temperature in the laboratory, which slightly differed from week to week. Osterauer (2008) has already shown that heart rates in *Danio rerio* are strongly affected by temperature.

Physicochemical analyses were conducted to underline the FET results. In the case of the two investigated streams Schmiecha and Eyach, the FET results and the results of the physicochemical analysis were consistent with each other. In comparison to this, the Schussen samples (sediment and water) led to obvious effects on zebrafish embryos, whereas the physicochemical parameters indicated a "good ecological condition" of the Schussen River according to the guidance values defined by LAWA (LUBW, 2008). With respect to this, the present study also shows that solely physicochemical analyses by themselves are not able to reflect the overall condition of aquatic systems, and that the hazard potential and the ecotoxicological risks of sediments are often disregarded. The effects of anthropogenically influenced sediments on zebrafish embryos have also been described by Keiter et al. (2010) and Rocha et al. (2011).

Table 4 Summary of the results from the conducted fish embryo tests with *Danio rerio* and water and sediment samples of the Rivers Schmiecha, Eyach and Schussen; Intensity of reaction: +++ = strong reaction, ++ = middle reaction, + = slight reaction, - = no reaction

Sampling sites/ exposure	Endpoints				
	Mortality 96 hpf	Developmental retardations 96 hpf	Hatching rate 96 hpf	Developmental failures 96 hpf	Heart rate 48 hpf
Negative control	-	-	-	-	-
SA1	+	-	+	+	-
SA2	+	-	+	+	-
SA3	+	-	-	-	-
EY1	+	-	-	+	-
EY2	+	-	+	+	+
EY3	+	-	+	+	+
SU1	++	-	-	+	+
SU2	+++	+	++	+	++
SU3	+	-	+	+	-
SU4	+++	++	+++	++	+++

The aim of this study was to examine the surface water and sediment quality of rivers connected to wastewater treatment plants (WWTPs) using the FET test with *Danio rerio* in order to assess the impact of different treatment technologies on the connected streams. The results obtained clearly discriminate between field sites connected to WWTPs that have been upgraded with a powdered activated carbon stage for more than 20 years (WWTPs Albstadt-Ebingen and Albstadt-Lautlingen) and those connected to WWTPs routinely equipped with sand filtration as the final cleaning stage (WWTPs Langwiese and Eriskirch), with less embryotoxicity being found to occur in the stream systems connected to upgraded WWTPs (Tab. 4). For the Schussen it could be shown, that the investigated field sites are highly polluted. Analytical data for micropollutants in the Schussen River have already been published by Triebkorn et al. (2013). From the two streams Schmiecha and Eyach it is well known they have been historically polluted by sewage from the textile industry. According to reports from contemporary witnesses, living organisms were only hard to find in these streams prior to the upgrade of the two WWTPs 20 years ago. The upgrade of the two WWTPs Ebingen and Lautlingen with a powdered activated carbon stage originally targeted at the reduction of stains from the textile industry. After the close down of most of the textile factories, also other trace pollutants were removed effectively. The effectivity of the powdered activated carbon stage at the WWTP Ebingen was recently described by Vogel et al. (2014).

With respect to the sustainable protection of aquatic biota, especially fish, the upgrade of WWTPs with a powdered activated carbon stage therefore -according to our results- seems to be a very efficient

tool for reducing embryotoxic potentials in the aquatic environment and, therefore, to implement the demands of the EU Water Framework Directive (WFD). With respect to the suitability of the FET with *Danio rerio* to assess surface water and sediment quality, we endorse the statements of Hollert et al. (2003), Keiter et al. (2006), and Vincze et al. (2014) that it is feasible to use this test to elucidate the anthropogenic impact caused either by WWTPs or SOBs in aquatic ecosystems.

Acknowledgements

The study is part of the SchussenAktiv*plus* project funded by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and co-funded by the Ministry of the Environment, Climate Protection and the Energy Sector, Baden-Württemberg. SchussenAktiv*plus* is connected to the BMBF action plan “Sustainable water management (NaWaM)” and is integrated into the BMBF frame work programme “Research for sustainable development FONA”. It is part of the funding measure, “Risk Management of Emerging Compounds and Pathogens in the Water Cycle (RiSKWa)”. Contract period: 1/ 2012 to 6/2015; Funding number: 02WRS1281A. The studies at the WWTPs Albstadt-Ebingen and Albstadt-Lautlingen were funded by the Ministry of the Environment, Climate Protection and the Energy Sector, Baden-Württemberg, and Albstadt town. Particular thanks go to Katharina Greiner-Perth, Stefanie Jacob, Heinz Krause, Steffen Metzger, Raphaela Osterauer, Doreen Richter, and Karl Wurm who were involved in the sampling campaigns and analytics.

5. References

Abegglen C, Boehler M, Hollender J, Zimmermann SG, Zwickenpflug B, von Gunten U, Siegrist H, Thonney D (2010) Mikroverunreinigungen in Kläranlagen. Technische Verfahren zur Elimination von organischen Spurenstoffen. (Micropollutants in wastewater treatment plants. Technical procedures for the removal of organic trace substances). Gas, Wasser und Abwasser 7, 587 - 594 (German).

Bartzke M, Delov V, Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Oehlmann J (2010) Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the water framework directive approach. Journal of Soils and Sediments 10, 389–399.

Boehler M, Zwickenpflug B, Hollender J, Ternes T, Joss A, Siegrist H (2012) Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. Water Science and Technology 2012; 66:2115–21.

Burke V, Greskowiak J, Asmuß T, Bremermann R, Taute T, Massmann G (2014) Temperature dependent redox zonation and attenuation of wastewater-derived organic micropollutants in the hyporheic zone. *Science of the Total Environment* 482-483, 53–61.

Brinkmann M, Hudjetz S, Keiter S, Seiler TB, Wölz J, Hallare AV, Hollert H, Cofalla C, Roger S, Schüttrumpf H, Gerbersdorf SU (2010) Toxicity and risk assessment of fluvial sediments and suspended matter: a short overview of past and recent developments in sediment toxicity Assessment. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 22, 651 –655.

da Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D (2011) Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331–1339.

Förstner U, Heise S, Schwartz R, Westrich B, Ahlf W (2004) Historical contaminated sediments and soils at the river basin scale—examples from the Elbe River catchment area. *Journal of Soils and Sediments* 4, 247–260.

Gerbersdorf SU, Westrich B, Paterson DM (2009) Microbial extracellular polymeric substances (EPS) in fresh water sediments. *Microbial Ecology* 58, 334–349.

Gerbersdorf S, Hollert H, Brinkmann M, Wieprecht S, Schüttrumpf H, Manz W (2011) Anthropogenic pollutants affect ecosystem services of freshwater sediments: the need for a triad plus x approach. *Journal of Soils and Sediments* 11, 1099–1114.

Hollert H, Dürr M, Erdinger L, Braunbeck T (2000) Cytotoxicity of settling particulate matter (SPM) and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 528–534.

Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003). A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3, 197-207.

Hollert H, Ernst M, Ahlf W, Dürr M, Erdinger L, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Seiler TB, Wölz J, Braunbeck T (2009) Strategien zur Sedimentbewertung – ein Überblick. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 21, 60–176 (German).

Keiter S, Rastall A, Kosmehl T, Erdinger L, Braunbeck T, Hollert H (2006) Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube river. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science and Pollution Research* 13, 308-319.

Keiter S, Peddinghaus S, Feiler U, von der Goltz B, Hafner C, Ho NY, Rastegar S, Otte JC, Ottermanns R, Reifferscheid G, Strähle U, Braunbeck T, Hammers-Wirtz M, Hollert H (2010) DanTox – a novel joint research project using zebrafish (*Danio rerio*) to identify specific toxicity and molecular modes of action of sediment-bound pollutants. *Journal of Soils and Sediments* 10(4):714–717.

Kunkel U, Radke M (2012) Fate of pharmaceuticals in rivers: deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Research* 46 (17), 5551- 5565.

Lahti M, Oikari A (2011) Microbial transformation of pharmaceuticals naproxen, Bisoprolol, and diclofenac in aerobic and anaerobic environments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61 (2), 202-210.

Löffler D, Rombke J, Meller M, Ternes T (2005) Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science and Technology* 39 (14), 5209 – 5218.

LUBW (2008) Bewirtschaftungsziele für Fließgewässer. Arbeitshilfe zur Erstellung der Maßnahmenprogramme im Rahmen des ersten Bewirtschaftungsplans zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie. Juni 2008 (German).

Luo Y, Gu, W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Xiaochang CW (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473–474, 619–641.

Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, Abegglen C, Thonney D, Chèvre N, Schaerer M, Barry DA (2013) Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon. *Science of the Total Environment*, 461-462, 480–498.

Nowotny N, Epp B, von Sonntag C, Fahlenkamp H (2007) Quantification and modeling of the elimination behavior of ecologically problematic wastewater micropollutants by adsorption on powdered and granulated activated carbon. *Environmental Science and Technology* 41 (6), 2050–2055.

OECD (2013) Guideline for Testing of Chemicals, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD, Paris, France. Available at: <http://www.oecd.org>

Oetken M, Stachel B, Pfenninger M, Oehlmann J (2005) Impact of a flood disaster on sediment toxicity in a major river system—the Elbe flood 2002 as a case study. *Environmental Pollution* 134 (1), 87–95.

OGewV (2011) Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV). <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ogewv/gesamt.pdf> (German).

Osterauer R, Köhler HR (2008) Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86 (4), 485–494.

Power EA, Chapman PM (1992) Assessing sediment quality. In: Burton GA (ed), *Sediment toxicity assessment*. Lewis-Publishers, Boca Raton, 1–18.

Reungoat J, Macova M, Escher BI, Carswell S, Mueller JF, Keller J (2010) Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Research* 44, 625–637.

Rocha PS, Bernecker C, Strecker R, Fiorillo Mariani C, Martins Pompêo ML, Storch V, Hollert H, Braunbeck T (2011) Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:1951–1959.

Steinmetz H, Dittmer U (2010) Regenwasserbehandlung gestern, heute - und morgen? *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 204, 7–14 (German).

Ternes T, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch HJ, Haist-Glude B, Preuss G, Wilme U, Zulei-Seibert N (2002) Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology* 36 (17), 3855–3863.

Triebskorn R, Casper H, Scheil V, Schwaiger J (2007) Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (4), 1405–1416.

Triebskorn R, Hetzenauer (2012) Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. (Mikroverunreinigungen in den drei Bodenseezuflüssen Argen, Schussen und Seefelder Aach - eine Literaturstudie). *Environmental Sciences Europe* 24:8.

Triebskorn R, Amler K, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Gude H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung R-M, Kneipp S, Köhler HR, Kraus S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J, Wurm K (2013) SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* 25:2.

Triebskorn R, Blaha L, Engesser B, Güde H, Hetzenauer H, Henneberg A, Köhler H-R, Kraiss S, Maier D, Peschke K, Thellmann P, Vogel H-J, Kuch B, Oehlmann J, Rault M, Suchail S, Rey P, Richter D, Sacher F, Weyhmüller M, Wurm K: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 2013, 8:427–437 (German).

Vincze K, Graf K, Scheil V, Köhler HR, Triebskorn R (2014) Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe* 26:3.

Vogel H-J, Baur S, Triebskorn R, Rößler A, Metzger S (2014) Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: 20 Jahre Pulveraktivkohleeinsatz im Vollstrom. Abwassertechnische Besonderheiten und Effizienz für die Elimination von Spurenstoffen. *KA Korrespondenz Abwasser, Abfall*; 61. Jahrgang (2014) (German).

Kapitel 3.1: Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": How a case study on the impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany)

Environmental Sciences Europe 29:10 (2017); DOI: 10.1186/s12302-017-0108-y

Paul Thellmann^{1*}, Bertram Kuch², Karl Wurm³, Heinz-R. Köhler¹, Rita Triebkorn^{1,4}

¹Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, D-72076 Tübingen, Germany

²Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Bandtäle 2, D-70569 Stuttgart, Germany

³Gewässerökologisches Labor Starzach, Tulpenstr. 4, D-72181 Starzach, Germany

⁴Steinbeis Transfer-Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany

Abstract

Background: The present work investigates the impact of discharges from a storm water sedimentation basin (SSB) receiving runoff from a connected motorway in southern Germany. The study lasted for almost two years and was aimed at assessing the impact of the SSB on the fauna of the Argen River, which is a tributary of Lake Constance. Two sampling sites were examined up- and downstream of the SSB effluent. A combination of different diagnostic methods (fish embryo test with the zebrafish, histopathology, micronucleus test) was applied to investigate health impairment and genotoxic effects in indigenous fish as well as embryotoxic potentials in surface water and sediment samples of the Argen River, respectively, in samples of the SSB effluent. In addition, sediment samples from the Argen River and tissues of indigenous fish were used for chemical analyses of 33 frequently occurring pollutants by means of gas chromatography. Furthermore, the integrity of the macrozoobenthos community and the fish population were examined at both investigated sampling sites.

Results: The chemical analyses revealed a toxic burden with trace substances (originating from traffic and waste water) in fish and sediments from both sampling sites. Fish embryo tests with native sediment and surface water samples resulted in various embryotoxic effects in exposed zebrafish embryos (Fig. 1). In addition, the health condition of the investigated fish species (e.g., severe alterations in the liver and kidney) provided clear evidence of water contamination at both Argen River sites (Fig. 2). At distinct points in time, some parameters (fish development, kidney and liver histopathology) indicated stronger effects at the sampling site downstream of the SSB effluent than at the upstream site.

Conclusions: Our results clearly showed that the SSB cannot be assigned as the main source of pollutants that are released into the investigated Argen River section. Moreover, we showed that there is moderate background pollution with substances originating from waste waters and traffic which still should be taken seriously, particularly with regard to the impairment of fish health at both investigated

field sites. Since the Argen is a tributary of Lake Constance, our results call for a management plan to ensure and improve the river's ecological stability.

Keywords: Motorway runoff, Sediment toxicity, Histopathology, Fish embryo test

Background

The European Water Framework Directive (WFD) forms the basis for a sustainable water management policy. With its implementation, the focus was addressed not only to measures like renaturations of stream systems but also to upgrades of wastewater treatment plants with the aim of improving the ecological conditions of streams and reducing discharges of trace pollutants into surface waters. In general, surface waters receive a large number of pollutants in low concentrations [1], especially due to the discharge of diffuse but also point sources like road runoffs in combination with storm water drainage systems. As a consequence, the aquatic fauna frequently experiences chronic exposure to low concentrations of harmful substances, which may result in a serious impairment of the health condition in the affected organisms. When it comes to the question of potential point sources, often little attention is given to storm water relief systems like storm water overflow basins (SOBs), storm water sedimentation basins (SSBs) or road runoff drainage systems. Particularly in the case of heavy rainfall events or enduring snowmelts, these systems gain further importance due to their massive discharge of untreated water (originating from municipal waste waters and road runoff) into the connected surface waters. These discharges contain a mixture of organic and inorganic contaminants that may cause multiple biological effects (e.g., estrogenic, genotoxic, cytotoxic, or carcinogenic effects) due to interactions with multiple target sites in the exposed organisms [2, 3]. Ellis et al. [4] reported that 30 % of total hydrocarbons and 50 % of the total suspended solids in urban drainage water originate from road runoff. Such runoff contains a complex mixture of pollutants as, e.g., hydrocarbons, dioxins, metals, de-icing salts, and halogenated phenols originating mainly from traffic and vehicle abrasion [5]. These compounds are of particular concern since it has been shown that they can lead to adverse effects in aquatic organisms [6–9]. Once they (especially those with hydrophobic properties) have been emitted, they can accumulate in sediments and biota. One particular problem is that contaminants in sediments rarely cause effects as single substances, but rather in concert with numerous others that are present in complex mixtures [10]. Furthermore, many contaminants accumulate in the sediments of rivers and reach concentrations far higher than those in the surrounding water. As a consequence, benthic organisms such as invertebrates or ground-living fish species run the risk of continuous exposure to both dissolved and sediment-bound contaminants [11]. The present study deals with the investigation of the storm water sedimentation basin (SSB) in Dürren (Allgäu region, Southern Germany), receiving road runoff from a nearby motorway (A 96) during rain fall events. The SSB represents an isolated storm water retention system for the treatment of polluted

road runoff during rainfall events and has no connection to the municipal wastewater system. Its purpose is to clarify the incoming road runoff by means of sedimentation of suspended solids and traffic-related pollutants. The upper water fractions are then released by an outflow at one end of the SSB into the Argen River, a tributary of Lake Constance. Notably, heavy rainfall events may thus have a negative impact on the flora and fauna of the receiving stream due to the discharge of large volumes of potentially polluted water. Consequently, the resulting hydraulic shock loads may lead to an acute exposure of aquatic organisms to a complex mixture of traffic-related substances. The aim of the present study—which has been commissioned by the Regional Council Tübingen—was to investigate whether the discharge from the SSB leads to an impairment of natural resources which are protected by the Flora–Fauna-Habitat (FFH) Directive of the European Union [12]. The Flora–Fauna-Habitat (FFH) Directive or Habitats Directive is a nature conservation directive of the European Parliament which ensures the protection of rare, threatened or endemic species. To investigate the possible impact of the SSB, different methods on different biological levels were chosen. The Regional Council Tübingen demanded investigations on the fish health of protected indigenous fish species like bullhead. Histopathology and the micronucleus test were negotiated as research methods. The assessment of the macrozoobenthos community and chemical analyses with fish tissues were additionally demanded. Therefore, effect-based investigations on fish health, macrozoobenthos integrity, and fish population structure as well as chemical analyses and measurements of physicochemical parameters were conducted within an investigation period of almost 2 years.

Methods

Sampling sites and events

In order to investigate the impact of the Dürren storm water sedimentation basin (SSB; 47°43'38.8"N 9°52'22.9"E) on the Argen River, two sampling sites were defined upstream and downstream of its outflow. The sampling site downstream of the SSB effluent (exposure site, code: D) starts immediately at the discharge site of the SSB into the Argen River and ends approximately 200 m downstream of it. The reference site (code: U) starts about 300 m upstream of the SSB outflow and ends approximately 100 m upstream of it. In total, five sampling events were conducted between April 2013 and October 2014 (Table 1). The water level was in a normal range (mean low water level) at every sampling event, and no heavy rainfall events occurred 14 days prior to the sampling. The absence of heavy rainfall events directly before sampling was of particular importance, since (1) heavy rainfall can lead to a resuspension or remobilization of sediment-bound pollutants (e.g., [13]) (2) the associated floods may result in a displacement of sediments and organisms such as fish (e.g., [14]). A comparison of both sampling sites respectively an investigation on the impact of the SSB directly after a heavy rainfall event would have led to an incorrect assessment. At each sampling event, sediment

and surface water samples as well as fish were taken for various analyses in the laboratory. For the investigation of fish health, we caught stationary indigenous fish species such as the European bullhead (*Cottus gobio*) or loach (*Barbatula barbatula*). These benthic fish species have a sedentary behavior, stay close to the river bottom and cover relatively short distances, allowing us to regard the sampling sites up- and downstream of the SSB as being independent from one another. The migration of fish from one sampling site to the other can, therefore, be minimized to the greatest extent. Due to low catching numbers of these two target species in two sampling campaigns, we decided to catch those fish species instead that were most abundant during the respective sampling events (Table 1). Native sediment and surface water samples were used for the performance of a fish embryo test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) and, in parallel, for limnological and chemical analyses. Tissues and blood samples from field-caught fish (see Table 1) were used for histopathological investigations and for the micronucleus test, respectively. Furthermore, chemical analyses were conducted with the remaining fish tissues. In parallel, investigations on the macrozoobenthos integrity were conducted using the multi-habitat sampling procedure [15]. These data are presented in the Appendix only but were used for the discussion of the results.

Table 1: Conducted sampling events during the investigation period

Sampling event	Code: upstream SSB	Code: downstream SSB	Sampled fish species	Season
1	U1	D1	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Spring 2013
2	U2	D2	Loach (<i>Barbatula barbatula</i>)	Summer 2013
3	U3	D3	Barbel (<i>Barbus barbus</i>)	Autumn 2013
4	U4	D4	Loach (<i>Barbatula barbatula</i>)	Spring 2014
5	U5	D5	Bullhead (<i>Cottus gobio</i>); Loach (<i>Barbatula barbatula</i>)	Autumn 2014

Fish sampling

All fish were caught by electrofishing with the permission of the Regional Council of Tübingen (Germany). The assessment of fish stocks was conducted using the length and frequency distribution of caught fishes. At each of the investigated sampling events, up to ten ($n > 5$) individuals of the same species were retained for biological analyses. Due to the distance between the sampling sites and the rather territorial behavior of the investigated species, it is highly likely that the sampled populations had their respective, distinct exposure history. Blood samples (100–150 μ L) for the micronucleus test were immediately collected after the spine cut with a pipette. For histopathological investigations, tissue samples of the gill, liver and kidney were carefully dissected and immediately fixed in 2 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Germany) dissolved in 0.1 M cacodylate buffer (sodium cacodylate

trihydrate, pH 7.6, Sigma-Aldrich, Germany). Fish tissue and blood samples (smear on microscope slides and fixed in methanol) were stored at 4 °C in a cool box until arrival at the laboratory.

Sediment and water sampling

Sediment and surface water samples were taken at each sampling site and at every sampling event. Sediment sampling took place close to the riverside, in which sediment material was taken from the top 2 to 4 cm of the riverbed. To obtain representative sediment samples of each sampling site, sediment samples were taken at 4 to 10 spots within each sampling site and over a sampling distance of 20 to 30 m. After collection, all sediment samples were homogenized with a stainless steel shovel in a stainless steel bucket and divided into batches of 100 or 300 g, wrapped in aluminum foil (Roth, Germany). The 100 g batches were used in the FET with *Danio rerio*, whereas the 300 g batches were used for chemical analyses. Due to financial shortcomings, chemical analyses with sediment samples were only conducted with samples of sampling event 5. The sampling of surface water was conducted in the main current at a depth of 10–15 cm. All flasks were rinsed with river water before sampling. For the FET with *Danio rerio*, three 250 mL sterilized glass flasks (Schott Duran, Germany) were filled with surface water from each sampling site. Furthermore, effluent samples from the SSB (also in three glass flasks) were taken during every sampling event. These samples were also used for application in the FET. All samples were stored in a cool box at 4 °C during sampling and transport. After arrival at the laboratory, surface water and sediment samples were immediately frozen at –20 °C.

Physicochemical water parameters

Conductivity, pH, water temperature, and oxygen concentration were measured directly in the stream during every sampling event. The concentrations of nitrate, nitrite, ammonium, (ortho-) phosphate, and chloride were determined photometrically using tube test kits (NANOCOLOR® tube tests) and a compact filter photometer (Compact photometer PF-12Plus, Macherey–Nagel, Düren, Germany). Carbonate and total hardness were determined titrimetrically with test kits (MColortest™, Merck, Darmstadt, Germany). The measured concentrations were assessed using the guidance values defined by the German Act for the Regulation of Surface Waters of 2011 [16] and the German Working Group on Water Issues (LAWA) [17]. In addition, temperature was measured continuously by data loggers (HOBO® Water Temp Pro by Onset Computer Corporation) at both sampling sites and at the SSB effluent. Data loggers were fixed with a metal rod in the riverbed at a depth of 30 cm. To assess the impact of the SSB on the salinity of the Argen River, conductivity and chloride concentration were measured after three rainfall events in March and April 2013. These measurements were conducted at both sampling sites and at the SSB effluent. Chemical analyses were conducted for 33 compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls

(PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polycyclic musk compounds, methyltriclosan, and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE). Detailed information on the analyzed substance groups and substances is provided in Appendix 1 (Table 4). Two grams of the freeze-dried and homogenized fish or sediment samples was Soxhlet-extracted (100 mL n-hexane, 6 h). The extracts were rotavaporated to 10 mL (350 mbar, 40 °C) and stored in 20 mL vials. Aliquots corresponding to 1 g fish sample (dry weight, DW) were transferred into 5 mL vials. After addition of the internal standards (AHTNd3: 100 µL, 1 ng/µL AHTN-d3 in methanol, 16 perdeuterated PAHs according to USEPA: 100 µL, DDT- 13C12, DDE-13C12, DDD-13C12: 50 µL, 13C12-PCB-congeners #28, #52, #101, #118, #138, #153, #180, #194: 50 µL, each 1 ng/L in toluene, Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany, LGC Promochem, Wesel, Germany), extracts were concentrated (nitrogen stream, 40 °C) and dissolved in n-hexane (200 µL) before complete dryness. The sample was purified via consecutive elution with increasing solvent polarity (n-hexane, n-hexane/dichloromethane 1:1 v/v, acetone, 5 mL each, LGC Promochem) of the extract on a silica column (1 g). After adding the recovery standard (biphenyl-d10, 100 µL, 1 ng/µL in toluene), the fractions containing the PAHs, DDE and methyltriclosan (n-hexane/dichloromethane 1:1 v/v) and the synthetic musks AHTN and HHCB (acetone) were reduced to 50 µL (nitrogen stream, 40 °C). Analysis of the sample extracts was performed using gas chromatography (HRGC Agilent 6890N) directly coupled to a mass selective detector (LRMS Agilent 5975N). Automatic injection of 1 µL solution was accomplished in splitless mode at 250 °C. Chromatographic separation was performed on a Varian VF-Xms column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) under constant flow conditions (helium 5.0, 1 mL/min). The GC oven temperature program was the following: initial temperature 80 °C (held 1 min), 7 °C/min 180 °C (held 1 min), 12 °C/min 240 °C, 20 °C/min 300 °C (held 9 min). Samples were analyzed in single ion monitoring mode using characteristic fragment ions of analytes and corresponding internal standards. The analytes were quantified via the isotope dilution method (PAHs, PCBs, DDE, AHTN) or external calibration with internal reference standards (HHCB, methyltriclosan). Depending on the individual sample matrix, the limit of quantification (LOQ, signal noise ratio 10:1, limit of detection LOD signal noise ratio 3:1) was in the range of 0.17 µg/kg DW (PAHs, PCBs, DDE and methyltriclosan) and 1.7 µg/kg DW (dry weight) for the synthetic musks. LOQs for the individual analytes are listed in Appendix 1 (Table 4). Blank values were determined for the whole analytical procedure (soxhletextraction, column clean-up) in triplicate. The blank concentrations which were recalculated to the sample amount used for the extraction are listed in Appendix 1 (Table 4). Blank values were not subtracted from the analytical values. The recovery rates of the isotopelabeled standards were in the range of 88 % (dibenzo[ah]anthracene-d14) to 97 % (13C12-PCB-153 and AHTN-d3). The calculation of the recovery rates is based on the ratio (peak areas) of the individual standard compounds (added to the sample extract prior to the clean up procedure) to the syringe standard. The basis value for 100 % recovery was determined by the quantification of a mixture containing the

quantification standards and the syringe standard as well in the same ratio as used for the analytical procedure. The recovery rates were not considered in the calculation of the analytical values. Isotopelabeled standard compounds and the reference standards were purchased by Ehrenstorfer GmbH Germany and LGC Standards Germany. Solvents for residual analysis were purchased by Sigma-Aldrich Germany and VWR Germany.

Biological analyses

Fish embryo test

The conducted fish embryo tests generally followed the procedure of the OECD Guideline 236 [18] and were applied and modified as sediment contact assays according to the work of Hollert et al. [19]. For each sampling site and event, three independent test runs (three tests on different dates) were conducted with native surface water and sediment samples, or effluent samples from the SSB, respectively. Thus, one glass flask with surface water and one sediment batch were used for each test run. Oxygen levels were measured at the beginning of the test. Oxygen saturation was always above 90 % in the tested surface water samples as well as in the SSB effluent samples. The procedure for the sample preparation and test performance was the same as described in the work of Thellmann et al. [20]. The tests were considered to be valid, when (1) the fertilization rate of all eggs collected was $\geq 70\%$, (2) the survival rate of embryos from the negative control was $\geq 90\%$ after 96 h of exposure (3), and the hatching rate in the negative control was $\geq 80\%$ after 96 h of exposure. To check the sensitivity of the fish strain, 3,4-dichloroaniline was tested twice a year in a concentration of 4 mg/L according to the OECD Guideline 236. Since an exposure to this concentration resulted in mortality rates greater than 35 %, embryos of the used fish strain proved to be suitable for the application in the FET. For each treatment, five glass Petri dishes (30 mm diameter, Schott Duran, Germany) were filled with 2.5 g of the corresponding sediment sample and overlaid with the appropriate surface water from the same sampling site and event. Five additional Petri dishes containing reconstituted water (according to ISO 7346/3) served as negative control. Five fertilized eggs were transferred to each of the used tests dishes, resulting in a total of 25 eggs per treatment and control group. To ensure an optimal and consistent temperature, all test dishes were kept in an incubator at 26 ± 1 °C. Developmental stages (including developmental delays and failures) as well as mortality rate and hatching rate were observed at defined time points (Appendix 1, Table 5) using binoculars (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany).

Histopathology

After fixation in 2 % glutardialdehyde for at least one week, tissue samples were dehydrated with ethanol and routinely processed for paraffin embedding. Fish tissue samples (gills, kidney, liver) were

embedded in pure paraffin (Carl Roth, Germany) using a tissue processor (Model TP 1020; Leica Biosystems; Germany). Subsequently, each tissue sample was cut into sections of 2 μm thickness using a sliding microtome (SM 2000 R; Leica Biosystems; Germany). Afterwards, one part of the sections was stained with hematoxylin–eosin staining (H&E), enabling the differentiation of cell types and providing an overview of the structure in the observed tissues. The other part of the sections was stained by a periodic acid Schiff reaction, with the aim of providing information on the glycogen or glycoprotein content (e.g., glycogen reserves in the hepatic tissue and mucous cells in the gills) in the observed tissues. The health condition of the tissues was qualitatively described and, in addition, semi-quantitatively assessed according to the method described by Triebkorn et al. [21, 22]. All the investigated histological samples were assessed in an observer-blinded way to prevent observer bias. The semiquantitative assessment of the overall tissue condition (in the gills, liver, and kidney) was conducted using a five-class ranking system: class 1—control state/no pathological alterations; class 2—slight to moderate alterations; class 3—reaction state/distinct reactions of cells and tissues, slight pathologies; class 4—strong tissue alterations and/or partial necrosis; class 5—destruction state/severe tissue alterations with extended necrotic areas.

Micronucleus test

The micronucleus test detects DNA damages, represented by the formation of micronuclei in fish erythrocytes. A high number of micronuclei can be, therefore, regarded as an indicator of genotoxic effects, e.g., [23, 24]. Immediately after blood collection, one drop of fish blood was smeared onto a previously degreased (in 97 % ethanol) slide (Langenbrick, Germany) using a cover slip. Two smears were produced for each individual. The slides were subsequently fixed with methanol and stained with Giemsa (Carl Roth, Germany) as described in the work of Rocha et al. [25]. To estimate the total amount of erythrocytes containing micronuclei, 2000 erythrocytes (1000 cells per slide) per individual were counted using a light microscope (Axioskop2; Zeiss, Germany). The scoring and the evaluation of micronuclei were conducted according to the work of Rocha et al. [25]. The number of cells containing micronuclei was expressed as the percentage of the total number of counted erythrocytes.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SAS JMP version 11.0 (SAS Institute). Mortality and hatching rates in the FET were analyzed by Cox's proportional hazards analysis. The developmental failure rate of zebrafish embryos at 96 hpf (hours post-fertilization) was analyzed using Fisher's exact test. The significance level was set to $\alpha = 0.05$. To correct for multiple testing, the Holm–Bonferroni method was applied to adjust the significance levels. Data from the micronucleus tests were tested with a paired *t* test. Statistical analysis of the histopathological data was performed using the Likelihood ratio test.

Results

Physicochemical water parameters

Overall, both sampling sites revealed a good ecological condition according to the new guidance values defined by LAWA [17] and the 2011 German Regulation Act for Surface Waters [16]. For reasons of simplicity, only the values measured for sampling events 1 and 2 are presented in Table 2. However, the measurements revealed a slightly higher conductivity at the SSB effluent and also a slightly higher conductivity at the exposure site. The values measured for the sampling events 3, 4, and 5 are presented in Appendix 1 (Table 6). The continuous measurement of the water temperature by data loggers and the conductivity measurements after rainfall events did not show an impact of the SSB on the investigated section at the Argen River. For reasons of simplicity, only the data of four sampling days (with occurring rainfall) are presented in Appendix 2 (Fig. 4).

Table 2: Physicochemical data of sampling events 1 and 2. Values were evaluated and assessed according to the guidance values defined by LAWA (German Working Group for Water Issues; LUBW [17]) and the German Regulation Act for Surface Waters of 2011 (OGewV [16]). Values marked with two asterisks () point to very good ecological conditions; values marked with one asterisk (*) point to ecological conditions that are at least good.**

	U1	SSB Effluent 1	D1	U2	SSB Effluent 2	D2
Conductivity [$\mu\text{s}/\text{cm}$]	451	720	540	475	765	509
Water temperature [$^{\circ}\text{C}$]	13.9**	12.1	13.6**	18.7*	13.6	18.2*
O ₂ saturation [%]	113.5	111	120	116	118.2	111.7
O ₂ content [mg/L]	10.92**	11	11.6**	9.94**	11.31	9.83**
NH ₄ -N [mg/L]	0.06*	-	< 0.04**	< 0.04**	< 0.04	< 0.04**
NO ₂ -N [mg/L]	0.012	-	0.01	0.007	0.01	0.006
NO ₃ -N [mg/L]	0.7	-	0.9	0,9	3.8	1.1
PO ₄ -P [mg/L]	< 0.05*	-	< 0.05*	< 0.05*	< 0.05	< 0.05*
Carbonate hardness [$^{\circ}\text{dH}$]	16	-	15	19	-	19
Overall hardness [$^{\circ}\text{dH}$]	15	-	16	20	-	20
pH	8.5*	-	8.5*	8.2*	7.95	8.1*
Chloride [mg/L]	11**	-	19**	13**	70	17**

Chemical analyses

Chemical analyses were conducted with fish tissues and sediment samples (analyses of sediments only in sampling event 5). Due to financial restrictions, only sediments from sampling event 5 were chemically analyzed. For reasons of simplicity, only the compounds with the highest measured concentrations that are probably responsible for the observed effects in biota are listed in Table 3. The complete table of analyzed compounds can be found in Appendix 1 (Table 7). The assessment of the measured values for PAHs and PBDEs was based on directive 2013/39/EU of the European Parliament [26]. Since benzo(a)pyrene is considered to be a marker for the other PAHs, the environmental quality standard in biota and water for PAHs refers to the concentration of benzo(a)pyrene [26]. Values marked with an asterisk (*) represent concentrations that exceeded the environmental quality standards (EQS) of the European Parliament [26].

All measured concentrations were in the low microgram per kilogram range (dry weight). Fish tissues from sampling events 1 to 5 showed elevated concentrations of PBDEs that exceeded the EQS defined by the European Parliament [26]. With regard to the analyses of PAHs in fish tissues, the highest concentrations were found for naphthalene and phenanthrene. Some of the concentrations measured for naphthalene also exceeded the EQS defined by the European Parliament [26]. The sediments from the exposure site (downstream of the SSB effluent) showed slightly elevated concentrations of some PAHs, PCBs, and PBDEs in comparison to the upstream sediments (Table 3). However, the measured concentrations in fish samples show a contrary picture for some of the analyzed compounds. Here, fish from the upstream (reference) site sometimes showed higher concentrations in comparison to the exposure site. Therefore, a comparison of the measured values (fish tissues and sediments) did neither reveal any clear difference between the investigated sampling sites nor, consequently, any obvious influence of the SSB.

Table 3: Measured concentrations (in µg/kg, dry weight) of PAHs, PCBs, PBDEs, polycyclic musk compounds, and DDE in fish tissues (pooled fish samples) and sediment samples from the Argen River. Values marked with an asterisk (*) indicate concentrations that exceeded the environmental quality standards (EQS) of the European Parliament [26]

species/ sediment	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Barbel (<i>Barbus barbus</i>)	Loach (<i>Barbatula barbatula</i>)	Loach & bullhead (<i>B. barbatula</i> ; <i>C. gobio</i>)	Sediment	EQS in biota [µg/kg] wet weight					
Sampling site/ compound	U1	D1	U3	D3	U4	D4	U5	D5	U5	D5	
naphthalene	26.99*	6.26	17.43*	8.97	25.16*	31.78*	10.25	52.70*	2.80	4.30	5
fluorene	5.10	2.61	2.94	2.25	1.97	2.82	1.28	1.42	2.50	2.40	5
phenanthrene	16.14	8.75	17.94	12.85	15.37	17.34	12.10	6.94	21.00	28.20	5
fluoranthene	5.70	3.61	6.14	5.28	5.95	7.84	6.85	5.45	35.40	45.80	30
pyrene	5.22	3.62	5.56	3.97	5.38	6.97	6.42	4.98	32.10	39.70	5
HHCB	19.14	7.86	25.71	16.74	18.99	13.5	12.9	5.78	4.90	3.70	-
AHTN	6.57	3.96	9.75	8.34	12.43	6.42	6.80	2.38	3.40	2.80	-
DDE	4.30	3.18	3.75	4.14	4.11	3.66	4.83	3.82	0.90	0.80	-
PCB-28	2.33	2.66	1.71	1.59	2.20	1.10	0.90	1.90	0.52	0.61	-
PCB-52	1.53	1.61	0.95	1.31	0.90	1.20	1.10	0.80	0.33	0.28	-
PCB-101	0.90	1.58	0.72	0.45	2.30	2.80	2.40	1.30	0.45	0.51	-
PCB-118	0.90	1.58	0.72	0.45	0.60	0.90	0.50	0.40	0.23	0.22	-
PCB-138	3.99	2.70	3.58	3.21	3.70	4.90	3.50	3.10	0.71	0.62	-
PCB-153	4.49	3.10	3.80	3.55	4.30	5.20	3.70	3.20	0.75	0.68	-
PCB-180	1.09	1.00	0.90	0.78	1.10	1.00	1.20	0.80	0.52	0.56	-
Sum PBDE	1.45*	1.64*	2.37*	1.47*	1.59*	1.55*	4.62*	1.33*	0.69	0.78	0.0085
MTCS	1.24	0.21	1.15	0.64	0.98	1.14	1.51	0.97	1.40	0.90	-

Biological analyses

Fish embryo test

The results of the FET are presented in Fig. 1. Data and standard deviations are presented in Appendix 1 (Table 8). With regard to the first sampling event, sediment and surface water samples from both sampling sites led to significantly elevated mortality and developmental failure rates and also to a significantly reduced hatching rate. In contrast, water samples from the SSB effluent had no effect on the development of the exposed zebrafish embryos. Surprisingly, all samples (including sediment and surface water samples from both sampling sites) of the sampling events 2 and 3 also had no or only minor effects on zebrafish embryogenesis. In turn, samples from sampling events 4 and 5 again showed stronger effects. Sediment and surface water samples from the exposure site (downstream of the SSB) taken at sampling events 4 and 5 led to significantly reduced hatching rates, elevated mortality rates, and elevated developmental failure rates (e.g., spinal deformation, yolk sac edema; see Appendix 2,

Fig. 5) in exposed embryos, whereas fish embryos exposed to samples from the reference site showed no or only slight effects, similarly to the negative control. However, the observed mortality rates in samples from sampling events 4 and 5 were below 10 percent and, therefore, meet the criteria for a valid negative control according to OECD Guideline 236 [18].

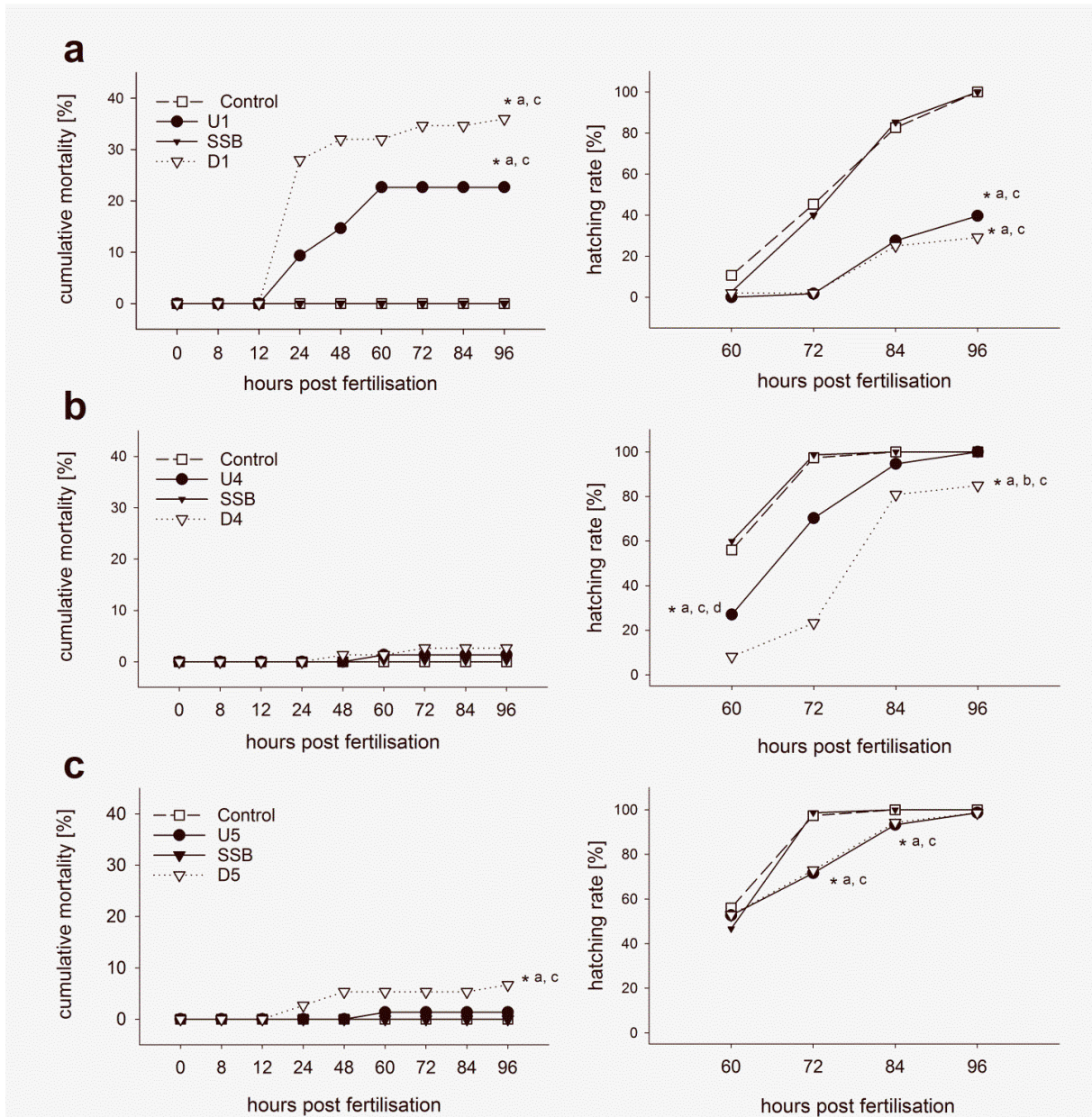


Figure 1: Mortality and hatching rates during the fish embryo test. Zebrafish embryos exposed to water and sediment samples from the Argen River from sampling event 1 (a), sampling event 4 (b), and sampling event 5 (c). a): significant differences (* $p < 0.05$) were found between the sampling sites and the control treatment respectively the SSB treatment. b): significant differences (* $p < 0.05$) between the sampling sites and the control treatment and also between the sampling sites and the SSB treatment were found for the hatching rate. c): significant differences were found between the downstream site and the control treatment respectively the SSB treatment. The combined data of three test runs were assessed by the Cox proportional hazards survival model

Histopathology

Histopathological investigations revealed cellular reactions in almost all analyzed fish tissues. Nevertheless, two investigated sampling sites. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the first sampling event showed only slight alterations in the gills, liver, and kidney. The investigated gills displayed partial hyperplasia and hypertrophy of epithelial cells as well as occasional epithelial liftings. In the livers, slight cellular vacuolization and mostly slight depletion of glycogen were observed. Also, smaller parts of the liver showed a slightly increased number of melanomacrophages, indicating an inflammatory response. Alterations in the kidney occurred in the form of vacuolization of the cytoplasm and sporadically present proteinaceous fluids in the lumen. Juvenile barbels (*Barbus barbus*; sampling event 3) revealed a good liver condition with only slight alterations of hepatocytes. However, some individuals showed alterations in the kidney such as strong vacuolizations in the tubule cells, proteinaceous fluids in the lumen and glomeruli with dilated capillaries.

In contrast to the usually slight histopathological alterations in rainbow trout and barbel, the investigated organs of loaches (*Barbatula barbatula*) and bullheads (*Cottus gobio*) sampled during events 2, 4, and 5 revealed severe tissue alterations. The gills showed various reactions in the form of strong hyperplasia and strong hypertrophy of epithelial cells, abundant epithelial liftings, fusion of secondary lamellae, and sporadically occurring necrosis in cells of the secondary lamellae. In the livers, strong vacuolizations in the hepatocytes, strong glycogen depletion, a disintegrated structure of hepatocytes, and irregularly shaped nuclei were observed. On rare occasions, liver tissues revealed lesions in the form of smaller necrotic areas and so-called megalocytes (extremely large hepatocytes, swollen due to an excessive metabolic rate) with irregularly shaped and enlarged nuclei and damaged membranes. Impairments in the kidney occurred in the form of strong vacuolizations in the tubule cells, irregularly shaped nuclei, proteinaceous fluids in the lumen, glomeruli with dilated capillaries, and degenerated glomeruli. The results of sampling events 1, 3, 4, and 5 are shown in Fig. 2.

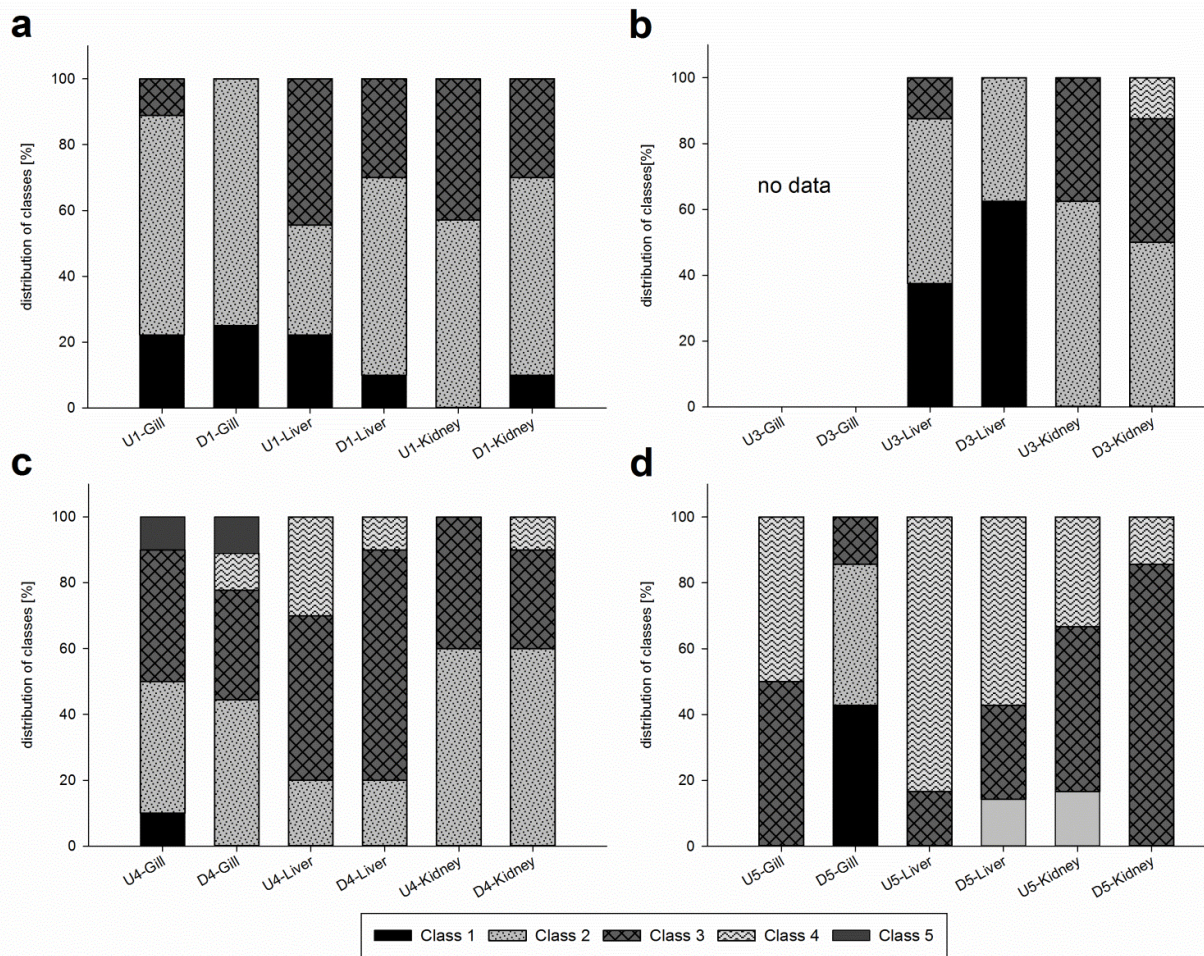


Figure 2: Histopathological classification of gills, liver, and kidney in rainbow trout (a), barbel (b), loach (c), and European bullhead (d) from the investigated field sites on the Argen River. Results are presented as the frequency (%) of given evaluation classes for each fish species and organ. Likelihood ratio tests revealed no significant ($*p < \alpha=0.05$) differences between the sampling sites

Micronucleus test

Several erythrocytes containing micronuclei could be identified during the investigation of fish blood samples within the micronucleus test. The results of all tests are summarized in the Appendix 2: Fig. 6. A significant variation was found among loaches that were caught at sampling event 4. Here, a higher amount of micronuclei was detected in fish caught downstream. No differences between fish caught up- vs. downstream were observed for the other sampling events.

Catching numbers of fish species

The Argen River represents a typical stream type of the Alpine foreland where brown trout (*Salmo trutta f. fario*), European bullhead (*Cottus gobio*), grayling (*Thymallus thymallus*), loach (*Barbatula barbatula*), and barbel (*Barbus barbus*) represent the main indigenous fish species [27]. Almost all

typical fish species of this stream type with the exception of lake trout (*Salmo trutta f. lacustris*), burbot (*Lota lota*), and the common nase (*Chondrostoma nasus*) were caught at both sampling sites. However, it was conspicuous that the catching numbers of all caught fish species were abnormally low compared to the natural productive capacity of this stream type. From a quantitative point of view, this means that the population structure of all fish species showed considerable deficits. As an example, the catching numbers of loach, barbel, European bullhead, and brown trout are presented in Fig. 3.

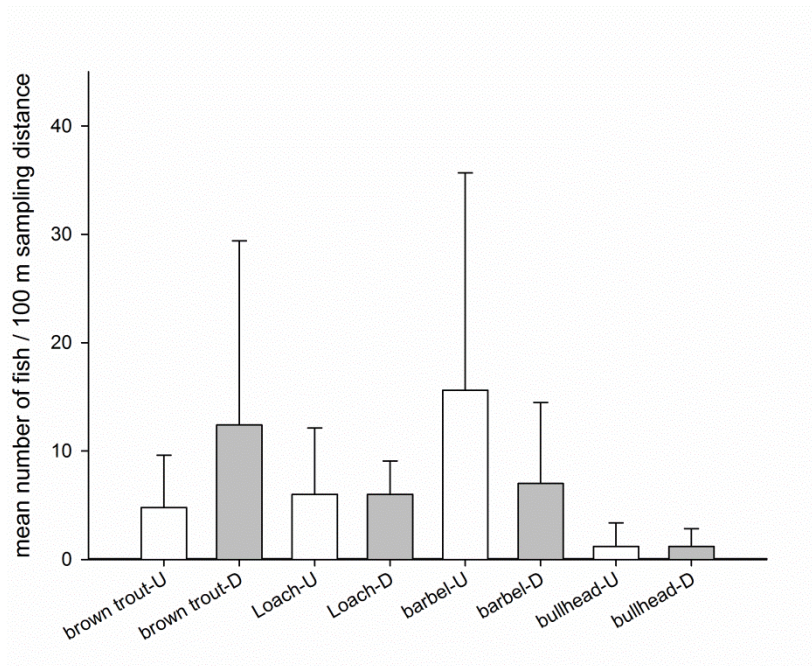


Figure 3: Catching numbers of brown trout, loach, barbel and European bullhead at both of the investigated Argen River sites: U=upstream; D=downstream of the SSB effluent. Vertical bars include all five sampling events. Fish sampling was conducted over a distance of 200 m.

Discussion

Our results indicate background pollution with traffic-related and waste water-related compounds at the investigated field sites of the Argen River.

Physicochemical parameters

The physicochemical analyses and the temperature measurements by data loggers did not reveal any clear differences between the two investigated sampling sites up- and downstream of the SSB effluent at the Argen River and indicated a good ecological condition according to the guidance values defined by the 2011 German Regulation Act for Surface Waters [16] and the German Working Group on Water Issues (LAWA) [17]. Nevertheless, a slightly higher conductivity was observed at the SSB effluent, which is most likely due to the use of sodium chloride as de-icing agent in winter periods [28]. However, the

chloride concentration and the conductivity were only slightly increased at the exposure site and indicated a sufficient dilution by the Argen River. Consequently, there is no clear evidence of an influence of the SSB on the salinity of the Argen River.

Chemical analyses

The chemical analyses indicated a toxic burden with micropollutants in fish and sediments at both of the investigated sampling sites. With regard to the investigated PAHs, the concentrations for naphthalene exceeded the environmental quality standards (EQS) defined by the European Parliament [26]. The exceedance of the EQS should be alarming since PAHs are known to have genotoxic and carcinogenic effects on fish, lead to morphological abnormalities in fish larvae, and also cause oxidative stress in the organs of exposed fish [7, 29–32]. Besides the aforementioned PAHs, PCBs and PBDEs were also detected in fish from the Argen River, with the measured concentrations for the sum of PBDEs also exceeding the EQS of the European Parliament [26]. PBDEs have a similar structure and similar properties, and may exert similar toxic effects like PCBs, but their C–Br bond makes them more susceptible to environmental degradation than PCBs with their much more stable C–Cl bond [33–35]. Due to their high hydrophobicity, both substance groups tend to accumulate and biomagnify in organisms where they can reach concentrations that are far higher than those in water [36, 37]. Especially problematic is the metabolic debromination of higher brominated PBDE congeners, as reported by Roberts et al. [38]. Taking this into account, the concentrations of lower brominated PBDEs, and thus presumably also their toxicity, may be enhanced due to the metabolic debromination of higher brominated congeners, as shown by Tomy et al. [39]. Investigations of Brown and Peake [40] showed that road debris represents the main source of PAHs in road runoff and storm water discharges. Benfenati et al. [41] reported that traffic represents the main source of roadside pollution with PAHs, PCBs, and other organic pollutants. Hence, in this case the analyzed substances like PAHs and PCBs are strongly supposed to originate from the road traffic near the Argen River. Predatory fish or birds with a long life span located at the top of the food web can concentrate high amounts of harmful hydrophobic substances like PAHs [2, 42]. Thus, a frequent uptake of, for example, PAHs over a long period could lead to severe health impairments in aquatic organisms, especially in combination with other harmful substances like PCBs and PBDEs. In addition to that, Lema et al. [43] assumed that PBDEs may be transferred maternally into the lipid stores of oocytes, and thus the offspring could be exposed to PBDEs during embryogenesis. Another non-negligible problem is the bioaccumulation of hydrophobic substances in riverine sediments. PAHs are usually attached to particles and organic matter [44], by which sediments can act as both sinks and secondary sources for hydrophobic compounds [45]. Due to the remobilization via bioturbation or flood events [46, 47], sediment-bound pollutants can again become available for aquatic organisms and consequently affect their health [48].

Indigenous fish species like brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) and grayling (*Thymallus thymallus*) lay their eggs on those parts of the riverbed that are characterized by gravel and finer sediment particles and can, therefore, be negatively influenced by contaminated sediments. In summary, it seems very likely that the analyzed substances are not only responsible for the observed reactions in the investigated fish tissues and the fish embryo tests, but also for the low density of all caught fish species.

The synthetic musks HHCB (galaxolide) and AHTN (tonalide) and the triclosan derivative MTCS (methyltriclosan) represent compounds that originate from personal care products and are, therefore, indicators of background pollution with municipal waste waters. For HHCB, it was demonstrated that it can cause antiestrogenic effects in in vivo and also in vitro test systems [49, 50]. Luckenbach et al. [51] showed that both AHTN and HHCB inhibit the multixenobiotic defense system in the California mussel (*Mytilus californianus*). AHTN also affected the heart rate in exposed zebrafish embryos (*Danio rerio*) as shown by Carlsson and Norrgren [52].

Biological data

The conducted fish embryo tests resulted in varying embryotoxic effects, depending on the sampling event and site. In samples from sampling event 1, both sampling sites had distinct negative effects on the survival rate, the hatching rate, and the developmental failure rate of exposed zebrafish embryos. One explanation for these effects might be the loading of the sediments with pollutants like PAHs, PCBs, and PBDEs. Experiments by Cachot et al. [53] and McElroy et al. [54] indicated that PAHs can pass the chorion when fish embryos are exposed to benzo[a]pyrene-spiked sediments. As a consequence, sediments containing large amounts of hydrophobic substances may affect the embryonic development of fish embryos. Additionally, it has to be mentioned that the FET with native sediment samples characterizes the overall quality of the sample including both micropollutants but also sediment characteristics as, e.g., particlesize and its loading with organic compounds that may lead to oxygen depletion. In contrast to the results of sampling event 1, samples from sampling events 2 and 3 only caused weak effects such as developmental delays in some of the exposed larvae. One probable explanation for this variation is the historic and severe flood event that affected central Europe (including the Argen River) in June 2013, prior to sampling events 2 and 3. The prevalent hydraulic forces may have led to a runoff or shift of the sediments and their bound pollutants and, therefore, may have resulted in distinct lower effects in the FET with samples taken at the events 2 and 3.

Fish embryo tests with samples from sampling events 4 and 5 again revealed stronger effects in zebrafish embryos that were exposed to sediment and surface water samples from the downstream exposure site, indicating a slightly negative influence of the SSB, eventually due to a discharge of traffic-

related pollutants into the Argen River. However, the observed mortality rates were below 10 % and, therefore, meet the criteria for a valid negative control according to OECD Guideline 236 [18]. Hence, it is unclear whether these results really reflect an adverse effect of the tested sediment samples taken at the sampling events 4 and 5. The chemical analyses showed that the investigated sediments contained PAHs, PCBs, and PBDEs, although in lower concentrations than in the investigated fish tissues. Perrichon et al. [8] exposed zebrafish and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos to artificial sediments spiked with benzo[a]pyrene and fluoranthene. The authors found that benzo[a]pyrene caused delayed hatching in exposed medaka mortality rates, a lack of hatching, and alterations in growth and development in exposed zebrafish embryos. Additionally, Usenko et al. [55] showed that PBDEs cause developmental malformations and increase the mortality of exposed zebrafish embryos. Although all concentrations were much lower in the examined sediments of our study, one has to take into account that indigenous fish species have much longer developmental periods and, therefore, spend more time lying on the riverbed during their embryogenesis. As a consequence, they experience a much longer exposure time than zebrafish or medaka embryos in laboratory studies. Hence, the observed loading with pollutants of the Argen sediments could also be an explanation for the low fish densities due to an impairment of embryogenesis in the affected fish embryos.

The most obvious effects were shown by the histopathological investigations. Here, fish from both sites, up- and downstream of the SSB, revealed strong reactions or severe health impairments in the examined tissues. The observed effects represent cellular reactions, which can be caused by a great variety of chemical stressors (e.g. heavy metals, organic compounds, salts) and may consequently result in a strong impairment or even loss of function in the affected organs [21]. The gills of the examined fish revealed hyperplasia and hypertrophy of epithelial cells, epithelial liftings, fusion of secondary lamellae, and sporadically occurring necrosis in cells of the secondary lamellae. The observed reactions may result in a reduction of oxygen uptake into the organism and thus negatively affect its metabolism. Santos et al. [9] observed similar reactions in the gills of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) after a chronic exposure to naphthalene. Barja-Fernández et al. [56] exposed turbot (*Psetta maxima*) to BDE-47 in the lower $\mu\text{g/L}$ range and observed fusions of the secondary lamellae as well as hyperplasia and hypertrophy of the epithelial cells. Shao et al. [57] exposed rainbow trout gill cells (RTgill-W1) to BDE-47 and observed a loss of the cell viability in this cell type. In liver, we observed vacuolizations, a depletion of the glycogen content, an increased number of melanomacrophages, a disintegrated structure of hepatocytes, cellular hypertrophy, and irregularly shaped nuclei. These reactions indicate an increased metabolic rate, which in turn can be an indicator of the metabolic degradation of harmful substances like, for example, PBDEs and PAHs. The livers of turbot (*Psetta maxima*) showed similar reactions (irregular morphology of hepatocytes,

cellular and nuclear hypertrophy) after exposure to BDE-47 as demonstrated in the work of Barja-Fernández et al. [56]. A comparison of our results with the literature shows that the analyzed substances like PAHs and PBDEs probably contributed to the pathologic alterations in the investigated fish tissues. However, a clear link between the observed effects and the analyzed substances cannot be established, since the chemical analyses focused on substances which mainly represent priority substances. The presented chemical data only give an overview on the general status of pollution in the investigated Argen River section. It can be assumed that, in addition, other unidentified pollutants acted as additional stressors and contributed to the observed effects.

The micronucleus test with blood samples of fish from the Argen River revealed micronuclei in almost all the investigated samples. With regard to the investigated blood samples from rainbow trout, a comparison with the literature [58] showed that the amount of micronuclei lies within the range of spontaneously induced micronuclei and can be, therefore, classified as nonhazardous. Due to the lack of reference values for loach (*Barbatula barbatula*) and barbel (*Barbus barbus*), a classification of the measured values proved to be difficult. Boettcher et al. [59] examined barbel from the Danube River between the cities of Sigmaringen and Ehingen, with barbel from an almost nonpolluted site at Sigmaringen showing micronucleus frequencies of 0.14 % which surpass those of the juvenile barbel that were caught at the investigated field sites on the Argen River. A comparison with our data indicates that a genotoxic effect on barbel at the investigated sampling sites can, therefore, be excluded.

The quality assessment of the macrozoobenthos community (see Appendix 2: Fig. 7) by means of the Saprobic Index revealed only a low anthropogenic burden at both investigated field sites. The Saprobic Index, the EPT Taxa, the Rheoindex, and the German Fauna Index point to a good ecological condition of the macrozoobenthos community at both field sites. The amount of caught fish species mostly complies with the natural reference fish fauna of this stream type [27]. Due to the hydraulic and morphologic characteristics of this stream type and the naturally low abundance of food sources (e.g., gammarids), the Argen River has a naturally low fish stock in comparison to other rivers like the Danube or the Neckar. However, from a quantitative point of view, all fish species showed significant deficits at both sampling sites. For example, brown trout (*Salmo trutta f. fario*), which normally represents the dominant fish species, was only caught in very low numbers. A high ecological pressure by fishing activities which could have contributed to the low fish numbers can be excluded, since the investigated sections are privately owned and fishing is rarely conducted. Also, a lack of breeding grounds can be excluded, since shallow gravel banks exist at both sampling sites. One probable reason for the low numbers of fish may be predation by black cormorants (*Phalacrocorax carbo*) which is also reflected by the low catching numbers of fish sized between 15 and 40 cm. However, this does not fully explain

the low numbers of caught bullhead and loach. It is documented that high predatory pressure by cormorants can lead to a mass development of small fish species like bullhead, loach or minnow [60], which obviously was not the case at the investigated Argen River sections. Moreover, almost all examined fish tissues from loach (*Barbatula barbatula*) and bullhead (*Cottus gobio*) showed strong cellular reactions which are rather caused by pollution than by predatory stress. The overall result is that the documented fish population remains below the natural productive capacity of the Argen River. The shortage of food sources (e.g., invertebrates) can be excluded as a possible reason for the small number of caught fish (in comparison to the natural reference fish fauna of this stream type), since the macrozoobenthos community was in a good condition. Hence, there must be other reasons, such as pollution with, e.g., hydrophobic contaminants by diffuse sources (e.g., roads, traffic, and agricultural land use) or point sources upstream of the reference site. Overall, in terms of the qualitative and quantitative composition of the macrozoobenthos community and the fish densities, there was no recognizable impairment due to the discharge from the SSB.

Summarizing the above, our results demonstrated a serious impairment of fish health, a loading with embryotoxic potentials in the examined Argen River sediments, and also low fish densities at both of the investigated sampling sites. Moreover, the chemical analyses revealed a burden with mainly traffic-related and waste water-related compounds, e.g., PAHs, PCBs, PBDEs, AHTN and MCTS in fish and sediments from both investigated sampling sites. Chemical analyses were mainly focused on compounds which are identified as priority substances. These data only give an overview on the general status of pollution at the respective sampling sites. In the literature, it is documented that priority pollutants may only count for a minor part of the biological response (e.g., [61, 62]). Consequently, it is likely that other pollutants could have contributed to the observed effects or even have acted as the main causal agents. The histopathological investigations demonstrated that sediment-living fish species like the European bullhead (*Cottus gobio*) and loach (*Barbatula barbatula*) reacted much more strongly than pelagic fish species, e.g., rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), indicating that one of the causal agents may be found within the sediment of the Argen River. This assumption is supported by the results of the fish embryo tests (Fig. 1). The hazardous potential of the sediment can likely be attributed to a burden with lipophilic chemical compounds (Table 3), which obviously originate from traffic and waste waters.

It remains to be noted that in the present case, temporary discharges—not only from the SSB but also from diffuse point sources like runoff from agricultural areas—are of special importance for the condition of the investigated Argen River section. With regard to the biological relevance of the observed effects, it must be mentioned that the Argen River is one of the biggest tributaries of Lake Constance. Lake Constance is not only of economic and environmental importance, but it also serves

as a drinking water reservoir for all neighboring states. Hence, the condition of the Argen River has to be investigated over its complete length, in order to ensure its ecological status but also the ecological status of Lake Constance.

In conclusion, it should be noted that—on the basis of the present results—the SSB has no negative impact on the investigated Argen River section.

Conclusions

In summary, the following insights were gained:

1. The conducted analyses revealed an impairment of fish health and fish development as well as a toxic burden with trace substances at both sampling sites. It was shown that the investigated sediments pose a toxic risk not only for fish embryos but also for benthic living fish. Due to the shortage of dose–response studies for many of the analyzed substances, it cannot be unambiguously clarified in this study which of the substances finally caused or contributed to the observed effects in the investigated fish tissues, blood samples, and fish embryos. Consequently, further investigations are urgently needed. These investigations should also include effect-directed analyses to detect non-target pollutants.
2. The results indicate that the SSB cannot be assigned as the main source of pollutants released into the Argen River, due to a background pollution level at both investigated sites. However, an additional impairment of aquatic organisms due to the discharge of pollutants, e.g., PAHs or metals, cannot be clearly excluded, especially in the case of local heavy rainfall events in combination with a low water level in the Argen River.
3. The Argen River was nominated for the title “River of the years 2014 and 2015”. This nomination may give rise to the impression that the Argen River represents a rather unimpaired surface water ecosystem. The results obtained in our study clearly demonstrate that this is certainly not the case. Furthermore, they showed that there is a moderate background pollution level comprising substances originating from waste waters and traffic at the investigated field sites. As the Argen is considered to be a river of both high ecological and economic importance, our results call for a future monitoring program to broaden the data basis and, in the long run, eventually even for a management plan to ensure and improve the river’s ecological stability. This is also of great importance for the quality and ecological stability of Lake Constance, since the Argen River flows into Lake Constance.

Abbreviations

EQS: environmental quality standards; SSB: storm water sedimentation basin; WFD: water framework directive; FFH directive: Flora–Fauna-Habitat Directive; FET: fish embryo test; LAWA: German Working Group on Water Issues; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorinated biphenyls; PBDEs: polybrominated diphenyl ethers; DDE: 1,1-*bis*-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethene; MTCS: methyltriclosan; AHTN: tonalide (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin); HHCB: galaxolide (1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta(g)-2-benzopyran).

Authors' contributions

PT performed biological analyses, data analyses, and drafted the manuscript. BK performed chemical analyses. KW conducted electrofishing during sampling and performed macrozoobenthos investigations. RT supervised the study. RT and HK contributed to the interpretation of the results and to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

1 Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany. 2 Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Bandtäle 2, 70569 Stuttgart, Germany. 3 Gewässerökologisches Labor Starzach, Tulpenstr. 4, 72181 Starzach, Germany. 4 Steinbeis Transfer-Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Germany. 5 Present Address: Animal Physiological Ecology, Institute for Evolution and Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, Tübingen 72076, Germany.

Acknowledgements

Particular thanks go to all colleagues of the Animal Physiological Ecology Group (University of Tübingen) who were involved in the sampling campaigns.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All relevant data on which the conclusions of the manuscript rely are presented in the main manuscript and the additional files.

Ethics approval

The study was approved by the Regional Council of Tübingen. In accordance with the requirements of the German Animal Protection Law, all fish were anesthetized with an overdose of tricaine (MS-222) solution and subsequently killed by cutting the spine above the operculum.

Funding

The study was financially supported by the Regional Council Tübingen (Germany).

Appendix

Appendix 1

See Tables 4, 5, 6, 7 and 8.

Table 4: Analyzed substance groups from chemical analyses

		LOQ in µg/kg DW	Blank (whole method) in µg/kg DW			LOQ in µg/kg DW	Blank (whole method) in µg/kg DW
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	naphthalene	0.15	0.15	polychlorinated biphenyls (PCBs)	PCB-28	0.02	< LOQ
	acenaphthene	0.02	< LOQ		PCB-52	0.02	< LOQ
	acenaphthylene	0.02	< LOQ		PCB-101	0.03	< LOQ
	fluorene	0.03	< LOQ		PCB-118	0.03	< LOQ
	phenanthrene	0.07	0.07		PCB-153	0.04	< LOQ
	anthracene	0.03	< LOQ		PCB-138	0.04	< LOQ
	fluoranthene	0.08	0.08		PCB-180	0.10	< LOQ
	pyrene	0.08	0.08				
	benz[a]anthracene	0.03	< LOQ	polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)	BDE-28	0.02	< LOQ
	chrysene	0.03	< LOQ		BDE-47	0.02	< LOQ
	benzo[b]fluoranthene	0.05	< LOQ		BDE-99	0.03	< LOQ
	benzo[k]fluoranthene	0.05	< LOQ		BDE-100	0.03	< LOQ
	benzo[a]pyrene	0.10	< LOQ		BDE-153	0.05	< LOQ
	indeno[123-d]pyrene	0.12	< LOQ		BDE-154	0.05	< LOQ
benzo[ghi]perylene	0.14	< LOQ	-				
dibenzo[ah]anthracen	0.17	< LOQ	-				
polycyclic musks; other compounds	galaxolide (HHCb)	1.7	< LOQ				
	tonalide (AHTN)	0.6	< LOQ				
	methyltriclosane (MTCS)	0.08	< LOQ				
	Dichlorodiphenyl- dichloroethylene	0.07	< LOQ				

Table 5: Observed developmental stages and endpoints during fish embryo test with *Danio rerio*; indicators of lethality are marked with an asterisk (*)

Endpoints	Hours post fertilization (hpf)							
	8 h	12	24	48	60	72	84	96 h
mortality/coagulation*	X	X	X	X	X	X	X	X
hatching					X	X	X	X
developmental retardations								
epiboly	X							
gastrulation		X						
formation of somites*			X					
tail detachment*			X					
spontaneous movements			X					
eye development			X					
heart beat rate (beats/min)*				X				
otolith formation					X			
occurrence of melanocytes					X			
developmental failures								
edema (heart and yolk)					X			
malformation of eyes					X	X	X	X
spinal deformation (scoliosis)					X	X	X	X
pigmentation failures					X	X	X	X

Table 6: Physicochemical data of sampling events 1 and 2. Values were evaluated and assessed according to the new guidance values defined by LAWA (German Working Group for Water Issues; LUBW [17]) and the German Regulation Act for Surface Waters of 2011 (OGewV [16]). Values marked with two asterisks () point to very good ecological conditions; values marked with one asterisk (*) point to ecological conditions that are at least good**

	U3	SSB Effluent 3	D3	U4	SSB Effluent 4	D4	U5	SSB Effluent 5	D5
Conductivity [µs/cm]	460	605	474	476	950	490	506	756	520
Water temp. [°C]	10.5**	10.4	9.8**	15.7**	13	14.8**	12.4**	13.2	12.4**
O ₂ saturation [%]	100	91.1	96	107.0	103	110	102.4	95.1	97.7
O ₂ content [mg/L]	10.41**	9.47	10.1**	9.9**	10	10.4**	10.27**	9.28	9.66**
NH ₄ -N [mg/L]	<0,04**	0.07	<0,04**	<0,04**	0.09	<0,04**	<0,04**	<0,04	<0,04**
NO ₂ -N [mg/L]	0.005	0.016	0.006	0.01	0.015	0.01	0.005	0.01	0.005
NO ₃ -N [mg/L]	0.7	2	0.9	1.10	2.8	1	1.2	3.9	1.1
PO ₄ -P [mg/L]	<0,05*	<0,05	<0,005*	<0,005*	<0,05	<0,005*	<0,005*	<0,05	<0,005*
Carbonate hardness [°dH]	18	21	17	16.00	20	16	16	21	17
Overall hardness [°dH]	18	21	18	17.00	22	18	19	23	18
pH	8.27*	8.1	8.23*	8.40*	8.25	8.4*	8.4*	8.25	8.4*
Chloride [mg/L]	8**	61	11**	11.00	121	13*	11*	42	15*

Table 7: Measured concentrations (in µg/kg, dry weight) of PAHs, PCBs, PBDEs, polycyclic musk compounds, DDE and MTCS in fish tissues and sediment samples of the Argen River. Values marked with an asterisk (*) indicate concentrations that exceeded the environmental quality standards of the European Parliament [26]

species/ sediment	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		Barbel (<i>Barbus barbus</i>)		Loach (<i>Barbatula barbatula</i>)		Loach & bullhead (<i>Barbatula barbatula</i> ; <i>Cottus gobio</i>)		Sediment	
Sampling site/ compund	U1	D1	U3	D3	U4	D4	U5	D5	U5	D5
naphthalene	26.99*	6.26	17.43	8.97	25.16*	31.78*	10.25	52.70*	2.80	4.30
acenaphthene	0.83	0.68	0.93	1.12	1.35	1.98	1.07	1.25	1.40	2.10
Acenaphthylene	1.09	0.64	0.68	0.97	0.88	1.24	0.54	0.66	1.10	1.00
fluorene	5.10	2.61	2.94	2.25	1.97	2.82	1.28	1.42	2.50	2.40
phenanthrene	16.14	8.75	17.94	12.85	15.37	17.34	12.10	6.94	21.00	28.20
anthracene	1.67	0.88	2.45	1.97	1.55	4.21	1.35	1.21	3.50	6.40
fluoranthene	5.70	3.61	6.14	5.28	5.95	7.84	6.85	5.45	35.40	45.80
pyrene	5.22	3.62	5.56	3.97	5.38	6.97	6.42	4.98	32.10	39.70
benz[a]- anthracene	0.50	0.44	0.53	0.48	0.61	0.71	0.97	0.65	16.30	14.70
chrysene	0.46	0.43	0.41	0.37	0.52	0.68	1.52	0.50	18.90	20.30
benzo[b]- fluoranthene	0.40	0.33	0.38	0.31	0.32	0.28	0.42	0.39	15.4	21.9
benzo[k]- fluoranthene	0.33	0.26	0.29	0.27	0.29	0.31	0.34	0.38	10.1	16.2
benzo[a]-pyrene	0.32	0.23	0.24	0.26	0.24	0.21	0.19	0.18	10.8	15.5
indeno[123-cd]- pyrene	0.14	0.14	0.14	0.11	0.13	0.15	0.14	0.21	4.50	5.80
benzo[ghi]- perylene	0.16	0.17	0.17	0.15	0.16	0.21	0.19	0.25	5.90	7.50
dibenzo[ah]- anthracene	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	2.70	2.50
HHCB	19.14	7.86	25.71	16.74	18.99	13.5	12.9	5.78	4.90	3.70
AHTN	6.57	3.96	9.75	8.34	12.43	6.42	6.80	2.38	3.40	2.80
MTCS	1.24	0.21	1.15	0.64	0.98	1.14	1.51	0.97	1.40	0.90
DDE	4.30	3.18	3.75	4.14	4.11	3.66	4.83	3.82	0.90	0.80
PCB-28	2.33	2.66	1.71	1.59	2.20	1.10	0.90	1.90	0.52	0.61
PCB-52	1.53	1.61	0.95	1.31	0.90	1.20	1.10	0.80	0.33	0.28
PCB-101	0.90	1.58	0.72	0.45	2.30	2.80	2.40	1.30	0.45	0.51
PCB-118	0.90	1.58	0.72	0.45	0.60	0.90	0.50	0.40	0.23	0.22
PCB-138	3.99	2.70	3.58	3.21	3.70	4.90	3.50	3.10	0.71	0.62
PCB-153	4.49	3.10	3.80	3.55	4.30	5.20	3.70	3.20	0.75	0.68
PCB-180	1.09	1.00	0.90	0.78	1.10	1.00	1.20	0.80	0.52	0.56
Sum PBDE	1.45*	1.64*	2.37*	1.47*	1.59*	1.55*	4.62*	1.33*	0.69	0.78

Table 8: Mortality and hatching rates during fish embryo test. Data are presented as mean values (= mean) and standard deviations (=SD). hpf = hours post fertilization.

		Control		U1		SSB1		D1	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
cumulative mortality	0 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	8 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	12 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	24 hpf	0.00	0.00	9.33	6.11	0.00	0.00	28.00	14.42
	48 hpf	0.00	0.00	14.67	16.17	0.00	0.00	32.00	14.42
	60 hpf	0.00	0.00	22.67	16.65	0.00	0.00	32.00	14.42
	72 hpf	0.00	0.00	22.67	16.65	0.00	0.00	34.67	16.65
	84 hpf	0.00	0.00	22.67	16.65	0.00	0.00	34.67	16.65
	96 hpf	0.00	0.00	22.67	16.65	0.00	0.00	36.00	18.33
Hatching rate	60 hpf	10.67	2.31	0.00	0.00	2.67	4.62	2.04	2.75
	72 hpf	45.33	15.14	1.72	2.41	40.00	30.20	2.04	2.75
	84 hpf	82.67	19.73	27.59	28.13	85.33	27.71	25.00	17.64
	96 hpf	100.00	0.00	39.66	28.69	100.00	0.00	29.17	21.64
		Control		U4		SSB4		D4	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
cumulative mortality	0 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	8 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	12 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	24 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	48 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33	2.31
	60 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	1.33	2.31
	72 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	2.67	2.31
	84 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	2.67	2.31
	96 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	2.67	2.31
Hatching rate	60 hpf	56.00	4.00	27.03	6.27	60.00	6.93	8.22	13.86
	72 hpf	97.33	2.31	70.27	26.46	98.67	2.31	23.29	14.81
	84 hpf	100.00	0.00	94.59	9.24	100.00	0.00	80.82	14.72
	96 hpf	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	84.93	12.80
		Control		U5		SSB5		D5	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
cumulative mortality	0 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	8 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	12 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	24 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67	4.62
	48 hpf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.33	9.24
	60 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	5.33	9.24
	72 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	5.33	9.24
	84 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	5.33	9.24
	96 hpf	0.00	0.00	1.33	2.31	0.00	0.00	6.67	11.55
Hatching rate	60 hpf	56.00	4.00	52.70	26.21	46.67	6.11	52.86	42.02
	72 hpf	97.33	2.31	71.62	24.17	98.67	2.31	72.86	49.49
	84 hpf	100.00	0.00	93.24	6.33	100.00	0.00	94.29	11.00
	96 hpf	100.00	0.00	98.65	2.41	100.00	0.00	98.57	0.00

Appendix 2

See Figs. 4, 5, 6 and 7

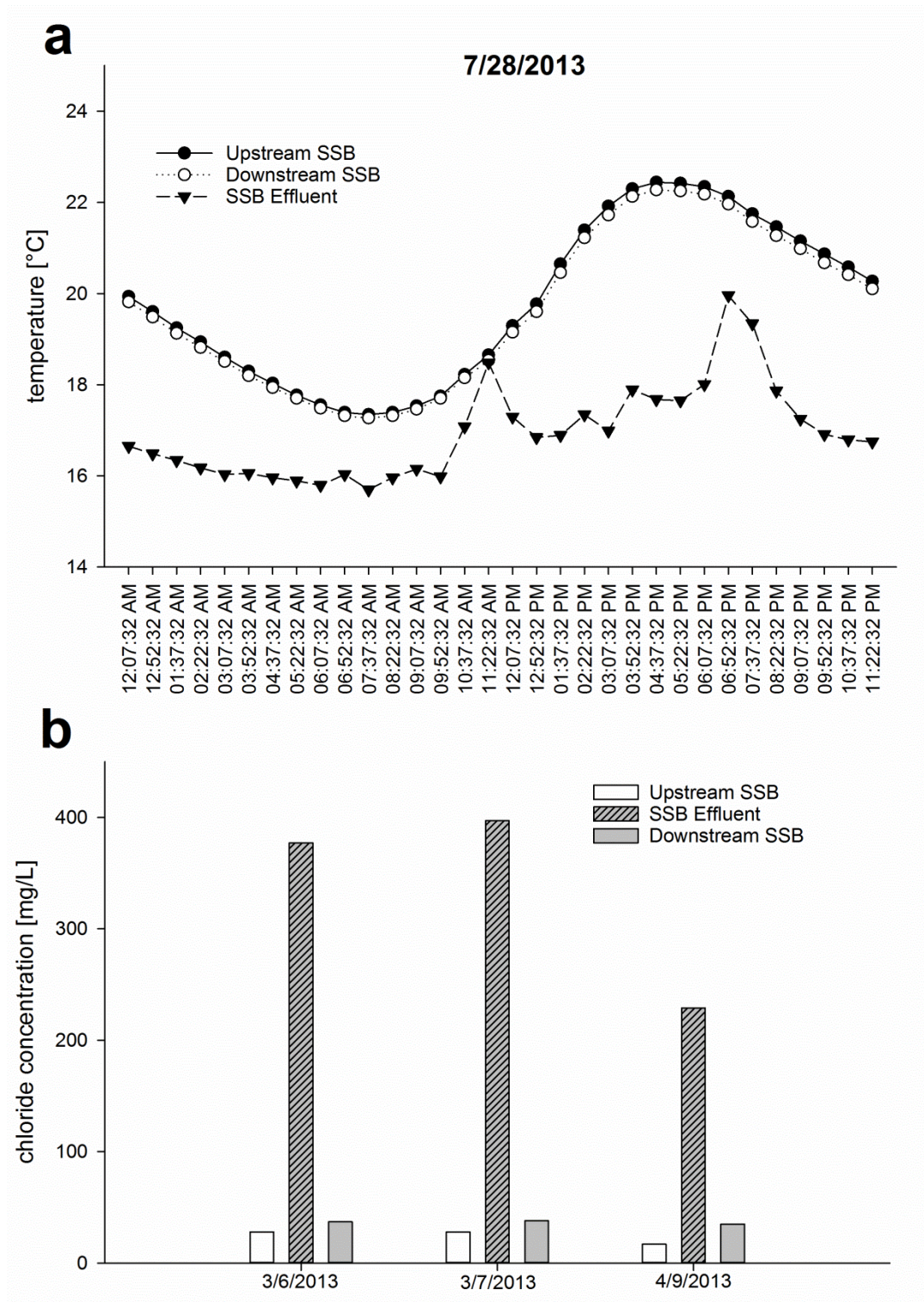


Figure 4: (a) temporal temperature profile of water temperature at both sampling sites and the SSB effluent during and after a rainfall event on 28 July 2013; (b) measured chloride concentrations at both sampling sites and the SSB effluent after three rainfall events in March and April 2013

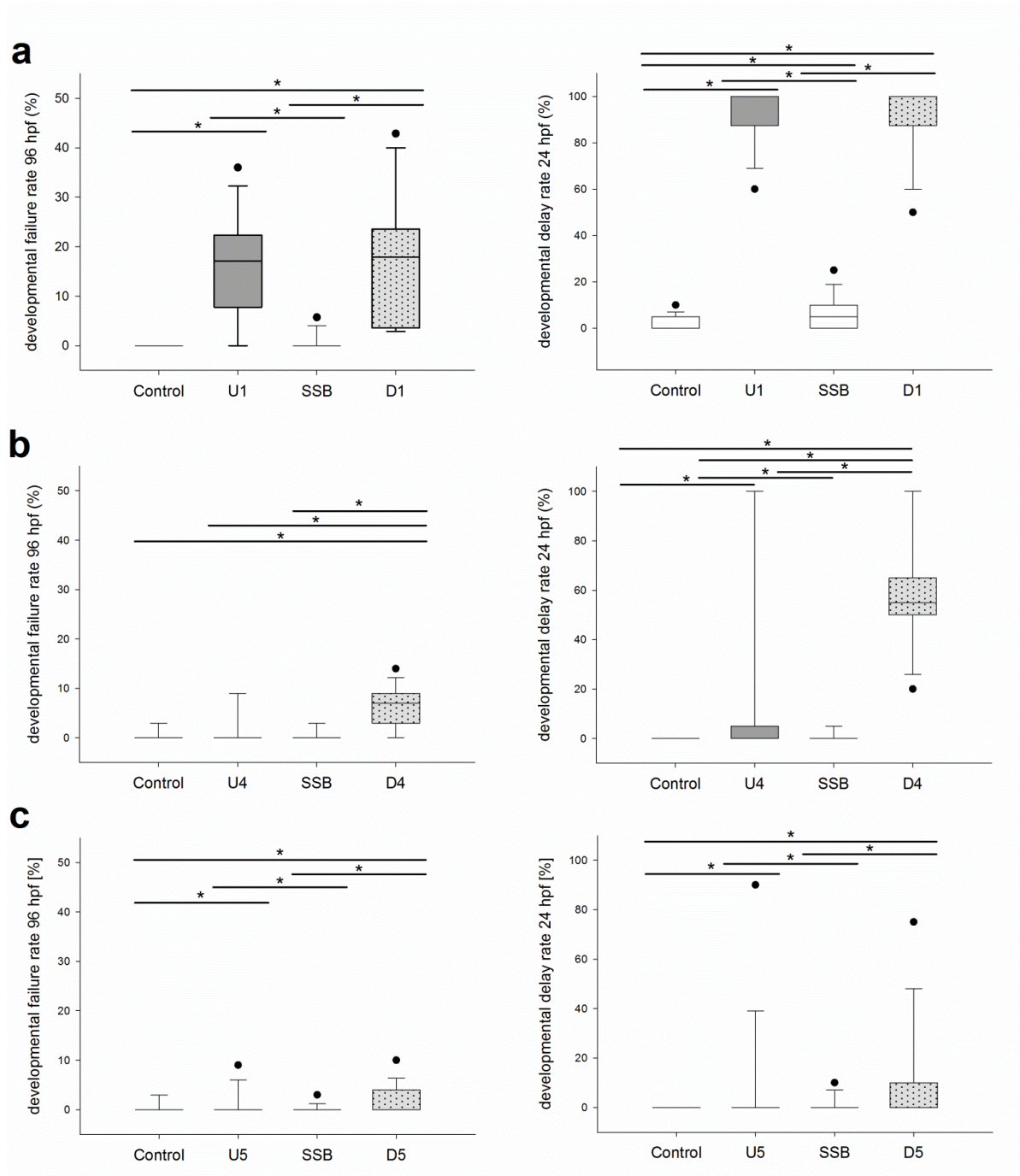


Figure 5: Developmental delay and developmental failure rates observed in the fish embryo test. Zebrafish embryos exposed to water and sediment samples from the Argen River from sampling event 1 (a), sampling event 4 (b), and sampling event 5 (c). Significant differences ($* p < 0.05$) are indicated with asterisks. The combined data of three test runs were assessed by the Fisher's exact test. In order to correct for multiple testing, the Holm–Bonferroni method was applied.

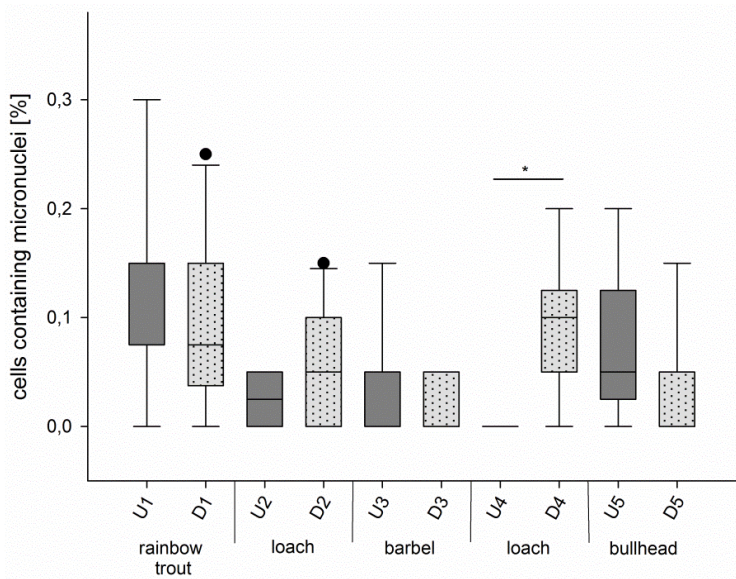


Figure 6: Frequency of erythrocytes containing micronuclei in fish of the Argen River upstream and downstream of the SSB effluent. Results are given as percentages of fish erythrocytes containing micronuclei (total of 2,000 counted cells). Data are given as medians, 25th/75th percentiles (boxes) and 5th/95th percentiles (whiskers). There was a significant difference ($p < 0.05$) between U4 ($M = 0$; $SD \pm 0$) and D4 ($M = 1.78$; $SD \pm 1.2$). Analysis of data was conducted by using paired t-tests

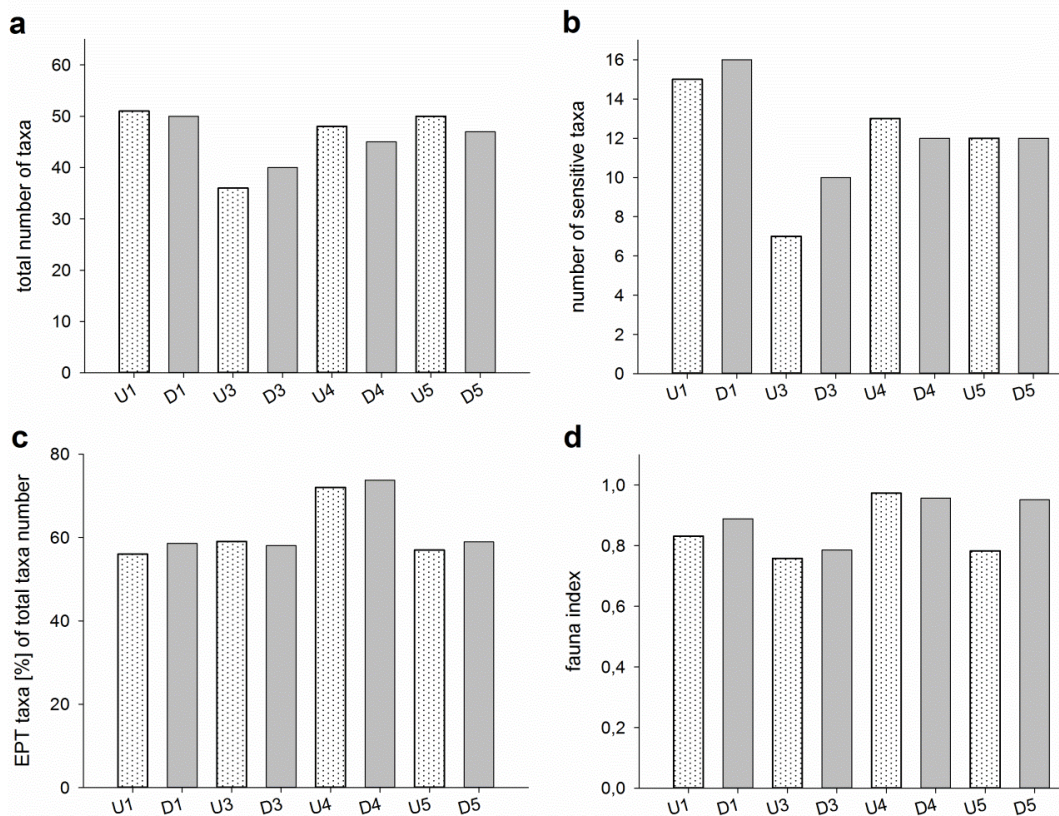


Figure 7: Macrozoobenthos indices: (a) total number of all observed taxa; (b) number of sensitive taxa; (c) EPT (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera) taxa; (d) German Fauna Index

Received: 7 December 2016 Accepted: 16 February 2017

Published online: 06 March 2017

References

1. Triebskorn R and Hetzenauer H (2012) *Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review*. Environmental Sciences Europe. 24(1): p. 1-24.
2. Meland S, Heier LS, Salbu B, Tollefsen KE, Farmen E, and Rosseland BO (2010) *Exposure of brown trout (Salmo trutta L.) to tunnel wash water runoff—chemical characterisation and biological impact*. Science of the Total Environment. 408(13): p. 2646-2656.
3. Salbu B, Rosseland BO, and Oughton DH (2005) *Multiple stressors—a challenge for the future*. Journal of Environmental Monitoring. 7(6): p. 539-539.
4. Ellis JB, Revitt DJ, Harrop DO, and Beckwith PR (1987) *The contribution of highway surfaces to urban stormwater sediments and metal loadings*. Science of the Total Environment. 59: p. 339-349.
5. Beasley G and Kneale P (2002) *Reviewing the impact of metals and PAHs on macroinvertebrates in urban watercourses*. Progress in Physical Geography. 26(2): p. 236-270.
6. Duffy JE, Carlson E, Li Y, Prophete C, and Zelikoff JT (2002) *Impact of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome*. Marine environmental research. 54(3): p. 559-563.
7. Oliveira M, Pacheco M, and Santos MA (2007) *Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (Liza aurata) following short-term exposure to phenanthrene*. Chemosphere. 66(7): p. 1284-1291.
8. Perrichon P, Le Bihanic F, Bustamante P, Le Menach K, Budzinski H, Cachot J, and Cousin X (2014) *Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (Danio rerio) and Japanese medaka (Oryzias latipes) embryo-larval assays*. Environmental Science and Pollution Research. 21(24): p. 13703-13719.
9. Santos TC, Gomes V, Passos J, Rocha A, Salaroli R, and Ngan P (2011) *Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano Trachinotus carolinus (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene*. PANAMJAS. 6: p. 109-120.
10. Ahlf W, Hollert H, Neumann-Hensel H, and Ricking M (2002) *A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality a German Approach based on ecotoxicological and chemical measurements*. Journal of Soils and Sediments. 2(1): p. 37-42.

11. Maltby L, Forrow DM, Boxall A, Calow P, and Betton CI (1995) *The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 1. Field study*. Environmental Toxicology and Chemistry. 14(6): p. 1079-1092.
12. EU Directive (1992) *Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora*. Official Journal of the European Union. 206: p. 7-50.
13. Hollert Henner, Duerr Matthias, Erdinger Lothar, and Braunbeck Thomas (2000) *Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar River (Germany) during a winter flood*. Environmental Toxicology and Chemistry. 19(3): p. 528-534.
14. Jowett Ian G. and Richardson Jody (1989) *Effects of a severe flood on instream habitat and trout populations in seven New Zealand rivers*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 23(1): p. 11-17.
15. AQEM Consortium (2002) *Manual for the application of the AQEM method*. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version. 1.
16. OGEWV (2011) *Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGEWV)*.
17. LUBW (2008) *Bewirtschaftungsziele für Fließgewässer. Arbeitshilfe zur Erstellung der Maßnahmenprogramme im Rahmen des ersten Bewirtschaftungsplans zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (German)*.
18. OECD, *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. 2013: OECD Publishing.
19. Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, and Braunbeck T (2003) *A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (Danio rerio) embryos*. Journal of Soils and Sediments. 3(3): p. 197-207.
20. Thellmann P, Köhler H-R, Rößler A, Scheurer M, Schwarz S, Vogel H-J, and Tribskorn R (2015) *Fish embryo tests with Danio rerio as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies*. Environmental Science and Pollution Research. 22(21): p. 16405-16416.
21. Tribskorn R, Casper H, Scheil V, and Schwaiger J (2007) *Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and common carp (Cyprinus carpio)*. Analytical and bioanalytical chemistry. 387(4): p. 1405-1416.
22. Tribskorn R, Telcean I, Casper H, Farkas A, Sandu C, Stan G, Colărescu O, Dori T, and Köhler H-R (2008) *Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish*. Environmental Monitoring and Assessment. 141(1-3): p. 177-188.

23. Al-Sabti Kabil and Metcalfe Chris D. (1995) *Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water*. Mutation Research/Genetic Toxicology. 343(2–3): p. 121-135.
24. Çavaş Tolga and Ergene-Gözükara Serap (2005) *Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment*. Environmental and molecular mutagenesis. 46(1): p. 64-70.
25. Rocha PS, Luvizotto GL, Kosmehl T, Böttcher M, Storch V, Braunbeck T, and Hollert H (2009) *Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): in vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies*. Ecotoxicology and environmental safety. 72(7): p. 1842-1848.
26. EU Directive (2013) *Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy*. Off. J. Eur. Union L226, 1–17.
27. Dußling U (2006) *FischRef BW—die fischfaunistische Referenz-Datenbank für Baden-Württemberg*. Excel-basierte Software-Anwendung.
28. Hallberg M, Renman G, and Lundbom T (2007) *Seasonal variations of ten metals in highway runoff and their partition between dissolved and particulate matter*. Water, Air, and Soil Pollution. 181(1-4): p. 183-191.
29. Incardona JP, Collier TK, and Scholz NL (2004) *Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*. Toxicology and applied pharmacology. 196(2): p. 191-205.
30. Larcher T, Perrichon P, Vignet C, Ledevin M, Le Menach K, Lyphout L, Landi L, Clerandeanu C, Le Bihanic F, and Ménard D (2014) *Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Environmental Science and Pollution Research. 10: p. 1007.
31. Sun Y, Yu H, Zhang J, Yin Y, Shi H, and Wang X (2006) *Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure*. Chemosphere. 63(8): p. 1319-1327.
32. Wessel N, Ménard D, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, Le Goff J, Burgeot T, and Akcha F (2012) *Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*)*. Aquatic toxicology. 108: p. 33-41.
33. Darnerud PO, Eriksen GS, Jóhannesson T, Larsen PB, and Viluksela M (2001) *Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology*. Environmental Health Perspectives. 109(Suppl 1): p. 49.
34. Hooper K and McDonald TA (2000) *The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs*. Environmental health perspectives. 108(5): p. 387.

35. Rahman F, Langford KH, Scrimshaw MD, and Lester JN (2001) *Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants*. *Science of the Total Environment*. 275(1): p. 1-17.
36. Brázová T, Hanzelová V, and Miklisová D (2012) *Bioaccumulation of six PCB indicator congeners in a heavily polluted water reservoir in Eastern Slovakia: tissue-specific distribution in fish and their parasites*. *Parasitology research*. 111(2): p. 779-786.
37. Burreau S, Zebühr Y, Broman D, and Ishaq R (2004) *Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (Esox lucius), perch (Perca fluviatilis) and roach (Rutilus rutilus) from the Baltic Sea*. *Chemosphere*. 55(7): p. 1043-1052.
38. Roberts SC, Noyes PD, Gallagher EP, and Stapleton HM (2011) *Species-specific differences and structure– activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species*. *Environmental science & technology*. 45(5): p. 1999-2005.
39. Tomy GT, Palace VP, Halldorson T, Braekevelt E, Danell R, Wautier K, Evans B, Brinkworth L, and Fisk AT (2004) *Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (Salvelinus namaycush)*. *Environmental science & technology*. 38(5): p. 1496-1504.
40. Brown JN and Peake BM (2006) *Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff*. *Science of the total environment*. 359(1): p. 145-155.
41. Benfenati E, Valzacchi S, Mariani G, Airoldi L, and Fanelli R (1992) *PCDD, PCDF, PCB, PAH, cadmium and lead in roadside soil: relationship between road distance and concentration*. *Chemosphere*. 24(8): p. 1077-1083.
42. Zaranko DT, Griffiths RW, and Kaushik NK (1997) *Biomagnification of polychlorinated biphenyls through a riverine food web*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16(7): p. 1463-1471.
43. Lema SC, Schultz IR, Scholz NL, Incardona JP, and Swanson P (2007) *Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47)*. *Aquatic Toxicology*. 82(4): p. 296-307.
44. Krein A and Schorer M (2000) *Road runoff pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons and its contribution to river sediments*. *Water Research*. 34(16): p. 4110-4115.
45. Brinkmann M, Hudjetz S, Keiter S, Seiler T-B, Wölz J, Hallare AV, Hollert H, Cofalla C, Roger S, and Schüttrumpf H (2010) *Toxicity and risk assessment of fluvial sediments and suspended matter: a short overview of past and recent developments in sediment toxicity assessment*. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. 22(6): p. 651-655.
46. Oetken M, Stachel B, Pfenninger M, and Oehlmann J (2005) *Impact of a flood disaster on sediment toxicity in a major river system—the Elbe flood 2002 as a case study*. *Environmental Pollution*. 134(1): p. 87-95.

47. Power EA and Chapman PM (1992) *Assessing sediment quality*. In: Burton GA (ed) *Sediment toxicity assessment*. Lewis-Publishers, Boca Raton: p. 1-18.
48. Bartzke M, Delov V, Stahlschmidt-Allner P, Allner B, and Oehlmann J (2010) *Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the Water Framework Directive approach*. *Journal of Soils and Sediments*. 10(3): p. 389-399.
49. Schreurs RH, Legler J, Artola-Garicano E, Sinnige TL, Lanser PH, Seinen W, and Van der Burg B (2004) *In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish*. *Environmental science & technology*. 38(4): p. 997-1002.
50. Simmons DBD, Marlatt VL, Trudeau VL, Sherry JP, and Metcalfe CD (2010) *Interaction of Galaxolide® with the human and trout estrogen receptor- α* . *Science of the total environment*. 408(24): p. 6158-6164.
51. Luckenbach T, Corsi I, and Epel D (2004) *Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels*. *Marine environmental research*. 58(2): p. 215-219.
52. Carlsson G and Norrgren L (2004) *Synthetic musk toxicity to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 46(1): p. 102-105.
53. Cachot J, Law M, Pottier D, Peluhet L, Norris M, Budzinski H, and Winn R (2007) *Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the λ transgenic medaka*. *Environmental Science & Technology*. 41(22): p. 7830-7836.
54. McElroy AE, Bogler A, Weisbaum D, Norris M, Mendelman LV, Setlow R, and Winn R (2006) *Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo[a]pyrene dosed sediments*. *Marine environmental research*. 62: p. S273-S277.
55. Usenko CY, Robinson EM, Usenko S, Brooks BW, and Bruce ED (2011) *PBDE developmental effects on embryonic zebrafish*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(8): p. 1865-1872.
56. Barja-Fernández S, Míguez JM, and Álvarez-Otero R (2013) *Histopathological effects of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*)*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 95: p. 60-68.
57. Shao J, Eckert ML, Lee LEJ, and Gallagher EP (2008) *Comparative oxygen radical formation and toxicity of BDE 47 in rainbow trout cell lines*. *Marine environmental research*. 66(1): p. 7-8.
58. Bolognesi C and Hayashi M (2011) *Micronucleus assay in aquatic animals*. *Mutagenesis*. 26(1): p. 205-213.

59. Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seitz N, Rocha PS, Hollert H, and Braunbeck T (2010) *Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 700(1): p. 11-17.
60. Schneider Jörg, Jörgensen Lothar, Krau Florian, and Fetthauer Manfred (2015) *WRRL-Qualitätsindikator Fischfauna und Kormoranfraßdruck–wenn trophische Störung Strukturgüte schlägt*. Korrespondenz Wasserwirtschaft. 8: p. 755-761.
61. Wölz Jan, Engwall Magnus, Maletz Sibylle, Olsman Takner Helena, van Bavel Bert, Kammann Ulrike, Klempt Martin, Weber Roland, Braunbeck Thomas, and Hollert Henner (2008) *Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine — a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis*. Environmental Science and Pollution Research. 15(7): p. 536.
62. Liu Li, Chen Ling, Shao Ying, Zhang Lili, Floehr Tilman, Xiao Hongxia, Yan Yan, Eichbaum Kathrin, Hollert Henner, and Wu Lingling (2014) *Evaluation of the Ecotoxicity of Sediments from Yangtze River Estuary and Contribution of Priority PAHs to Ah Receptor-Mediated Activities*. PLoS ONE. 9(8): p. e104748.

Publikationsliste

- Triebskorn R, Blaha L, Engesser B, Güde H, Henneberg A, Hetzenauer H, Köhler H-R, Kraus S, Kuch B, Maier D, Oehlmann J, Peschke K, Rault M, Rey P, Richter D, Sacher F, Suchail S, Thellmann P, Weyhmüller M, Wurm K, Vogel H-J (2013) SchussenAktiv - Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. KW - Korrespondenz Wasserwirtschaft (6) Nr. 8; DOI: 10.3243/kwe2013.08.001
- Triebskorn R, Thellmann P, Vogel H.-J., Wurm K (2014) Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie? KW - Korrespondenz Wasserwirtschaft (7) Nr. 10; DOI: 10.3242/kwe2014.10.004
- Thellmann P, Köhler H-R, Rößler A, Scheurer M, Schwarz S, Vogel H-J, Triebskorn R (2015) Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment technologies. *Environmental Science and Pollution Research* 22:21. DOI: 10.1007/s11356-014-3785-8
- Thellmann P, Kuch B, Wurm K, Köhler H-R, Triebskorn R (2017) Water quality assessment in the "German River of the Years 2014/2015": How a case study on the impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of fish health in the Argen River (Southern Germany). *Environmental Sciences Europe* 29:10; DOI: 10.1186/s12302-017-0108-y
- Thellmann P, Greiner-Perth K, Jacob S, Knoll M, Schäfer M, Stängle M, Ziegler M, Scheurer M, Köhler H-R and Triebskorn R (2017) Does waste water treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream?. *International Journal of Water and Wastewater Treatment* 3(2); DOI: <http://dx.doi.org/10.16966/2381-5299.1>
- Thellmann P (2017) Entwicklungstoxizität beim Fisch (Fisch-Embryotoxizitätstest mit dem Zebraquappe *Danio rerio*; FET), Kapitel 2.12.8, S.102 - 104 / Kapitel 4.7.1, S. 227 - 231 / Kapitel 4.16.2, S. 292 - 300. In: Triebskorn R (Hrsg.) (2017) Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. ISBN: 978-3-946552-10-9. Eberhard Karls Universität, Universitätsbibliothek.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Eberhard Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe „Physiologische Ökologie der Tiere“ des Instituts für Evolution und Ökologie erstellt.

Bei meinen beiden Betreuern, Prof. Dr. Rita Triebkorn und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler, möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit zu dieser Dissertation sowie für ihr Vertrauen in meine Arbeit bedanken. Danke, dass ihr mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden seid und mich stets mit einem offenen Ohr bei all meinen Problemen und Belangen empfangen habt. Ihr seid einfach super.

Ein weiteres riesengroßes Dankeschön geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe „Physiologische Ökologie der Tiere“ für das wundervolle Arbeitsklima. Für die tatkräftige Unterstützung in den Freilandprobenahmen und im Labor sowie für die gute Zeit inner- und außerhalb der Arbeit möchte ich mich bei Carla Lorenz, Andreas Dieterich, Simon Schwarz, Stefanie Jacob, Stefanie Kraus, Katharina Peschke, Anja Henneberg, Diana Maier, Sabrina Willhelm, Hannah Schmieg, Michael Ziegler, Sebastian Kindermann, Mona Schweizer, Volker Scheil, Alexandra Scheil, Krisztina Vincze, Maddalena Di Lellis und Sandra Maute bedanken. In euch habe ich nicht nur gute Kollegen, sondern auch gute Freunde gefunden. Für euch wird immer eine Kerze in der Kathedrale meines Herzens brennen (☺).

Weiterhin möchte ich all meinen Kooperationspartnern danken, welche mich in zahlreichen Projekten in unterschiedlichster Art und Weise unterstützten. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Karl Wurm (GÖL Starzach), Dr. Bertram Kuch (Uni Stuttgart) und Dr. Marco Scheurer (TZW Karlsruhe).

Für stets guten Zuspruch und Aufmunterung sowie für Ihre Unterstützung und Freundschaft bedanke ich mich ganz herzlich bei Thomas Hauck, Christian Amann, Alexander Varga, Sabine Zahner, Andrea Lorenz, Clemens Frey, Andreas Dieterich, Monika Dieterich, Simon Schwarz, Stefanie Jacob, Hannah Schmieg und Philipp Härter.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner lieben Omi und meiner Freundin Carla für all die Liebe, Geduld, Nachsicht und Unterstützung danken. Danke, dass ihr immer für mich da wart. Ich hab euch lieb.