

Analyse der Effekte von  
Mikroschadstoffeinleitungen auf  
Makrozoobenthosorganismen in Gewässern:  
biochemische Marker, in situ Untersuchungen und  
Verhaltensmessungen in Echtzeit für eine integrierte  
ökologisch relevante Bewertung

Kurztitel: Mikroschadstoffeffekte auf MZB-  
Organismen

Aktenzeichen: 33566/01  
Projektbeginn: 01.11.2017  
Laufzeit: vier Jahre  
Essen, Januar 2022

Universität Duisburg-Essen, Aquatische Ökologie  
Louisa Rothe, Christian Feld, Bernd Sures

Ruhrverband  
Michael Weyand

LimCo International GmbH  
Almut Gerhardt

Analyse der Effekte von Mikroschadstoffeinleitungen auf Makrozoobenthosorganismen in Gewässern: biochemische Marker, in situ Untersuchungen und Verhaltensmessungen in Echtzeit für eine integrierte ökologisch relevante Bewertung

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
Kurzfassung des Berichtes .....	2
1. Einführung/Motivation .....	3
2. Methodik/Vorgehensweise/Projekttablauf .....	4
2.1 Projekttablauf .....	4
2.2 Kläranlage Schwerte .....	5
2.3 Beschreibung der Versuchsanlage .....	5
2.4 Untersuchte Arten .....	7
2.4.1. <i>Ephemera danica</i> .....	7
2.4.2 <i>Leuctra geniculata</i> .....	7
2.4.3 <i>Hydropsyche incognita</i> .....	7
2.5 Experimentelle Durchführung .....	8
2.6 Erhebung der Mortalitätsraten .....	9
2.7 Messung und Analyse der Verhaltensdaten .....	9
2.8 Biomarkeranalysen .....	9
2.9 Wasseranalysen und Auswahl relevanter Mikroschadstoffe .....	11
2.11 Statistische Analysen .....	11
2.11.1 Treatment-unabhängige Analysen .....	13
2.11.2 Treatment-abhängige Analysen .....	15
3. Projektergebnisse .....	16
3.1 Treatment-unabhängige Analysen .....	16
3.1.1 Einflüsse der Mikroschadstoffe auf die Gesamtaktivität .....	16
3.1.2 Einflüsse der Mikroschadstoffe auf die Biomarkergehalte .....	18
3.2 Treatment-abhängige Analysen .....	19
3.2.1 Reinigungsleistung der Ozonierung .....	19
3.2.2 Stoffkonzentrationen .....	20
3.2.3 Mortalitätsraten .....	22
3.2.4 Gesamtaktivität der Organismen .....	22
3.2.5 Biomarker .....	24
4. Diskussion .....	26
4.5 Treatment-unabhängige Analysen: Reaktionen auf bestimmte Mikroschadstoffklassen .....	26

4.1 Treatment-abhängige Analysen: Reinigungsleistung der Ozonierung.....	26
4.2 Chronische Endpunkte und Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen.....	27
4.3 Akute Effekte von konventionell behandeltem und ozoniertem Abwasser.....	28
4.4 Auswirkungen einer Ozonierung auf den ökologischen Zustand.....	29
4.6 Mikroschadstoffquellen und Schlussfolgerungen für das Management .....	30
5. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge .....	31
5.1 Öffentlichkeitsarbeit .....	31
5.2 Veröffentlichungen .....	31
5.3 Vorträge.....	32
6. Fazit/Ausblick .....	33
Literatur.....	34
Anhang.....	37

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Luftbild der Kläranlage Schwerte	5
Abb. 2: Aufbau der Versuchsanlage von oben betrachtet, Versuche der Jahre 2019 und 2020 mit verdünntem Abwasser (ein Teil Abwasser, zwei Teile Ruhrwasser)	6
Abb. 3: Probenahme- und Expositionsverfahren im Fließrinnenversuch	8
Abb. 4: Übersicht über die Erhebung, Analyse und Darstellung der erhobenen Daten	12
Abb. 5: Regressionskoeffizienten von 50 Mikroschadstoffen im PLS-Regressionsmodell zur Aktivität (1 Hz) von <i>H. incognita</i> mit zwei Komponenten. (Erklärung der Mikroschadstoff-Abkürzungen im Anhang 3). Das Modell erklärt 75% der Variabilität in den Mikroschadstoffdaten und 53% der Variabilität der Antwortvariablen. Die deutlichen Unterschiede der Ausschläge eines Modells mit einer und eines Modells mit zwei Komponente(n) deuten auf eine sehr viel höhere Erklärungsstärke der zweiten Komponente hin. Zu erkennen ist eine Häufung hoher Ausschläge im Bereich der Industrie- (IN_) und Pflanzenschutzmittel (AG_) rechts.	16
Abb. 6: TOP 10 einflussstärkste Mikroschadstoffe im PLS-Regressionsmodell zur Aktivität (1 Hz) von <i>H. incognita</i> (vgl. Abbildung 4). Positiv mit der Aktivität korrelierte Koeffizienten sind in A, negativ korrelierte Koeffizienten in B dargestellt. Sieben d der zehn dargestellten Mikroschadstoffe gehören zur Gruppe der Industrie- (IN_) und Pflanzenschutzmittel (AG_).	17
Abb. 7: Reinigungsleistungen (%) der zusätzlichen Ozonierung im Vergleich zum konventionell behandelten Abwasser, basierend auf den Messdaten aus dem Jahr 2018, erhoben mit unverdünntem Abwasser. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.	19
Abb. 8: Konzentrationen der Stoffauswahl pharmazeutischer Mikroschadstoffe, sortiert nach sechs Stoffklassen in den drei Versuchswässern, aufgeteilt in die Versuche von 2019 (A) und 2020 (B). Dargestellt sind die Daten in Box-Whisker Plots, wobei 50% der Daten innerhalb der Box liegen (oberes Ende: 25% Perzentil, unteres Ende: 75% Perzentil), der Median mit einem Strich eingezeichnet ist und die minimalen und maximalen Ausreißer als Whisker dargestellt sind.	20
Abb. 9: Konzentrationen der Stoffauswahl nicht-pharmazeutischer Mikroschadstoffe, sortiert nach zwei Stoffklassen in den drei Versuchswässern, aufgeteilt in die Versuche von 2019 (A) und 2020 (B). Dargestellt sind die Daten in Box-Whisker Plots, wobei 50% der Daten innerhalb	

der Box liegen (oberes Ende: 25% Perzentil, unteres Ende: 75% Perzentil), der Median mit einem Strich eingezeichnet ist und die minimalen und maximalen Ausreißer als Whisker dargestellt sind. 21

Abb. 10: Überlebens- bzw. Mortalitätsraten der drei exponierten EPT-Taxa *E. danica*, *L. geniculata* und *H. incognita*, getrennt dargestellt für die Versuchsjahre 2019 und 2020. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Die Zahlen in den Säulen beziehen sich auf die absolute Anzahl der Organismen pro Versuchsjahr, Art und Treatment. Individuen, die am Ende des jeweiligen Versuchs nicht wiedergefunden werden konnten, wurden nicht in die Darstellung einbezogen. 22

Abb. 11: Gesamtaktivität von *H. incognita* und *L. geniculata* in den Versuchen (gekennzeichnet mit dem Kürzel „V“ und der Nummer des Versuchs) der Jahre 2019 und 2020. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der Gesamtaktivität der überlebenden Tiere über den gesamten Versuchszeitraum. RW = Ruhrwasser, CW = konventionell behandeltes Abwasser, OW = zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis der One-way ANOVA mit Tukey's post hoc-Test sind mit \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$  bzw. \*\*\*:  $p \leq 0,001$  gekennzeichnet. 23

Abb. 12: Ergebnisse von *E. danica* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis des Kruskal Wallis-Tests mit Dunn's post hoc-Test sind mit \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$  bzw. \*\*\*:  $p \leq 0,001$  gekennzeichnet. 24

Abb. 13: Ergebnisse von *L. geniculata* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Aufgrund der geringen Biomasse von *L. geniculata* konnten lediglich drei Biomarker gemessen werden. Die Daten wurden mittels des Kruskal Wallis-Tests auf Signifikanz getestet. 25

Abb. 14: Ergebnisse von *H. incognita* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis des Kruskal Wallis-Tests mit Dunn's post hoc-Test sind mit \*:  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet. 25

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die sieben analysierten Biomarker und deren Funktionen als Marker 10

Tab. 2: Übersicht der ausgewerteten Versuche und Antwortvariablen mit Angaben zur zeitlichen Auflösung der Messungen (zur Beschreibung der individuellen Versuche vgl. Anhang 1). 13

Tab. 3: Übersicht der untersuchten Mikroschadstoffklassen (für die Zuordnung von 50 Mikroschadstoffen zu den Klassen siehe Anhang 3). 14

Tab. 4: Zusammenfassung der PLS-Regressionsmodelle zum Einfluss der Mikroschadstoffe auf die Aktivität (1 Hz) von *L. geniculata* und *H. incognita*. 17

Tab. 5: Zusammenfassung der PLS-Regressionsmodelle zum Einfluss der Mikroschadstoffe auf die Biomarkergehalte von *L. geniculata* und *H. incognita*. Die Gesamtanzahl der TOP 10 Ergebnisse pro Mikroschadstoffklasse über alle Modelle ist in der letzten Spalte (fett) aufgeführt. CAT: Katalase, GST: Glutathion-S-Transferase, ACHE: Acetylcholin-Esterase, GLY: Glycogengehalt, LIP: Lipidgehalt, LPO: Lipid-Peroxidase 18

## Abkürzungsverzeichnis

WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
EPT-Taxa	Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera
MFB	Multispecies Freshwater Biomonitor
MZB	Makrozoobenthos
RW	Ruhrwasser
CW	Konventionell behandeltes Abwasser
OW	Zusätzlich ozoniertes Abwasser
ANOVA	Analysis of Variance
PLSR	Partial Least Squares Regression
SD	Standardabweichung/Standard deviation
AN	Antibiotika
AG	Agrarchemikalien/Pflanzenschutzmittel
BE	Betablocker
IN	Industriechemikalien
OT	Other Pharmaceuticals/Andere Pharmazeutika
PA	Schmerzmittel/Pain medication
PS	Psychopharmaka
XR	Röntgenkontrastmittel/X-ray Contrast Media
ACHE	Acetylcholin-Esterase
BCA	Gesamtproteingehalt
CAT	Katalase/Catalase
GST	Glutathion-S-Transferase
GLY	Glycogengehalt
LIP	Lipidgehalt
LPO	Lipid-Peroxidase
LOD	Level of detection

## Kurzfassung des Berichtes

Im November 2017 startete das von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderte Projekt „Effekte von Mikroschadstoffen auf Makrozoobenthosorganismen“ als Kooperationsprojekt zwischen der Universität Duisburg-Essen, dem Ruhrverband (Essen) und der Firma LimCo International GmbH (Konstanz). Im Fokus dieses Projektes standen die Auswirkungen von noch in gereinigtem Abwasser enthaltenen Mikroschadstoffen auf aquatische Wirbellose. Um den Erfolg einer zusätzlichen, auf Mikroschadstoffe abzielenden Abwasserreinigung zu untersuchen, wurden die Auswirkungen einer vierten Reinigungsstufe in Form einer Ozonierung im Rezirkulationsbetrieb untersucht, um so abzuschätzen, inwieweit damit der Gewässerzustand nach Wasserrahmenrichtlinie im abwasseraufnehmenden Gewässer verbessert werden kann. Dazu wurden konventionell behandeltes Abwasser, zusätzlich ozoniertes Abwasser und Ruhrwasser (als Umweltreferenz) in Fließrinnenversuchen hinsichtlich ihrer Wirkung auf physiologische und ethologische Parameter bei ausgewählten Wirbellosenarten untersucht. Im Jahr 2018 erfolgten zunächst die Erstellung und anschließend die Etablierung einer Versuchsanlage mit unverdünntem Abwasser auf der Kläranlage Schwerte. In den Jahren 2019 und 2020 fanden Versuche mit verdünntem Abwasser statt, um die Versuchsbedingungen den tatsächlich im Fließgewässer vorzufindenden Bedingungen anzugleichen.

Nachfolgend werden ausschließlich die Ergebnisse auf Basis der Versuche mit verdünntem Abwasser (2019 und 2020) dargestellt und diskutiert. Um die Reaktionen der Versuchsorganismen auf konventionell gereinigtes und zusätzlich ozoniertes Abwasser zu untersuchen, wurden drei biologische Antwortvariablen erhoben und ausgewertet: Mortalität (bzw. Überleben), Bewegungsverhalten und physiologische Reaktionen (Biomarker).

Weder zusätzlich ozoniertes- noch rein konventionell behandeltes Abwasser zeigte über den gesamten Versuchszeitraum akut toxische Effekte auf das Überleben der drei untersuchten Wirbellosenarten (Kapitel 3.2.3). Im Gegensatz dazu legen sowohl die physiologischen Antworten als auch die Verhaltensreaktionen der Organismen chronische Effekte nahe (Kapitel 3.1, Treatment-unabhängige Analysen). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die biologischen Endpunkte „Verhalten“ und „Biomarker“ von einzelnen Schadstoffklassen besonders deutlich beeinflusst wurden und beide biologischen Antworten zudem miteinander in Beziehung stehen.

Unter vergleichbaren Sauerstoffbedingungen in den Versuchswässern waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verhaltensreaktion im zusätzlich ozonierten Abwasser und im Ruhrwasser feststellbar, während die Reaktion der Tiere im konventionell behandelten Abwasser signifikante Unterschiede zeigte. Die physiologische Reaktion zeigte nur bei einem Biomarker und auch nur für eine Wirbellosenart einen signifikanten Unterschied zwischen zusätzlich ozoniertem und konventionell behandeltem Abwasser.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts legen nahe, dass die Verhaltensreaktionen der Organismen in vielen Fällen deutlicher ausgeprägt waren als ihre Biomarkerreaktionen. Hinsichtlich der Versuchswässer zeigten nur die Tiere im konventionellen Abwasser signifikant unterschiedliche Reaktionen von denen im zusätzlich ozonierten Abwasser und im Ruhrwasser. Jedoch zeigte sich, dass auch das als Umweltreferenz verwendete Ruhrwasser nennenswert mit Mikroschadstoffen belastet war, deren Ursprung sowohl auf im Einzugsgebiet oberhalb gelegene Punktquellen (z. B. weitere Kläranlagen) als auch diffuse Quellen (z. B. Landwirtschaft) zurückzuführen ist.

Im Hinblick auf die Abwasserbehandlung legen die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts nahe, dass die Sauerstoffkonzentration in den Abwässern zum Teil sehr stark reduziert war, was mutmaßlich auf einen hohen biologischen Sauerstoffbedarf im behandelten Abwasser zurückzuführen ist. Insbesondere im zusätzlich ozonbehandelten Abwasser waren die Sauerstoffbedingungen für die wirbellosen Organismen pessimal und lagen zum Teil deutlich unter der Umweltqualitätsnorm. Gleichzeitig zeigten die Organismen unter diesen Bedingungen eine signifikant erhöhte Gesamtaktivität und signifikante Veränderungen bei zwei Biomarkern. Somit sollte im Hinblick auf eine Abwasserozonierung auch der potenziell negative Effekt auf die Sauerstoffbedingungen im Gewässer ausdrücklich mitberücksichtigt werden.

Bei der von den Versuchswässern losgelösten Betrachtung der biologischen Endpunkte zeigte sich, dass viele der für die Reaktionen der Organismen verantwortlichen Mikroschadstoffe den Schadstoffklassen Pflanzenschutzmittel und Industriechemikalien zuzuordnen sind. Gerade bei den Pflanzenschutzmitteln kommen diffuse (flächenhafte) Einträge über landwirtschaftliche Flächen im gesamten Einzugsgebiet eines Fließgewässers als Eintragspfade in Betracht. Mit einer zusätzlichen Abwasserbehandlung über Kläranlagen sind diese Einträge nicht zu fassen und insbesondere nicht zu reduzieren.

In der Zusammenschau legen die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts nahe, dass die zusätzliche Abwasserbehandlung in Form einer Ozonierung zwar effektiv ist und im Gegensatz zum konventionell behandelten Abwasser keine chronischen negativen Auswirkungen auf die Makroinvertebraten hat, sofern die Sauerstoffbedingungen die Umweltqualitätsnorm von 7 mg/L nicht unterschreiten. Um dadurch jedoch positive biologische Effekte auch im Fließgewässerabschnitt unterhalb einer Kläranlage zu erzielen, sind – abhängig von der Gewässergröße und des Klarwasseranteils – flankierende Maßnahmen zur Reduktion der diffusen Einträge von Pflanzenschutzmitteln im Einzugsgebiet notwendig.

## **1. Einführung/Motivation**

Durch verbesserte Analysetechnik kann inzwischen eine Vielzahl von Mikroschadstoffen (z. B. Industriechemikalien, Pharmazeutika, Personal-Care-Produkte) in Gewässern nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer meist sehr niedrigen Konzentrationen im Bereich von ng/L bis pg/L lange Zeit nicht quantifizierbar waren. Eine Überschreitung der als Umweltqualitätsnorm für die „flussgebietsspezifischen Schadstoffe“ (Oberflächengewässerverordnung, Anlage 6) festgelegten Konzentrationen wird als mitursächlich für eine Schädigung von aquatischen Organismen angesehen, weshalb der Bau einer zusätzlichen, vierten Reinigungsstufe für viele Kläranlagen diskutiert bzw. gefordert wird. Die zusätzliche Abwasserbehandlung erfolgt dann z. B. über den Rückhalt von Mikroschadstoffen mittels Aktivkohlefilter oder den chemischen Abbau der Schadstoffe mittels Ozonierung (Stalter et al., 2010).

Um den Effekt einer Ozonierung auf Gewässerorganismen abzuschätzen, wurden im vorliegenden Forschungsprojekt unterschiedliche Antwortvariablen (Mortalität, Verhalten, Biomarker) des Makrozoobenthos untersucht. Über die Betrachtung von Makrozoobenthosorganismen im Vergleich mit einer Umweltreferenz (Flusswasser) wurden zwei wesentliche Fragestellungen bearbeitet:

- i) Wie wirken sich Mikroschadstoffe auf den ökologischen Gewässerzustand nach EG-WRRL aus?
- ii) Wirkt sich die zusätzliche Abwasserbehandlung mit Ozon positiv auf die untersuchten Organismen aus?

Zur Beantwortung der Fragen wurden Versuche mit Makrozoobenthosorganismen in Fließrinnen mit unterschiedlichen Versuchswässern (konventionell gereinigtes Abwasser, zusätzlich ozoniertes Abwasser, Flusswasser aus der Ruhr) durchgeführt. Die Fließrinnenversuche liefen zwischen April 2018 und August 2020 auf einer vom Ruhrverband betriebenen Kläranlage in Schwerte (Nordrhein-Westfalen).

Die Motivation des Projektes war, aus diesen Untersuchungen praktische Schlussfolgerungen für die Bewirtschaftung von Oberflächengewässern ableiten zu können und abzuschätzen, inwiefern sich die Ozonierung als vierte Reinigungsstufe im Vergleich zum konventionellen Abwasserreinigungsverfahren dazu eignet, den Gewässerzustand nach Wasserrahmenrichtlinie zu verbessern.

## **2. Methodik/Vorgehensweise/Projekttablauf**

### **2.1 Projekttablauf**

Während des Projektes wurden drei Versuchsphasen durchgeführt: Die ersten sieben Versuche des Jahres 2018 dienten zunächst einer ersten Einschätzung der Toxizität sowie der Etablierung des Testsystems und wurden deswegen mit unverdünntem Abwasser durchgeführt. Die weiteren 18 Versuche der Jahre 2019 und 2020 erfolgten mit verdünntem Abwasser, d.h. das Abwasser (konventionell und gereinigt) wurde im Verhältnis 1:2 mit Wasser der Ruhr gemischt. Dabei wurde der Grad der Verdünnung so gewählt, dass mit Blick auf eine Abwassereinleitung in ein Gewässer eine Extremsituation gegeben war, die Niedrigwasserhältnissen mit einem hohen Abwasseranteil entsprechen sollte.

Jede großtechnische Versuchsdurchführung unter Freilandbedingungen ist Verhältnissen und Entwicklungen ausgesetzt, die unvorhergesehen eintreten können und dadurch den Versuchsbetrieb beeinträchtigen. Dies kann den Ausfall von notwendigen technischen Aggregaten wie Motoren, Pumpen, Probenehmer oder digitale Aufzeichnungs- und Speichermedien betreffen oder auch mit schwierigen meteorologischen und hydrologischen Umfeldbedingungen zusammenhängen. Diesen unvermeidbaren Rahmenbedingungen waren auch die insgesamt 23 Versuche auf der Kläranlage Schwerte unterworfen, die über den gesamten Projektzeitraum durchgeführt wurden. Die in den Jahren 2018 bis 2020 herrschenden allgemeinen Witterungsbedingungen kamen dem gesamten Projekt grundsätzlich zugute. Die gerade in den Sommerhalbjahren gegebenen und fast kontinuierlich andauernden Trockenwetterphasen sorgten für eine quasi gleichbleibende, nicht von Regenwetterereignissen beeinträchtigte Qualität sowohl des der Kläranlage zufließenden Abwassers als auch des in der Ruhr abfließenden Wassers.

Die Projektauswertung erfolgte nach der im Projektplan zunächst nicht vorgesehenen dritten Versuchslaufzeit im Jahr 2020 und war durch die zeitweise starken Einschränkungen durch die COVID-19 Pandemie verzögert. Biomarkerproben konnten über mehrere Monate nicht analysiert werden, da die Labore zeitweise geschlossen werden mussten und es zu Lieferungsverzögerungen von Labormaterialien kam. Die Durchführung der Versuche musste



zeitlich in den Sommer verschoben werden und erfolgte unter strengen Sicherheitsauflagen und dem Einsatz eines verkleinerten Teams von Kläranlagenmitarbeitern, wodurch die tägliche Kontrolle der Versuchsanlage nicht immer durchgeführt werden konnte und es vermehrt zu Störungen kam, so dass ganze Versuchsreihen nicht ausgewertet werden konnten (siehe Anhang 1).

Unter Berücksichtigung der vorgenannten Ausführungen war es dennoch möglich, fünf Datensätze für eine Auswertung der Einflüsse von Mikroschadstoffeinträgen auf Makrozoobenthosorganismen in Gewässern zu nutzen und daraus Erkenntnisse abzuleiten, die im Folgenden in aggregierter Form dargestellt sind. Die Verlängerung der Projektzeit ermöglichte zudem weitere Analysen der Daten mittels eines Regressionsmodells.

## 2.2 Kläranlage Schwerte

Die kommunale Kläranlage in Schwerte hat eine Ausbaugröße von 50.000 Einwohnerwerten und ist im biologischen Teil zweistraßig aufgebaut (Abb. 1). Neben der konventionellen Abwasserreinigung besteht auf der Kläranlage Schwerte die Möglichkeit, im Rezirkulationsbetrieb das Abwasser der zweiten Straße experimentell mit Ozon zu behandeln. Die oxidative Behandlung kann in bis zu sechs Reaktoren mit jeweils einem Volumen von 32 m<sup>3</sup> erfolgen, von denen jeweils drei mit Diffusoren ausgestattet sind. Für die Versuche wurde ein Reaktor für die Ozonierung genutzt, wobei das Ozon im Wasser im Anschluss in einem weiteren Reaktor ausgasen konnte. Das Abwasser wurde aus dem Nachklärbecken 2 in den Ozonreaktor gepumpt, dort behandelt und anschließend wieder zurück in das Belebungsbecken 2 geleitet (Abb. 1). Dies wurde dynamisch je nach Zuflussverhältnissen angepasst, sodass bei Trockenwetterbedingungen, wenn entsprechend höhere stoffliche Belastungen zu erwarten waren, ein hohes Rezirkulationsverhältnis für eine möglichst weitreichende Ozonbehandlung sorgte, während bei höherem Zufluss das Rezirkulationsverhältnis herunterreguliert werden konnte, da die erwarteten Stoffkonzentrationen entsprechend geringer waren.



Abb. 1: Luftbild der Kläranlage Schwerte

## 2.3 Beschreibung der Versuchsanlage

Das Wasser für die Versuche wurde mit einer Durchflussmenge von jeweils 1 L/s aus den beiden Nachklärungen sowie aus der Ruhr entnommen und in drei 1000 L-Tanks zwischengespeichert (Abb. 2). Somit konnte auf der Versuchsanlage mit konventionell behandeltem Abwasser, zusätzlich ozoniertem Abwasser und Ruhrwasser (Umweltreferenz) parallel gearbeitet werden. Durchflussbedingt lag die rechnerische Aufenthaltszeit des

Wassers in den Tanks bei 16 Minuten, sodass einer Erhitzung des Wassers durch Sonneneinstrahlung weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Sauerstoffgehalt und Wassertemperatur wurden mittels automatischer Sonden in Echtzeit aufgezeichnet.

Die Beschickung der eigentlichen Versuchsanlage konnte im Freigefälle ohne zusätzliche Pumpen erfolgen. Über Schläuche wurden die drei Versuchswässer zunächst in Mischbehälter aus Plexiglas mit 10 L Fassungsvermögen geleitet, in denen die Verdünnung (und im Versuchsjahr 2020 die Belüftung) des Versuchswassers erfolgte. Zudem waren die Zuläufe zu den Mischbehältern mit Nylonnetzen ausgestattet, um einen Eintrag von Organismen (z.B. *Tubifex* sp., Chironomidae) in die Versuchsanlage zu verhindern. Das Wasser wurde in sechs Fließrinnen aus Plexiglas mit jeweils 110 L Fassungsvermögen geleitet und dort mittels Schaufelrädern bewegt, um eine laminare Strömung mit einer Geschwindigkeit von 0,1 m/s zu erzeugen. Die Schaufelräder wurden über eine gemeinsame Kurbelwelle von einem Motor angetrieben (Abb. 2) und das Wasser wurde im Kreis zirkuliert. Über Zu- und Abläufe erfolgte ein kontinuierlicher Wasserwechsel, wobei die mittlere Aufenthaltszeit des Wassers 12 Stunden betrug.

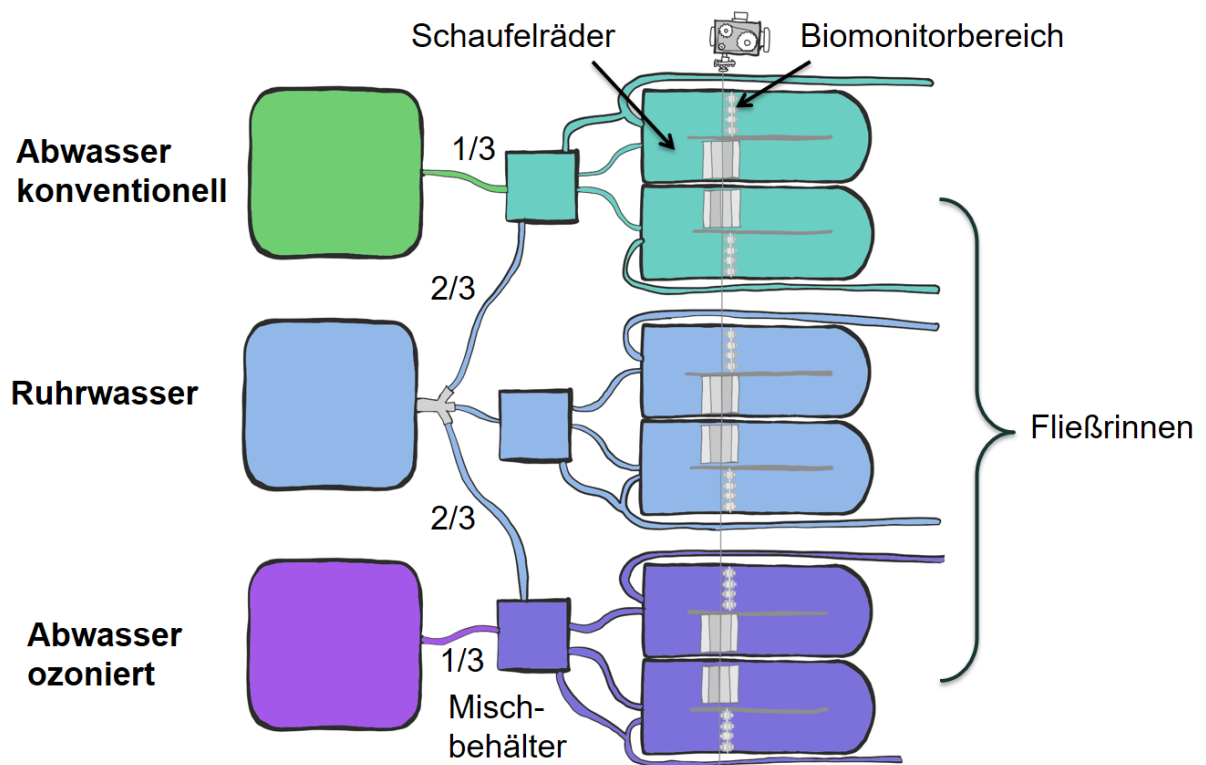


Abb. 2: Aufbau der Versuchsanlage von oben betrachtet, Versuche der Jahre 2019 und 2020 mit verdünntem Abwasser (ein Teil Abwasser, zwei Teile Ruhrwasser)

In jede Rinne wurde ein aus jeweils acht Messkammern bestehender Biomonitor eingesetzt, so dass die Messkammern laminar durchströmt wurden. In jeder Messkammer befand sich ein Individuum, dessen Bewegung über einen Zeitraum von max. 14 Tagen aufgezeichnet wurde. Die Messung der Bewegungsaktivität erfolgte mittels Sensoren, die ein elektrisches Feld erzeugten und Spannungsänderungen detektierten.

Alle mit dem Versuchswasser in Kontakt stehenden Materialien wurden mit dem Ziel ausgewählt, das Risiko einer Kontamination des Versuchswassers über Lösungsprodukte (z.B. Weichmacher) oder Korrosion (z.B. Eisenoxid, Kupferoxid) zu minimieren. Es kamen u.

a. lebensmittelechte Silikonschläuche und Trinkwasserrohre sowie Edelstahlbauteile zum Einsatz. Die 1000 L-Tanks wurden zwei Wochen vor Inbetriebnahme gewässert und mehrfach durchgespült.

Das konventionell behandelte und das zusätzlich ozonierte Abwasser wurden in den Versuchen der Jahre 2019 und 2020 verdünnt (ein Teil Abwasser, zwei Teile Ruhrwasser), um die Versuchsbedingungen realistischeren Verhältnissen im Gewässer anzunähern. Dennoch entspricht dieser Verdünnungsfaktor an der entsprechenden Klarwassereinleitungsstelle in die Ruhr Extrembedingungen bei niedriger Wasserführung, um das Risiko für Fließgewässerorganismen unter „worst-case Bedingungen“ abschätzen zu können (Abb. 2).

## 2.4 Untersuchte Arten

Als Tierarten für die Versuche wurden je eine Art aus den Insektenordnungen Ephemeroptera ( Eintagsfliegen), Plecoptera (Steinfliegen) und Trichoptera (Köcherfliegen) stellvertretend für das Makrozoobenthos ausgewählt. Die drei Ordnungen werden auch als EPT-Taxa zusammengefasst und gehören zu den vergleichsweise sensitiven Organismen mit hohen Ansprüchen an die Wasserqualität. EPT-Taxa sind bewertungsrelevant im Sinne der Gewässerbewertung nach EG-WRRL und nehmen einen zentralen Stellenwert im deutschen Bewertungssystem PERLODES ein (Meier et al., 2006).

### 2.4.1. *Ephemera danica*

*Ephemera danica* gehört zur Ordnung Ephemeroptera und ist sowohl im Mittelgebirge als auch im Tiefland Deutschlands weit verbreitet. Ihre Lebensdauer beträgt bis zu drei Jahre, wobei der überwiegende Teil davon als aquatische Larve verbracht wird. Die Larven leben mithilfe modifizierter Mundwerkzeuge grabend im Substrat der Gewässersohle (Hynes 1970, Elliott et al., 1988) und ernähren sich vorwiegend von Detritus (Elliott et al., 1988, Ladle & Radke 1990, López-Rodríguez et al., 2009). Die Bestimmung der Art erfolgte nach Eiseler 2005, wobei eine Verwechslung mit der Schwesterart *E. vulgata* auch aufgrund der unterschiedlichen Lebensraumsprüche ausgeschlossen werden konnte.

### 2.4.2 *Leuctra geniculata*

*Leuctra geniculata* gehört zur Ordnung Plecoptera und hat einen einjährigen Lebenszyklus. Die Larven leben in grobmaterialreichen und kiesigen Gewässern im Tiefland und im Mittelgebirge Deutschlands und benötigen kühles, sauerstoffreiches Wasser. *L. geniculata* ist an dem flachen, breiten Mentum sowie an Auswüchsen an den Antennen zu erkennen, mithilfe derer sie sich durch das Substrat gräbt und anhand derer sie gut von weiteren Arten der Gattung zu unterscheiden ist (Eiseler, 2010).

### 2.4.3 *Hydropsyche incognita*

*Hydropsyche incognita* gehört zur Ordnung Trichoptera. Als Vertreter der Familie Hydropsychidae durchläuft die Art einen einjährigen Lebenszyklus., wobei die Larven zwischen Juni und Juli schlüpfen, mehrere aquatische Larvenstadien durchlaufen und sich im Sommer des Folgejahres verpuppen und zum adulten Tier heranwachsen (Waringer & Graf, 2011). *H. incognita* lebt als Larve in Fließgewässern und tritt im Frühjahr und Sommer in großer Zahl auf moosbewachsenen Steinflächen auf (Sattler, 1958, Pitsch, 1993). Die Nahrungsaufnahme erfolgt über das Abweiden von Fangnetzen, welche die Art in schnell fließendem Wasser spinnt (Wallace & Malas 1976, Sattler, 1958, Wallace, 1975). Im Gegensatz zu den meisten anderen Familien innerhalb der Trichoptera leben Hydropsychidae nicht in Köchern, sondern weisen eine längliche Körperform mit nach vorne gestrecktem Kopf auf (Holzenthal et al., 2007). Diese Lebensweise ist für Verhaltensmessungen deshalb

relevant, da Kiemenbewegungen und andere Bewegungen nicht durch einen Köcher verdeckt werden.

## 2.5 Experimentelle Durchführung

Alle Versuchsorganismen wurden an zwei Probestellen (Schwerte: N°51.432481; E°7.567460, Arnsberg: N°51.440037; E°7.964420; siehe Abb. 3) aus der Ruhr entnommen, an denen sie in einer hohen Dichte vorkamen. Die Entnahme der Individuen erfolgte mittels Kicksampling (Meier et al., 2006) mit einem Handnetz (Rahmen: 25 x 25 cm, Maschenweite: 0.5 mm; Abb. 3).

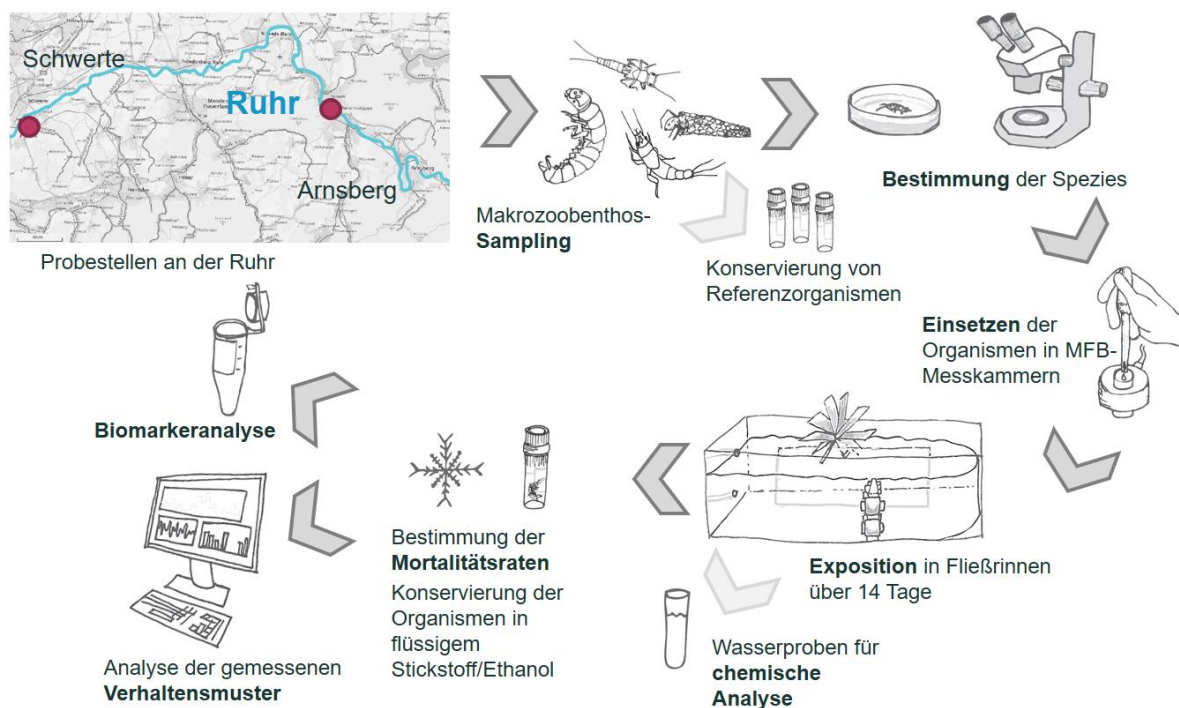


Abb. 3: Probenahme- und Expositionsverfahren im Fließrinnenversuch

Die Bestimmung der Tiere erfolgte unter einem Binokular, um eine sichere Zuordnung der Individuen zu den drei Arten sicherzustellen. Zudem wurden jeweils Referenzorganismen in 96%igem Ethanol konserviert und im Labor nachbestimmt. Die frisch gefangenen Individuen wurden mithilfe einer Pipette in die Messkammern eingesetzt, diese dann in die vom Versuchswasser durchströmten Fließrinnen eingespannt und über bis zu 14 Tage exponiert. Während der Expositionszeit wurde die Aktivität der Versuchstiere mithilfe von Biomonitoren gemessen und aufgezeichnet. Beide Seiten der Kammer waren mit Netzen (Maschenweite: 63  $\mu$ m) verschlossen, um ein Entkommen der Tiere zu verhindern. Die vorwiegend Sedimentlebenden Arten *E. danica* und *L. geniculata* wurden für die Versuche in den Jahren 2019 und 2020 mit Sediment in den Kammern gehalten. Dazu wurde jeweils ein halber Teelöffel vorgesiebtetes Sediment aus der Ruhr (Arnsberg) mit Korngrößen zwischen 2 mm und 63  $\mu$ m in die Kammern gegeben. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Organismen entnommen, überlebende Versuchstiere zum Transport in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die anschließende Biomarkeranalyse im Labor bei -80°C gelagert. Eine Übersicht über die Erhebung, Analyse und Darstellung der Daten der chemischen Analytik, Mortalitätsraten, Biomarker und Gesamtaktivität ist in Abb. 4 dargestellt.

## 2.6 Erhebung der Mortalitätsraten

Jeder Versuch begann mit der Exposition von acht Individuen pro Wassertyp. Das Überleben wurde am Ende jedes Versuchs anhand der Gesamtzahl der vorhandenen Individuen pro Wassertyp abzüglich der toten Tiere berechnet. Zum Ende einiger Versuche waren einzelne Tiere nicht mehr in den Messkammern auffindbar und somit war eine Mortalität dann nicht berechenbar. Die fehlenden Tiere könnten auch aus der Messkammer entkommen oder nach dem Tode bereits mikrobiell abgebaut worden sein und sind in die Berechnung der Mortalität nicht mit einbezogen. Die Ergebnisse wurden für die erfolgreichen Versuche aus den Jahren 2019 und 2020 getrennt berechnet und dargestellt.

## 2.7 Messung und Analyse der Verhaltensdaten

Zur Messung der Aktivität der Versuchstiere wurde der von der LimCo International GmbH (Konstanz, Deutschland) entwickelte Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) verwendet (Gerhardt et al., 1994, 1998c). Der Biomonitor besteht aus jeweils acht zylindrischen Durchfluss-Messkammern (6 cm lang, 2 cm Durchmesser). Jede Messkammer wird mit einem zu untersuchenden Individuum bestückt, so dass es sich frei darin bewegen kann. Über die bewegungsbedingte Änderung eines hochfrequenten elektrischen Wechselstrom-Feldes in der Messkammer kann die Aktivität der Individuen quantitativ gemessen und aufgezeichnet werden. Einflüsse des elektrischen Feldes auf Invertebraten konnten bereits durch frühere Studien ausgeschlossen werden (Kirkpatrick et al., 2006).

Ein Messintervall betrug jeweils zehn Minuten und bestand aus einer Messphase (vier Minuten) und einer Ruhephase (sechs Minuten). Je Messphase wurden 5.000 Einzelmessungen durchgeführt, so dass dadurch eine zeitlich hoch aufgelöste Analyse der Aktivität des Testorganismus ermöglicht wurde. Zudem war es durch die hochfrequente Messung möglich, die Bewegungsaktivität mittels Fast-Fourier-Transformation in ihre einzelnen Frequenzbestandteile (0,5 bis 8,5 Hz) zu unterteilen (Gerhardt et al., 1994, 1998c, 2020).

Für die nachfolgenden Analysen wurde 1 Hz als Marker für die Gesamtaktivität gewählt. Die Auswahl beruht auf einer umfangreichen Kalibrierung der Daten unter gleichzeitiger Verwendung von Videoaufnahmen. Die erhobenen Messwerte des jeweiligen Versuchstages wurden anschließend für alle 24 Stunden und jedes Individuum, das die 14-tägige Exposition überlebte, mit Hilfe von R Studio (Version 1.3.95.9) aufsummiert. Um einen Vergleich der Verhaltensänderungen während des Versuchszeitraums zu ermöglichen, wurden die Daten als Mittelwerte über 24 Stunden aggregiert, was eine tägliche Auflösung der Verhaltensdaten ermöglichte.

Die Gesamtaktivität wurde bei *E. danica*, für einen Versuch ausgewertet, bei *L. geniculata* für vier Versuche und bei *H. incognita* für fünf Versuche. Die Versuche V8 bis V12 fanden im Jahr 2019 ohne zusätzliche Luftzufuhr statt, Versuche V19 und V20 hingegen mit zusätzlicher Luftzufuhr in die Mischbehälter im Jahr 2020.

## 2.8 Biomarkeranalysen

Insgesamt wurden sechs Biomarker und der Gesamtproteingehalt als Maße für die physiologische Wirkung auf die Versuchstiere ermittelt und analysiert. Die Indikatorfunktionen der Biomarker sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die detaillierte Beschreibung der Analyseverfahren für die Biomarker befindet sich in Anhang 2.

Tab. 1: Übersicht über die sieben analysierten Biomarker und deren Funktionen als Marker

Biomarker	Funktion	Einheit	Verwendete Arten
Gesamtproteingehalt (BCA)	Bezugsgröße für die enzymatische Aktivität, da die Masse / Aktivität eines Biomarkers immer auf die eingesetzte Proteinmasse bezogen wird	µg	<i>E. danica</i> , <i>L. geniculata</i> , <i>H. incognita</i>
Catalase (CAT)	Enzym der Entgiftung, Teil der Abbaukette freier Radikale (Hyperoxide), bei der zunächst H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durch die Superoxid-Dismutase (SOD) entsteht, welches von der Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgebaut wird	U Cat/µg Protein	<i>E. danica</i> , <i>L. geniculata</i> , <i>H. incognita</i>
Glutathion-S-Transferase (GST)	Enzym der Entgiftung carcinogener, mutagener, toxischer Alkylierungsmittel, einiger Pharmazeutika und weiterer Xenobiota	U GST/mg Protein	<i>E. danica</i> , <i>L. geniculata</i> , <i>H. incognita</i>
Acetylcholin-Esterase (AChE)	Marker für Neurotoxizität, sensitiv für Organophosphate und einige Pflanzenschutzmittel	U AChE/mg Protein	<i>E. danica</i> , <i>L. geniculata</i> , <i>H. incognita</i>
Glykogen	Ernährung und Energiereserven	µg Glykogen/ µg Protein	<i>E. danica</i> , <i>H. incognita</i>
Lipid	Ernährung und Energiereserven	µg Lipid/ µg Protein	<i>E. danica</i> , <i>H. incognita</i>
Lipid-Peroxidation	Marker für oxidativen Stress (oxidative Degradation von Lipiden)	nmol MDA conjugate/mg Protein	<i>E. danica</i> , <i>H. incognita</i>

## 2.9 Wasseranalysen und Auswahl relevanter Mikroschadstoffe

Am Ablauf der Anlage waren Probennehmer installiert, die über 24 Stunden Wasserproben für die chemische Analytik entnahmen. Aus jeder Wasserprobe wurden vom Kooperationslabor Ruhrverband/EGLV nach den jeweiligen DIN-Verfahren rund 200 Stoffe analysiert. Neben grundlegenden Wasserparametern wie pH-Wert, Leitfähigkeit, chemischem Sauerstoffbedarf, einigen Nährstoffen sowie Metallen wurden 188 Mikroschadstoffe aus insgesamt acht Stoffklassen untersucht: Antibiotika, Schmerzmittel, Psychopharmaka, Röntgenkontrastmittel, Beta-Blocker, andere Pharmazeutika, Industriechemikalien und landwirtschaftliche Stoffe. Die über 24 h entnommenen Wasserproben wurden kühl und dunkel gelagert und im Labor überwiegend zu 72 h-Mischproben (selten 48 h-Mischproben) vereinigt und dann auf die vorgenannten Parameter untersucht (Abbildung 4). Für die Datenanalysen wurden anschließend die Mikroschadstoffe ausgewählt, deren Konzentrationen regelmäßig über der Bestimmungsgrenze lagen und eine Varianz im Datensatz zeigten. Eine detaillierte Übersicht der Stoffe ist in Anhang 3 aufgeführt.

## 2.10 Sauerstoff und Wassertemperatur

In den Versuchsjahren 2019 und 2020 wurden Sonden für eine stündliche Sauerstoff- und Temperaturmessung genutzt. Diese waren in den Fließrinnen installiert und wurden nach den jeweiligen Versuchsreihen ausgelesen. Ursprünglich waren die Fließrinnenversuche ohne zusätzliche Luftzufuhr geplant. Aufgrund von zwischenzeitlichen Auswertungen der Sauerstoffsonden, in denen Unterschiede des Sauerstoffgehalts in den verschiedenen Wassertypen sichtbar wurden, wurde beschlossen, die Versuche im Jahr 2020 mit zusätzlicher Luftzufuhr durchzuführen, um die Sauerstoffbedingungen in den Versuchswässern anzugleichen. Dazu wurden jeweils zwei Diffusoren in jeden Mischbehälter gehängt und mit einer Belüftungsanlage betrieben. Aufgrund der zwei unterschiedlichen Sauerstoffszenarien wurden die Versuche der Jahre 2019 und 2020 getrennt ausgewertet. Aus den Sauerstoff- und Temperaturdaten wurden Sauerstoffsättigungen berechnet und für jeden Versuch getrennt dargestellt (Anhang 7).

## 2.11 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse des Zusammenhangs zwischen den analysierten Mikroschadstoffen und den biologischen Antworten kamen zwei Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurde ein Regressionsverfahren eingesetzt, das die Mikroschadstoffe (Deskriptoren) direkt und unabhängig von den experimentellen Einheiten (konventionelles Abwasser, zusätzlich ozoniertes Abwasser, Ruhrwasser) in Beziehung setzt. Das Verfahren wird nachfolgend „Treatment-unabhängige Analysen“ genannt. Zum anderen wurde ein klassisches faktorielles Analyseverfahren mit den unterschiedlichen Wassertypen als (faktorielle) experimentelle Einheiten gewählt. Die jeweiligen Antworten werden dann nach dem Faktor getrennt, verglichen und evtl. vorhandene Unterschiede dann auf Signifikanz getestet. Dieses Verfahren wird nachfolgend als „Treatment-abhängige Analysen“ bezeichnet.

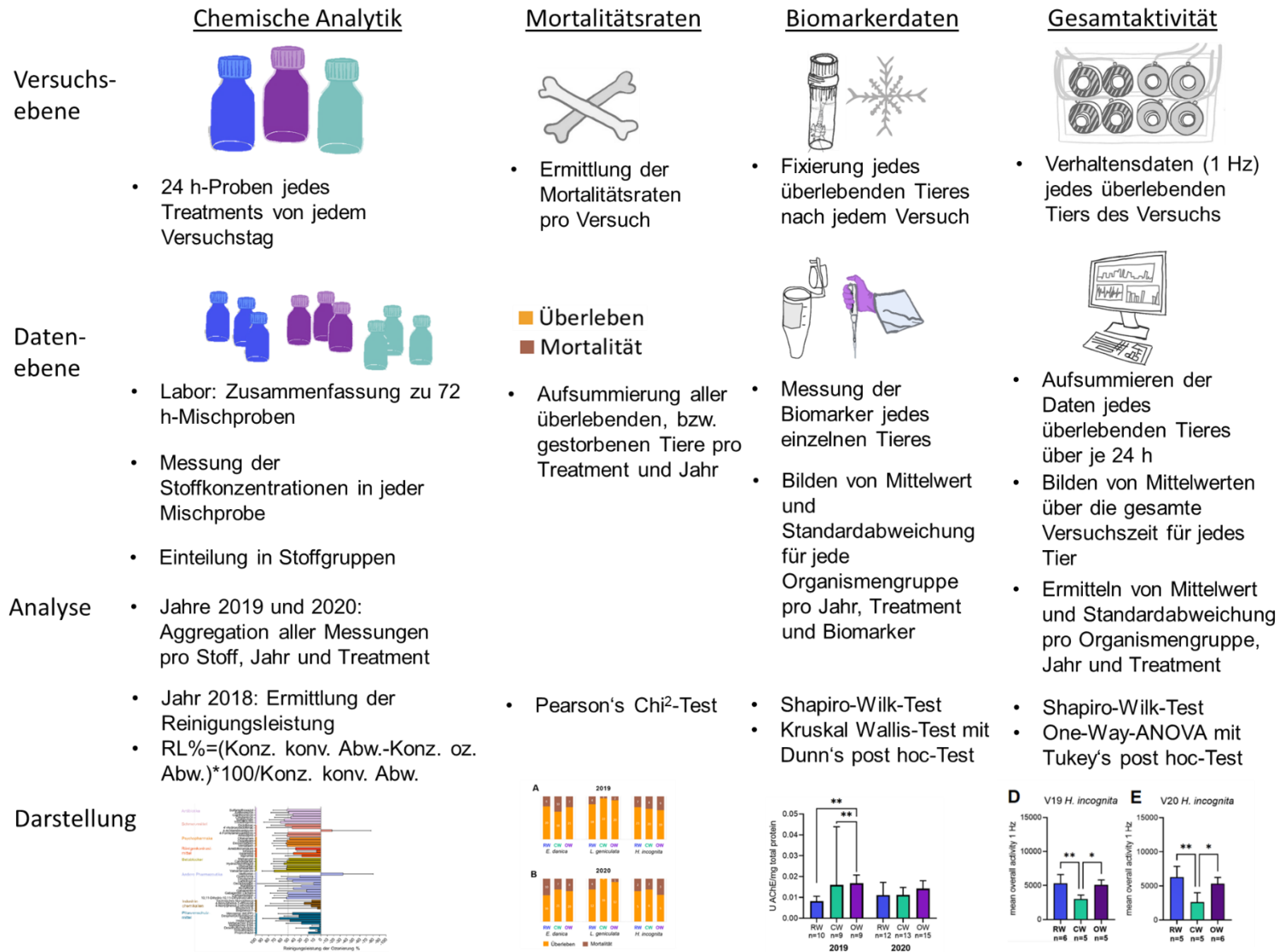


Abb. 4: Übersicht über die Erhebung, Analyse und Darstellung der erhobenen Daten



### 2.11.1 Treatment-unabhängige Analysen

Als biologische Antwortvariablen wurden die Aktivität (1 Hz) und die Biomarkerergebnisse der Versuchsorganismen herangezogen, wobei die zeitliche Auflösung der Messungen (Messintervalle) variierte (Tabelle 2). Die Aktivität bei 1 Hz diente hier als Surrogat für hauptsächlich Lokomotionsbewegungen der Organismen und repräsentiert somit die Fortbewegungsaktivität. Die Aktivitätsmessungen wurden in Anlehnung an die abiotischen Deskriptoren entsprechend zu 48 h- bzw. 72 h-Mittelwerten aggregiert. Die Ergebnisse für die Biomarker wurden nur einmal zum Ende eines Versuches und dann nur für die überlebenden Individuen ermittelt.

Tab. 2: Übersicht der ausgewerteten Versuche und Antwortvariablen mit Angaben der Messintervalle zur zeitlichen Auflösung der Messungen. Zur Beschreibung der individuellen Versuche vgl. Anhang 1.

Parameter	<i>Leuctra geniculata</i>	<i>Hydropsyche incognita</i>
Versuche	V11, V12, V19, V20	V11, V12, V19, V20
Aktivitätsmessungen	Aggregation zur Analyse: 72 h-Mittelwerte N <sub>gesamt</sub> = 60 72 h-Mittelwerte	Aggregation zur Analyse: 72 h-Mittelwerte N <sub>gesamt</sub> = 60 72 h-Mittelwerte
Biomarkermessungen	3 Biomarker: Catalase, Glutathion-S-Transferase, Acetylcholinesterase N <sub>gesamt</sub> = 12 Messwerte je Biomarker	6 Biomarker: Catalase, Glutathion-S-Transferase, Glykogen, Lipid, Lipidoxidase, Acetylcholinesterase N <sub>gesamt</sub> = 12 Messwerte je Biomarker

Als abiotische Deskriptoren in den statistischen Analysen wurden 50 der rund 200 analysierten Mikroschadstoffe ausgewählt (Anhang 3). Als Auswahlkriterium dienten i) ein weitgehend vollständiges Vorliegen der Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze sowie ii) die Variabilität der Messdaten im Sinne von Konzentrationsunterschieden zwischen den Wasserproben. Mikroschadstoffe, die mindestens ein Kriterium nicht erfüllten, waren für die statistischen Analysen aufgrund fehlender Variabilität und/oder Relevanz im vorliegenden Datensatz von untergeordnetem Interesse und wurden ausgeschlossen. Das bedeutet aber explizit nicht, dass die ausgeschlossenen Mikroschadstoffe im Hinblick auf ihre mögliche Wirkung irrelevant sein müssen. Für die statistische Gegenüberstellung mit den Biomarkergehalten wurden die jeweiligen 48 h- bzw. 72 h-Mittelwerte der Mikroschadstoffe zu Gesamtmittelwerten aggregiert, die dann den gesamten Versuchszeitraum repräsentierten.

Zur Untersuchung von Effekten unterschiedlicher Stoffklassen wurden die 50 ausgewählten Mikroschadstoffe in acht Klassen unterteilt (Tabelle 3), wobei die Anzahl der Mikroschadstoffe pro Klasse variierte. Die Einteilung in Stoffklassen beruhte auf der jeweiligen Klassifizierung der Substanz (REACH - Verordnung (EG) 1907/2006: Europäische Chemikalienverordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe).

Neben den Mikroschadstoffen wurden keine weiteren abiotischen Deskriptorvariablen berücksichtigt. Eine erweiterte Regressionsanalyse unter Berücksichtigung weiterer Kovariablen (Sauerstoffgehalte, Temperatur, Metalle und organische Stoffe) ist aufgrund der

ohnehin bereits hohen Anzahl Deskriptorvariablen sowie der vergleichsweise geringen Stichprobengröße statistisch nur schwer umzusetzen.

Tab. 3: Übersicht der untersuchten Stoffklassen (für die Zuordnung von 50 Mikroschadstoffen zu den Klassen siehe Anhang 3).

Klasse	Abkürzung	Anzahl
Antibiotika	AN	7
Schmerzmittel ( <i>painmeds</i> )	PA	4
Psychopharmaka	PS	5
Röntgenkontrastmittel ( <i>X-ray contrast media</i> )	XR	4
Betablocker	BE	7
Andere Pharmazeutika ( <i>other pharmaceuticals</i> )	OT	9
Industriechemikalien	IN	5
Pflanzenschutzmittel ( <i>agricultural substances</i> )	AG	9

Ziel dieser statistischen Analyse war es, die Einflussstärke der Mikroschadstoffe als Deskriptoren der beiden biologischen Antworten Aktivität (1 Hz) und Biomarkerantwort von max. sechs Biomarkern zu quantifizieren. Dazu wurde zunächst die Kollinearität der Mikroschadstoffe mit einer Korrelationsanalyse untersucht. Die Analyse ergab, dass viele Mikroschadstoffe sehr hoch miteinander korreliert waren (Spearman's rho >0.95), was durch eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) aller Mikroschadstoffe bestätigt wurde (Anhang 4). Die Analyse des Zusammenhangs von Mikroschadstoffen und biologischer Antwort erfolgte daraufhin über Partial Least Squares Regression (PLSR, Wold et al., 2001).

Die PLSR ist eine multivariate Regressionsmethode, die es erlaubt, eine große Anzahl kollinearere Variablen als Deskriptoren in einem Regressionsmodell zu nutzen (Mevik & Wehrens 2007). Sie kombiniert dabei Methoden der Gradientenanalyse (PCA) mit einer Regression, wobei letztlich nicht die ursprünglichen Deskriptoren, sondern mathematisch ermittelte (Haupt-) Komponenten zur Analyse herangezogen werden. Diese Komponenten stellen synthetische Variablen dar, die geeignet sind, die ursprünglich in zahlreichen Deskriptoren enthaltene Variabilität zusammenzufassen und zu quantifizieren. Sie können dann als neue Deskriptoren für zum Beispiel Regressionsmodelle genutzt werden. Neben ihrer Eignung für kollineare Deskriptoren liegt ein weiterer Vorteil der PLSR darin, dass sie für relativ niedrige Stichprobengrößen geeignet ist (Mevik & Wehrens 2007).

Alle PLSR-Modelle wurden zunächst mit den Standardeinstellungen, d. h. mit 10 Komponenten und einer nachgeschalteten Kreuzvalidierung berechnet (ncomp = 10, validation = „CV“). Auf Basis der Modellgüte (ermittelt als Vorhersagefehler „Root Mean Square Error of Prediction“ RMSEP) wurde die Anzahl Komponenten mit dem geringsten RMSEP-Wert ermittelt und darauf basierend ein finales Modell mit ebendieser Anzahl Komponenten berechnet. Die Ergebnisinterpretation erfolgt über einen Plot der

Regressionskoeffizienten für alle 50 Mikroschadstoffe, die die individuelle Einflussstärke aller Mikroschadstoffe auf die Antwortvariable zusammenfassend darstellt. Zur numerischen und vergleichenden Interpretation wurden die Koeffizienten standardisiert (Summe aller Koeffizienten = 100) und dann die Mikroschadstoffe mit den jeweils fünf höchsten positiven und negativen standardisierten Koeffizienten ermittelt. Jede der insgesamt elf Analysen (zwei plus neun Modelle, vgl. Tab. 4 und 5) mündete somit in einer Liste der zehn erklärungsstärksten Mikroschadstoffe für die jeweils untersuchte Antwortvariable.

Alle statistischen Analysen sowie numerischen und grafischen Ergebnisdarstellungen wurden mit R (R Core Team 2021) generiert. Die PLS-Regressionsmodelle wurden mit dem Paket „pls“ (Mevik & Wehrens 2020) berechnet.

### 2.11.2 Treatment-abhängige Analysen

Die Ermittlung der Reinigungsleistung der Ozonierung erfolgte auf Basis der im Rahmen der Vorversuche mit unverdünntem Abwasser erhobenen Messdaten aus dem Jahr 2018, da in den Versuchsjahren 2019 und 2020 mit verdünntem Abwasser gearbeitet wurde. Für die prozentuale Ermittlung wurde folgende Formel verwendet: Reinigungsleistung % = (Konzentration im konventionellen Abwasser - Konzentration im zusätzlich ozonierten Abwasser) \* 100 / Konzentration im konventionellen Abwasser. Die Reinigungsleistung wurde für jeden der 50 Stoffe und jeden der 30 Messzeitpunkte des Jahres 2018 (sofern der gemessene Wert über der Bestimmungsgrenze lag) ermittelt und zusammenfassend dargestellt.

Unterschiede der Überlebens- bzw. Mortalitätsraten nach Wassertyp wurden mittels Pearson's Chi<sup>2</sup>-Test auf Signifikanz getestet. Unterschiede der Verhaltensdaten wurden individuell für jedes überlebende Tier und jeden Versuch zunächst als mittlere Aktivität über einen gesamten Versuchszeitraum aggregiert. Verglichen und getestet wurden dann die individuellen aggregierten Mittelwerte aller Individuen pro Wassertyp. Die Testung erfolgte nach Bestätigung der Normalverteilung der Verhaltensdaten (mit Shapiro-Wilk-Tests) über eine einfaktorische ANOVA (Analysis of Variance) und nachgeschaltet über post-hoc Tests nach Tukey. Zudem wurde mittels einer mehrfaktorischen ANOVA getestet, ob die Sauerstoff- und Temperaturbedingungen signifikante Einflüsse auf das Verhalten der Organismen hatten (Anhang 6). Dazu wurde die Aktivität der Tiere als abhängige Variable festgesetzt und in 24 Stunden-Intervallen wurden die Faktoren Sauerstoff (unter/über 7 mg/L des jeweiligen Versuchstages) und Temperatur (unter/über 24°C am jeweiligen Versuchstag) getestet. Die Testung der Biomarkerdaten erfolgte aufgrund fehlender Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test und nachgeschaltet über „multiple comparisons“-Tests nach Dunn. Die jeweils nachgeschalteten Testverfahren korrigieren das Signifikanzniveau für multiple Paarvergleiche. Die Überlebens- bzw. Mortalitätsraten und die Biomarkerdaten wurden jeweils für die Versuchsjahre 2019, bzw. 2020 aggregiert ausgewertet und berechnet. Als Grundlage für diese Auswertungen wurden für *E. danica* Versuch 9 (2019), bzw. Versuch 23 (2020) genutzt, für *L. geniculata* Versuche 10, 11 und 12 (2019), bzw. 19. (2020) und für *H. incognita* die Versuche 8, 11, 12 (2019), bzw. 19 (2020). Die Messwerte der chemischen Substanzen wurden ebenfalls für die Jahre aggregiert zusammengefasst dargestellt, wobei bei Messwerten, die unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, ½ der jeweiligen Bestimmungsgrenze als Wert festgesetzt wurde. Datengrundlage waren Messwerte der Versuche 8, 9, 10, 11, 12 (Jahr 2019), bzw. 19, 20, 23 (Jahr 2020). Eine Übersicht über alle Versuche ist in Anhang 1 zu finden.

### 3. Projektergebnisse

#### 3.1 Treatment-unabhängige Analysen

##### 3.1.1 Einflüsse der Mikroschadstoffe auf die Gesamtaktivität

Die grafische Ausgabe einer PLS-Regression ist in Abbildung 5 exemplarisch für die Aktivität von *H. incognita* bei 1 Hz dargestellt. Das Regressionsmodell kommt mit zwei synthetischen Hauptkomponenten zur Erklärung der Variabilität der Antwortvariable aus, wobei die zweite Komponente einflussstärker ist als die erste. Mit wenigen Ausnahmen liegen die höchsten Ausschläge und damit die einflussstärksten Mikroschadstoffe im Bereich der Industriechemikalien und Pflanzenschutzmittel (IN\_ bzw. AG\_) rechts im Diagramm. Dies wird durch die standardisierten Regressionskoeffizienten der zehn einflussstärksten Mikroschadstoffe bestätigt (Abbildung 6). Sieben der TOP 10 Mikroschadstoffe gehörten einer der beiden Stoffklassen an.

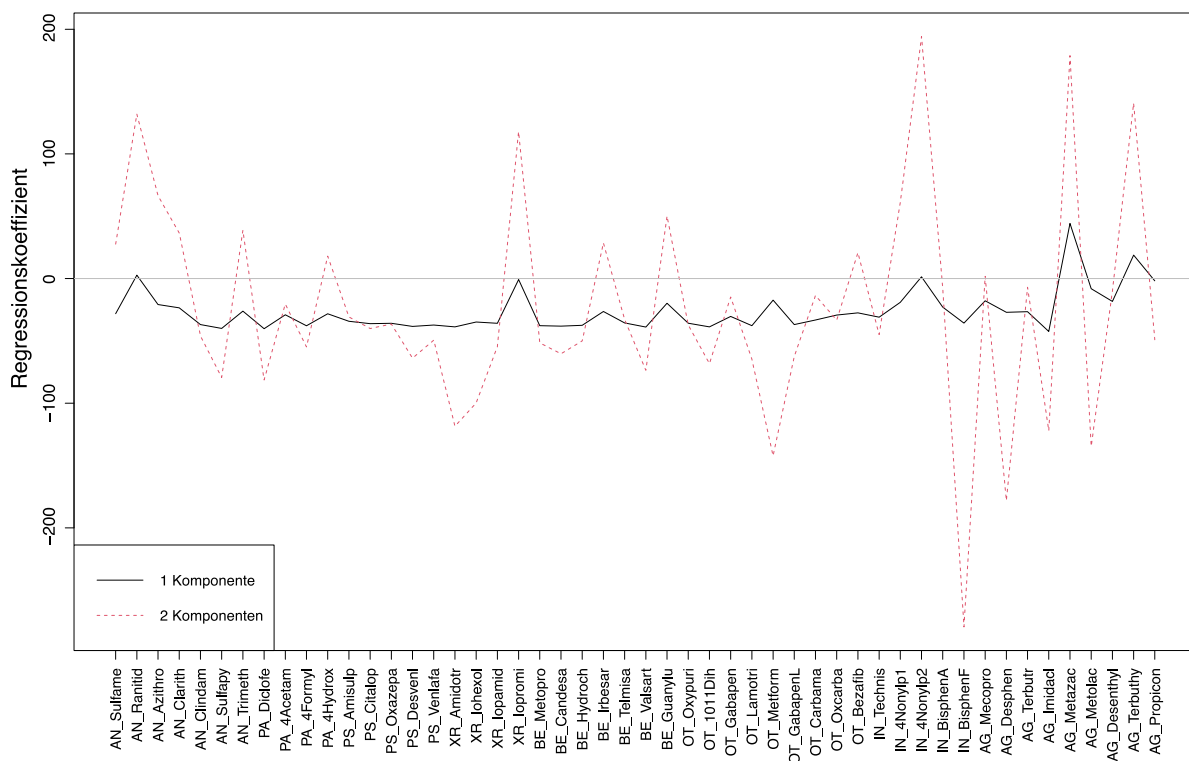


Abb. 5: Regressionskoeffizienten von 50 Mikroschadstoffen im PLS-Regressionsmodell zur Aktivität (1 Hz) von *H. incognita* mit zwei Komponenten. (Erklärung der Mikroschadstoff-Abkürzungen im Anhang 3). Das Modell erklärt 75% der Variabilität in den Mikroschadstoffdaten und 53% der Variabilität der Antwortvariablen. Die deutlichen Unterschiede der Ausschläge eines Modells mit einer und eines Modells mit zwei Komponente(n) deuten auf eine sehr viel höhere Erklärungsstärke der zweiten Komponente hin. Zu erkennen ist eine Häufung hoher Ausschläge im Bereich der Industrie- (IN\_) und Pflanzenschutzmittel (AG\_) rechts.

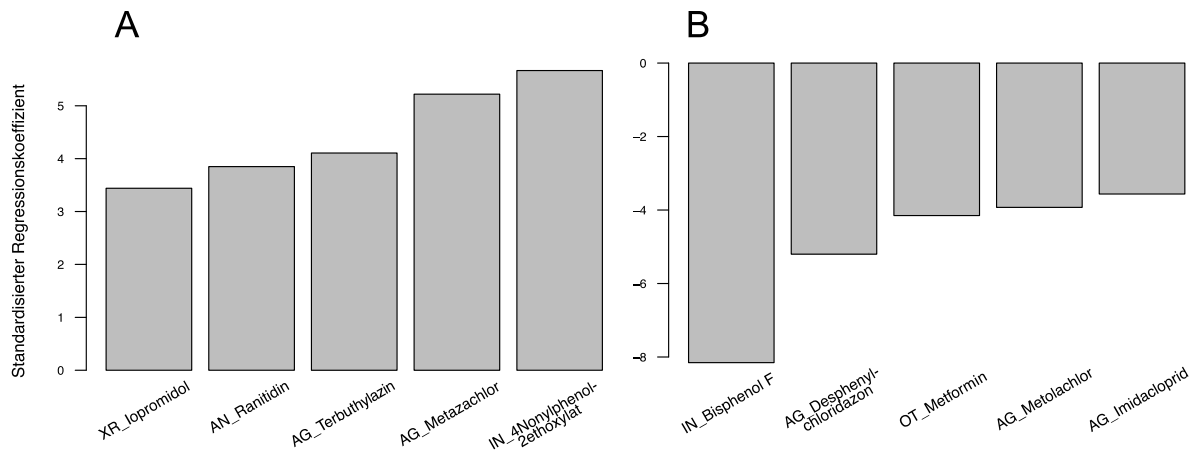


Abb. 6: TOP 10 einflussstärkste Mikroschadstoffe im PLS-Regressionsmodell zur Aktivität (1 Hz) von *H. incognita* (vgl. Abbildung 4). Positiv mit der Aktivität korrelierte Koeffizienten sind in A, negativ korrelierte Koeffizienten in B dargestellt. Sieben d der zehn dargestellten Mikroschadstoffe gehören zur Gruppe der Industrie- (IN\_) und Pflanzenschutzmittel (AG\_).

Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Aktivität (1 Hz) von *H. incognita* und *L. geniculata* erfolgt in Tabelle 4. Zu erkennen ist zum einen, dass das Modell zu *L. geniculata* mit nur 25% erklärter Variabilität der Antwortvariablen deutlich schlechter ausfiel als das Modell zu *H. incognita*, während beide Modelle die Variabilität in den Mikroschadstoffdaten mit etwa 75% ähnlich gut abbildeten. Zum anderen fällt auf, dass im Modell zu *L. geniculata* mehrere Stoffklassen eine wichtige Rolle spielten; der für *H. incognita* erkennbare dominierende Einfluss von Industriechemikalien und Pflanzenschutzmitteln wurde durch das Modell zu *L. geniculata* nicht bestätigt.

Tab. 4: : Zusammenfassung der PLS-Regressionsmodelle zum Einfluss der Mikroschadstoffe auf die Aktivität (1 Hz) von *L. geniculata* und *H. incognita*.

PLSR Aktivität (1 Hz)	<i>Leuctra geniculata</i>	<i>Hydropsyche incognita</i>
Anzahl Komponenten im finalen Modell	2	2
Erklärte Variabilität in den Mikroschadstoffdaten (Deskriptoren)	74%	75%
Erklärte Variabilität der Aktivität (Antwort)	25%	53%
Häufigkeit der TOP 10 Mikroschadstoffe nach Stoffklasse		
Antibiotika (AN)	2	1
Schmerzmittel (PA)	1	
Psychopharmaka (PS)		
Röntgenkontrastmittel (XR)	1	1
Betablocker (BE)	1	
Andere Pharmazeutika (OT)	2	1
Industriechemikalien (IN)	1	2
Pflanzenschutzmittel (AG)	2	5

### 3.1.2 Einflüsse der Mikroschadstoffe auf die Biomarkergehalte

Die Zusammenfassung der einflussstärksten Mikroschadstoffe bzw. Stoffklassen auf Basis der PLS-Regressionen erfolgte analog zum oben dargestellten Vorgehen für die Aktivität und ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Modellgüte war akzeptabel, wobei alle Modelle jeweils mindestens 75% der Variabilität in den Mikroschadstoffdaten erklärten. Die erklärte Variabilität der Biomarker schwankte je nach Modell zwischen 61 und 87%.

Hinsichtlich der Rolle der einzelnen Mikroschadstoffklassen zeigte sich für beide untersuchten Wirbellosenarten ein deutlich dominierender Einfluss der Pflanzenschutzmittel (AG\_). Sie waren über alle Modelle aufsummiert insgesamt 35-mal unter den TOP 10 Deskriptoren vertreten, was etwa 39% der insgesamt 90 TOP 10 Deskriptoren entsprach (vgl. Tabelle 5). Zusammen mit den Industriechemikalien lag ihr Anteil bei knapp 58% aller TOP 10 Deskriptoren. Die vergleichsweise konsistenten Ergebnisse über alle Biomarker und beide untersuchten Arten unterstreichen die dominierende Rolle von Industriechemikalien und Pflanzenschutzmitteln und damit ihren starken Einfluss auf die physiologischen Antwortvariablen

Tab. 5: : Zusammenfassung der PLS-Regressionsmodelle zum Einfluss der Mikroschadstoffe auf die Biomarkergehalte von *L. geniculata* und *H. incognita*. Die Gesamtanzahl der TOP 10 Ergebnisse pro Mikroschadstoffklasse über alle Modelle ist in der letzten Spalte (fett) aufgeführt. CAT: Katalase, GST: Glutathion-S-Transferase, ACHE: Acetylcholin-Esterase, GLY: Glycogengehalt, LIP: Lipidgehalt, LPO: Lipid-Peroxidase

PLSR Biomarker	<i>Leuctra geniculata</i>			<i>Hydropsyche incognita</i>						Σ
	CAT	GST	ACHE	CAT	GST	GLY	LIP	LPO	ACHE	
Anzahl Komponenten im finalen Modell	2	4	3	3	3	6	8	2	8	
Erklärte Variabilität der Mikroschadstoffdaten (Deskriptoren)	81%	79%	86%	76%	81%	79%	80%	75%	79%	
Erklärte Variabilität der Aktivität (Antwort)	73%	63%	87%	67%	61%	70%	68%	75%	82%	
Häufigkeit der TOP 10 Mikroschadstoffe nach Stoffklasse										
Antibiotika (AN)	1			2	1			1	2	<b>7</b>
Schmerzmittel (PA)		1				1	1			<b>3</b>
Psychopharmaka (PS)								1		<b>1</b>
Röntgenkontrastmittel (XR)	2	1	1	1		1	1			<b>7</b>
Betablocker (BE)			1		1	1	1	1		<b>5</b>
Andere Pharmazeutika (OT)		1	3	1	1	4	2	2	1	<b>15</b>
Industriechemikalien (IN)	1	2	3	2	3	1	1	2	2	<b>17</b>
Agrarchemikalien (AG)	6	5	2	4	4	2	4	3	5	<b>35</b>

Hinsichtlich des Vorzeichens der Mikroschadstoffeinflüsse auf die Biomarker waren innerhalb der Mikroschadstoffklassen keine einheitlichen Muster zu erkennen. Positiv und negativ mit der jeweiligen Biomarkerkonzentration korrelierte Industriechemikalien und Pflanzenschutzmittel kamen in etwa gleich häufig vor.

### 3.2 Treatment-abhängige Analysen

#### 3.2.1 Reinigungsleistung der Ozonierung

Die Reinigungsleistung der zusätzlichen Ozonierung im Vergleich zum konventionell behandelten Abwasser, basierend auf den Messungen des Jahres 2018, zeigte für die Stoffauswahl der 50 betrachteten Stoffe eine unterschiedliche Effektivität (Abb. 7). Die Reinigungsleistung in den Stoffklassen Antibiotika, Schmerzmittel (mit der Ausnahme von 4-Acetamidoantipyrin), Psychopharmaka und Betablocker lag bei rund 50%. Bei der Klasse Röntgenkontrastmittel lagen die durchschnittlichen Reinigungsleistungen zwischen 7 und 42% und somit etwas niedriger. Auch die Klasse der Anderen Pharmazeutika zeigte ein heterogenes Bild mit durchschnittlichen Reinigungsleistungen zwischen -35 und 52%. Ebenso zeigte die Gruppe Pflanzenschutzmittel eine starke Variabilität in den durchschnittlichen Reinigungsleistungen zwischen 2 und 63%. Die Gruppe der Industriechemikalien zeigte insgesamt die geringsten Reinigungsleistungen mit Werten zwischen 0 und 25%. Zwei Stoffe, 4-Acetamidoantipyrin und Metformin, zeigten negative Reinigungsleistungen, also höhere Stoffkonzentrationen im zusätzlich ozonierten Abwasser verglichen mit denen im konventionellen Abwasser.

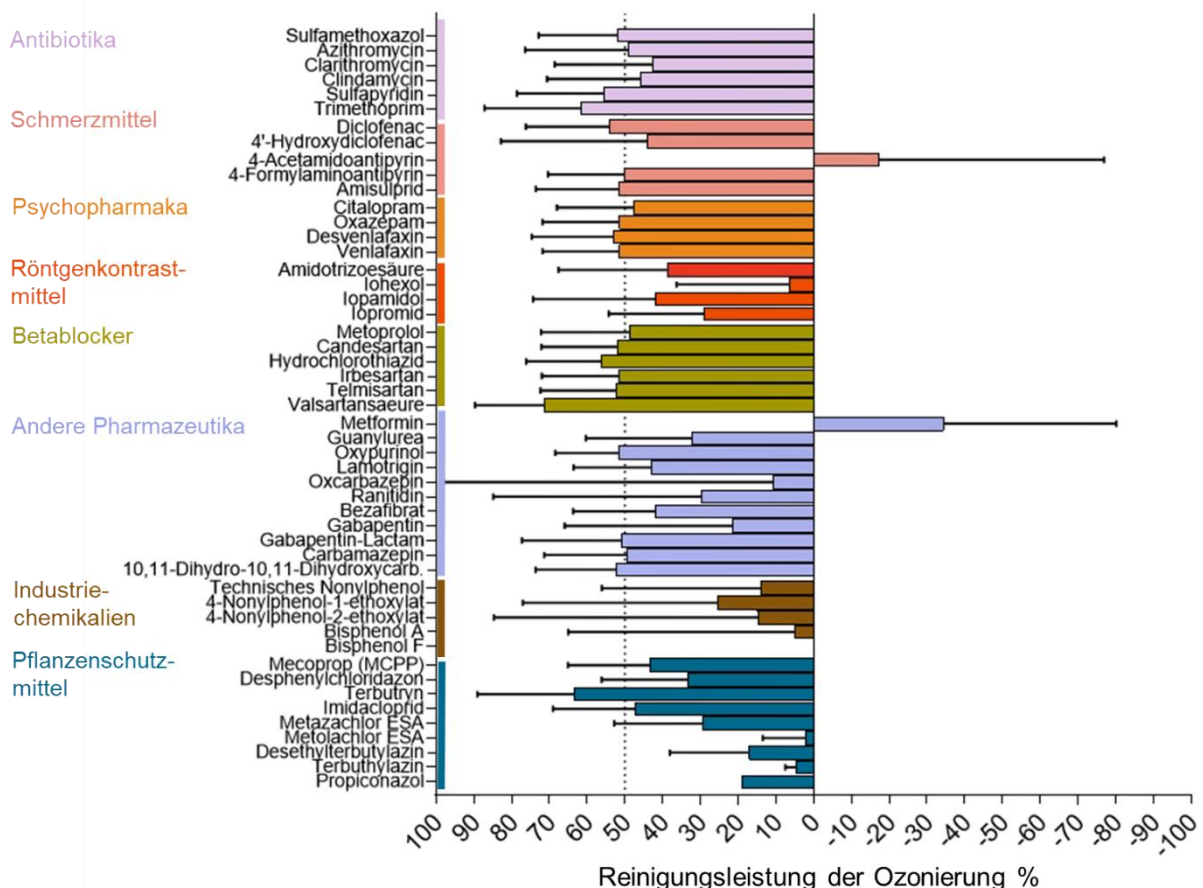


Abb. 7: Reinigungsleistungen (%) der zusätzlichen Ozonierung im Vergleich zum konventionell behandelten Abwasser, basierend auf den Messdaten aus dem Jahr 2018, erhoben mit unverdünntem Abwasser. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

### 3.2.2 Stoffkonzentrationen

Betrachtet man die 50 Mikroschadstoffe, die in den Versuchsjahren 2019 und 2020 über der Bestimmungsgrenze lagen und zudem eine Variabilität im Datensatz zeigten, fallen insbesondere für die Pharmazeutika (Abb. 8 A, B) die meist deutlich höheren Konzentrationen im konventionell behandelten Abwasser (im Folgenden mit „CW“ bezeichnet) auf.

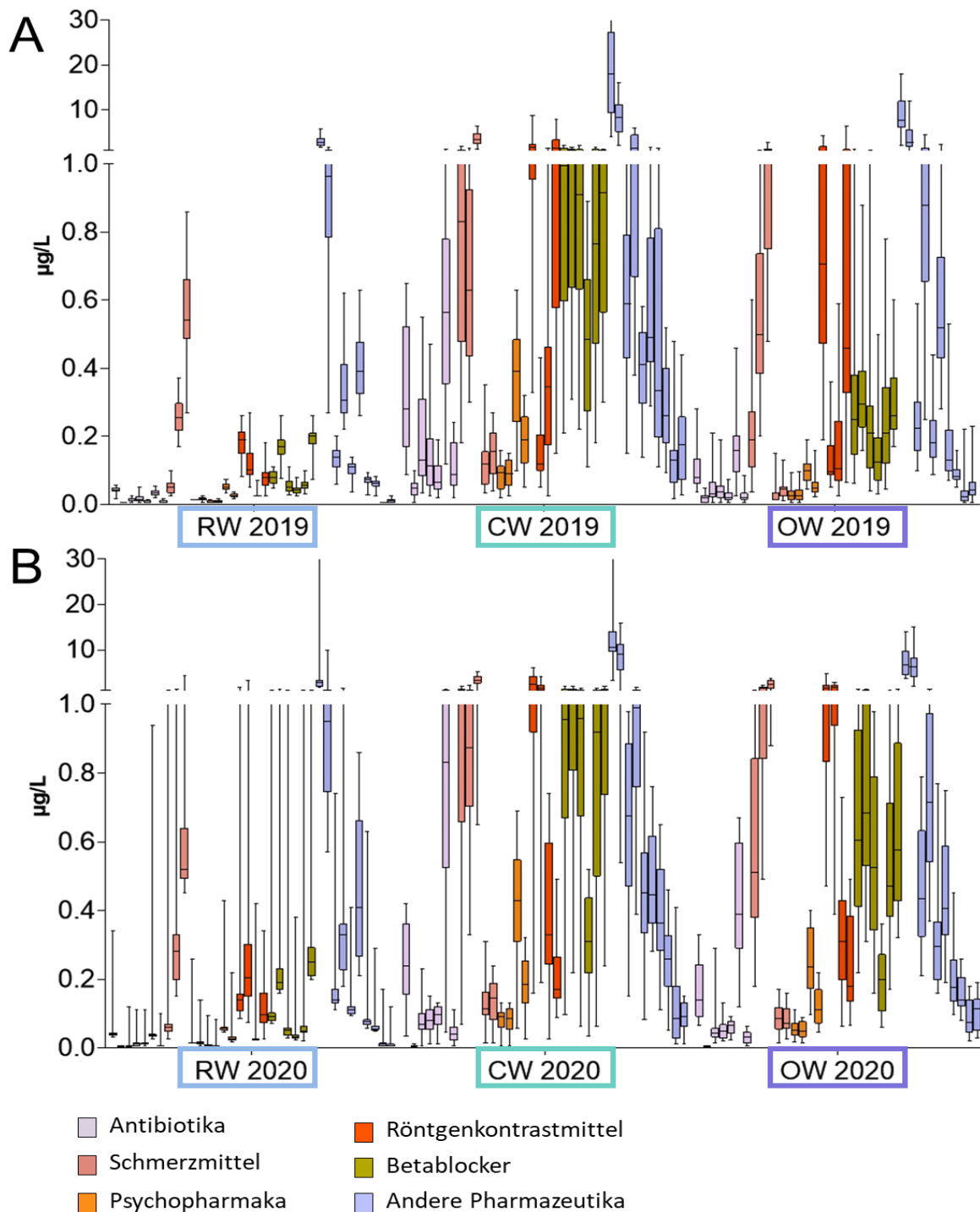


Abb. 8: Konzentrationen der Stoffauswahl pharmazeutischer Mikroschadstoffe, sortiert nach sechs Stoffklassen in den drei Versuchswässern, aufgeteilt in die Versuche der Jahre 2019 (A) und 2020 (B). Dargestellt sind die Daten in Box-Whisker Plots, wobei 50% der Daten innerhalb der Box liegen (oberes Ende: 25% Perzentil, unteres Ende: 75% Perzentil), der Median mit einem Strich eingezeichnet ist und die minimalen und maximalen Ausreißer als Whisker dargestellt sind



Im zusätzlich ozonierten Abwasser (im Folgenden mit „OW“ bezeichnet) fielen die Konzentrationen der Pharmazeutika niedriger aus, während sie im Ruhrwasser (im Folgenden als „RW“ bezeichnet) noch einmal deutlich geringer waren als in den beiden Abwässern. Die Stoffklassen „Industriechemikalien“ und „Pflanzenschutzmittel“ waren in allen drei Wässern gering konzentriert (bis 0.25 µg/L), wobei sich bei vier der neun analysierten Pflanzenschutzmittel (Metazachlor ESA, Metolachlor ESA, Terbuthylazin, Propiconazol) mitunter die höchsten Konzentrationen im Ruhrwasser zeigten (Abb. 9 A, B, Anhang 3).

In den Abwässern waren insbesondere die Stoffklassen „Schmerzmittel“, „Betablocker“, „Röntgenkontrastmittel“ und „Andere Pharmazeutika“ in den jeweils höchsten Konzentrationen vertreten. Im Ruhrwasser hingegen waren nur die Stoffklassen „Schmerzmittel“ und „Andere Pharmazeutika“ prominent.

Im Jahresvergleich zeigten sich ähnliche Konzentrationsmuster der untersuchten Stoffe für beide Jahre, wobei einige Stoffkonzentrationen divergierten. So zeigten viele der Pharmazeutika im Jahr 2020 breitere Streuungen als in den Messungen des Jahres 2019 (Abb. 8 A, B). Die Industriechemikalien und Pflanzenschutzmittel zeigten ebenfalls im Jahresvergleich ähnliche Muster, hier zeigten sich in den Messungen des Jahres 2019 etwas breitere Streuungen (Abb. 9 A, B).

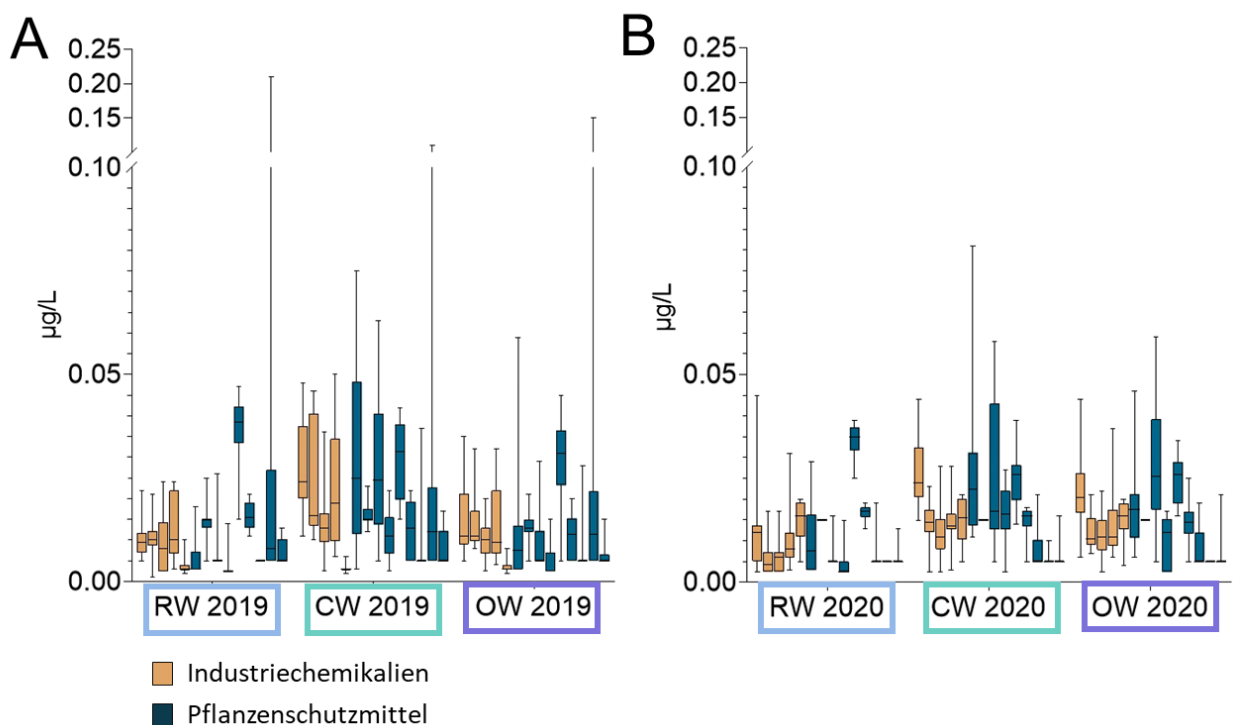


Abb. 9: Konzentrationen der Stoffauswahl nicht-pharmazeutischer Mikroschadstoffe, sortiert nach zwei Stoffklassen in den drei Versuchswässern, aufgeteilt in die Versuche der Jahre 2019 (A) und 2020 (B). Dargestellt sind die Daten in Box-Whisker Plots, wobei 50% der Daten innerhalb der Box liegen (oberes Ende: 25% Perzentil, unteres Ende: 75% Perzentil), der Median mit einem Strich eingezeichnet ist und die minimalen und maximalen Ausreißer als Whisker dargestellt sind.

### 3.2.3 Mortalitätsraten

Die Versuche mit verdünntem Abwasser zeigten für keine der drei untersuchten Wirbellosenarten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Überlebensrate zwischen den Wassertypen (Abb. 10). Die Überlebensrate lag in beiden Versuchsjahren für *L. geniculata* mit 80–90% etwas höher als für *E. danica* und *H. incognita* (jeweils 70–75%). Auch zwischen den beiden Versuchsjahren waren keine Unterschiede im Überleben der drei Arten festzustellen, obwohl die Sauerstoffbedingungen in den Jahren 2019 und 2020 insbesondere im ozonierten Abwasser (OW) deutlich variierten (vgl. Abb. 10 A und B sowie Anhang 7, Kap. 2.10.).

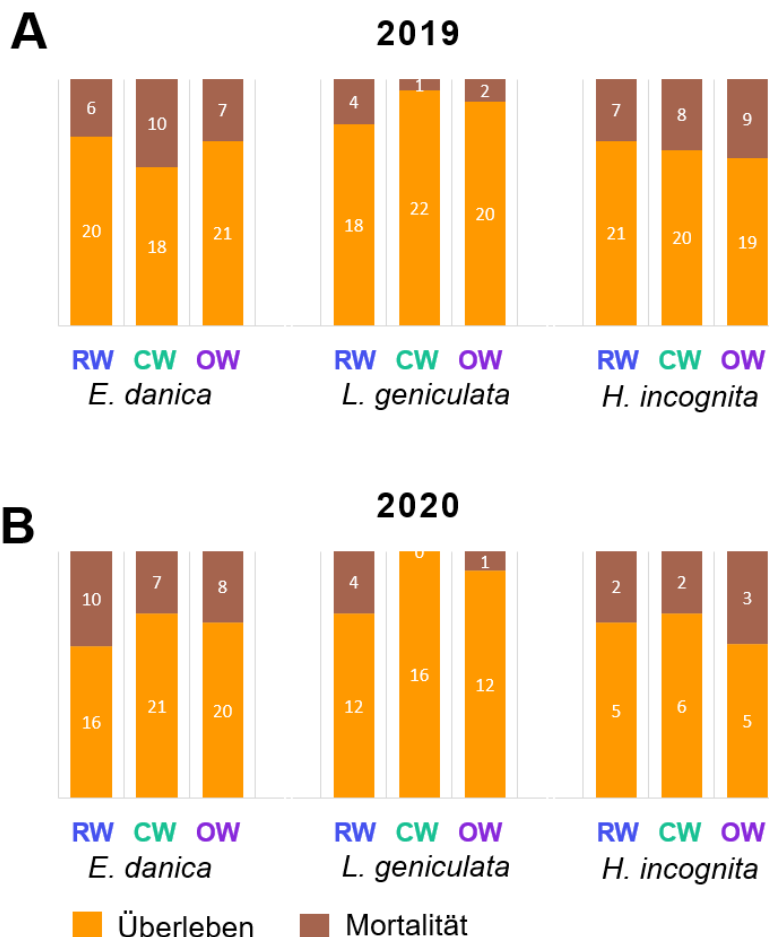


Abb. 10: Überlebens- bzw. Mortalitätsraten der drei exponierten EPT-Taxa *E. danica*, *L. geniculata* und *H. incognita*, getrennt dargestellt für die Versuchsjahre 2019 und 2020. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Die Zahlen in den Säulen beziehen sich auf die absolute Anzahl der Organismen pro Versuchsjahr, Art und Treatment. Individuen, die am Ende des jeweiligen Versuchs nicht wiedergefunden werden konnten, wurden nicht in die Darstellung einbezogen.

### 3.2.4 Gesamtaktivität der Organismen

*H. incognita* zeigte in allen vier ausgewerteten Versuchen signifikante Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Abwässern (Abb. 11 A, B, D, E). So war die Aktivität von *H. incognita* im OW höher als die im CW. *L. geniculata* hingegen wies in V11 (Jahr 2019) eine signifikant erhöhte Aktivität im OW auf, während die Aktivität in V19 (Jahr 2020) im Vergleich zum CW signifikant reduziert war. V20 zeigte eine ähnliche Tendenz, allerdings keine signifikanten Ergebnisse (Abb. 11, C, F, G).

Der Vergleich zum Ruhrwasser machte die Unterschiede zwischen den Versuchsjahren sichtbar: *H. incognita* zeigte in beiden Abwässern im Jahr 2019 höhere Aktivitäten (Abb. 10 A, B) verglichen zum Jahr 2020 (Abb. 11 D, E). Die Aktivität im OW war im Jahr 2019 signifikant erhöht im Vergleich zum RW, während sie im Jahr 2020 mit RW auf einer Höhe lag. Die Aktivität im CW lag im Jahr 2019 mit RW auf einer Höhe, war im Jahr 2020 jedoch signifikant reduziert im Vergleich zum RW und OW (Abb. 11 A, B, D, E). Die Aktivitäten von *L. geniculata* waren im OW im Jahr 2019 signifikant erhöht, verglichen zu RW und CW, während sie im Jahr 2020 mit RW auf einer Höhe lagen. Ähnlich wie bei *H. incognita* lag die Aktivität im CW im Jahr 2019 auf einer Ebene mit der Aktivität im RW, war jedoch im Jahr 2020 signifikant erhöht im Vergleich zu RW und OW (Abb. 11 C, F, G).

Der Analyse der Verhaltensdaten war eine mehrfaktorielle ANOVA mit den Faktoren Sauerstoff und Temperatur vorgeschaltet. Diese diente dazu, Versuche mit einem eindeutig signifikanten Einfluss des Sauerstoffgehaltes oder der Temperatur auf das Verhalten zu identifizieren. Die Verhaltensdaten der durch diese Faktoren beeinflussten Versuche befinden sich in Anhang 6 (Ergebnisse der mehrfaktoriellen ANOVA siehe Anhang 7).

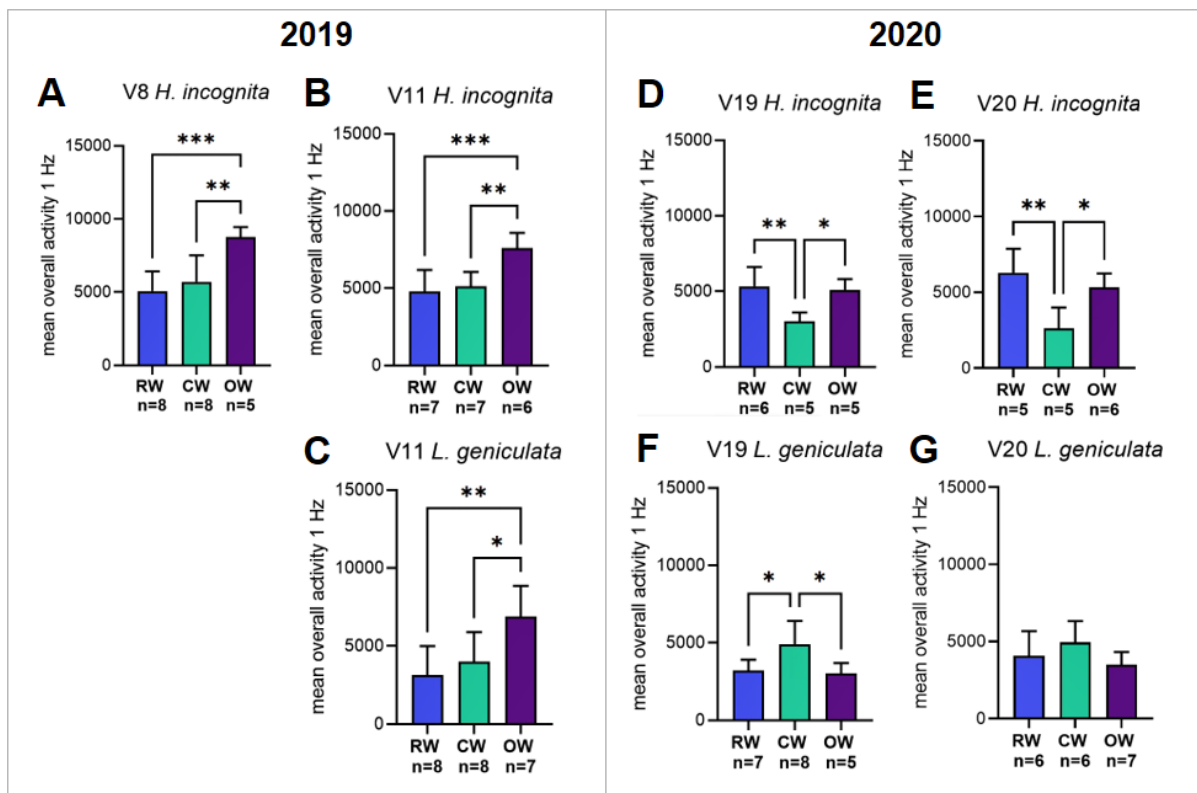


Abb. 11: Gesamtaktivität von *H. incognita* und *L. geniculata* in den Versuchen (gekennzeichnet mit dem Kürzel „V“ und der Nummer des Versuchs) der Jahre 2019 und 2020. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) der Gesamtaktivität der überlebenden Tiere über den gesamten Versuchszeitraum. RW = Ruhrwasser, CW = konventionell behandeltes Abwasser, OW = zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis der One-way ANOVA mit Tukey's post hoc-Test sind mit \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$  bzw. \*\*\*:  $p \leq 0,001$  gekennzeichnet.

### 3.2.5 Biomarker

Die sechs für *E. danica* analysierten Biomarker zeigten signifikante Ergebnisse für die Aktivität der Acetylcholin-Esterase (AChE), Lipid-Peroxidase (LPO) und Glutathion-S-Transferase (GST). Während die AChE-Aktivität im zusätzlich ozonierten Abwasser im Vergleich zu den anderen beiden Wässern signifikant erhöht war (RW:  $p=0,006$ , CW:  $p=0,004$ ), war sie für LPO signifikant reduziert im Vergleich zu den anderen beiden Wässern (RW:  $p<0.001$ , CW:  $p=0.021$ ) (Abb. 11 C, D). Zwischen Ruhrwasser und konventionell behandeltem Abwasser zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12) für das Jahr 2019. Für das Jahr 2020 hingegen war eine signifikant erhöhte Aktivität von GST im zusätzlich ozonbehandelten Abwasser verglichen zum konventionell behandelten Abwasser ( $p=0,007$ ) feststellbar (Abb. 12 B). Bei *L. geniculata* hingegen fanden sich für keinen der drei gemessenen Biomarker signifikante Unterschiede (Abb. 13). *H. incognita* wies für das Jahr 2019 bei der Betrachtung der Lipidgehalte eine signifikante Reduktion im konventionell gereinigten Abwasser verglichen zum Ruhrwasser ( $p=0,018$ ) (Abb. 14 E) auf. Für zusätzlich ozoniertes Abwasser und für das Versuchsjahr 2020 wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abb. 14).

Einige Biomarker zeigten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsjahren. So war die LPO-Aktivität von *E. danica* in RW und CW im Versuchsjahr 2019 höher als im Jahr 2020, *L. geniculata* zeigte im Jahr 2019 niedrigere Catalase- und höhere GST-Aktivitäten als im Jahr 2020 und bei *H. incognita* wurden im Jahr 2019 höhere AChE- und GST-Aktivitäten und niedrigere Lipid- und Glycogengehalte gemessen als im Jahr 2020 (Abb. 12-14).

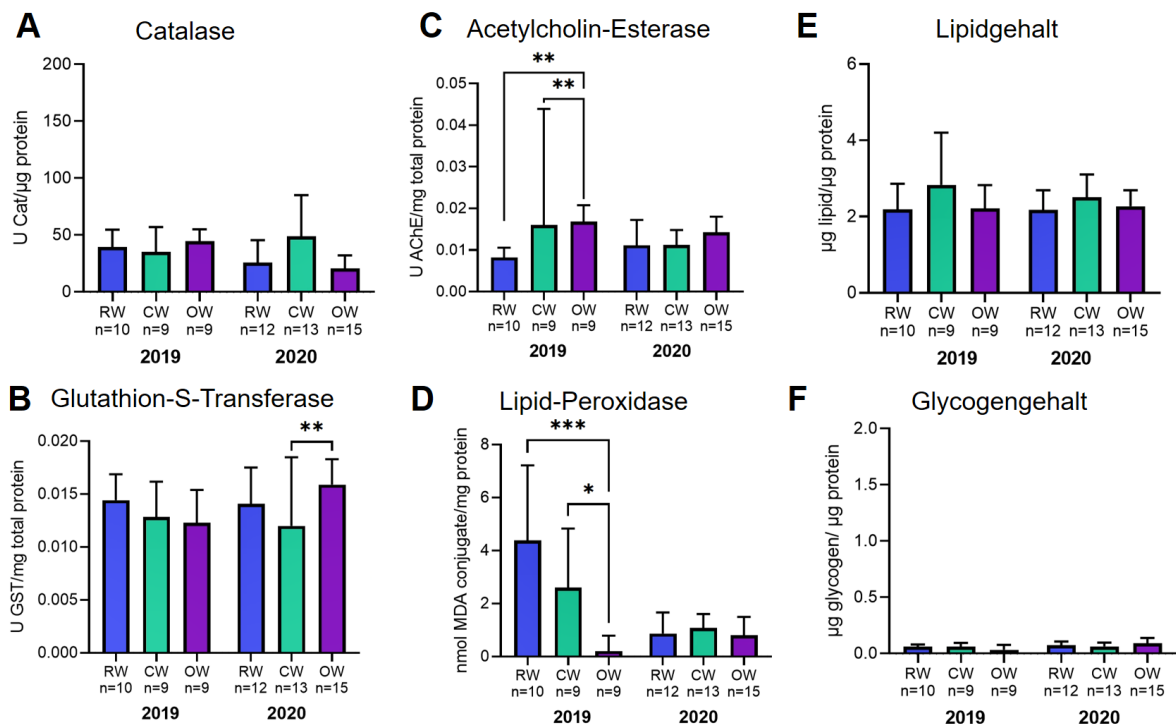


Abb. 12: Ergebnisse von *E. danica* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis des Kruskal Wallis-Tests mit Dunn's post hoc-Test sind mit \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$  bzw. \*\*\*:  $p \leq 0,001$  gekennzeichnet.

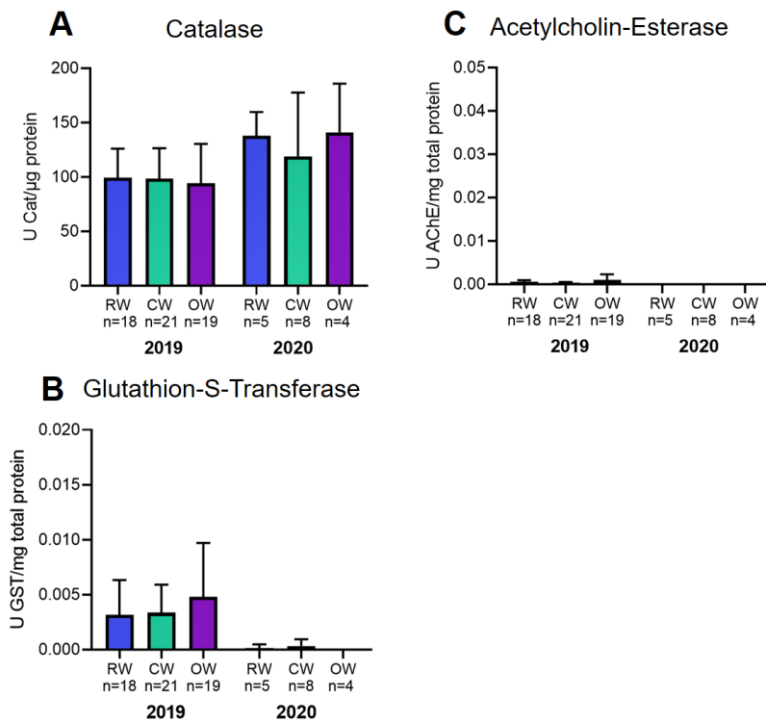


Abb. 13: Ergebnisse von *L. geniculata* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Aufgrund der geringen Biomasse von *L. geniculata* konnten lediglich drei Biomarker gemessen werden. Die Daten wurden mittels des Kruskal Wallis-Tests auf Signifikanz getestet.

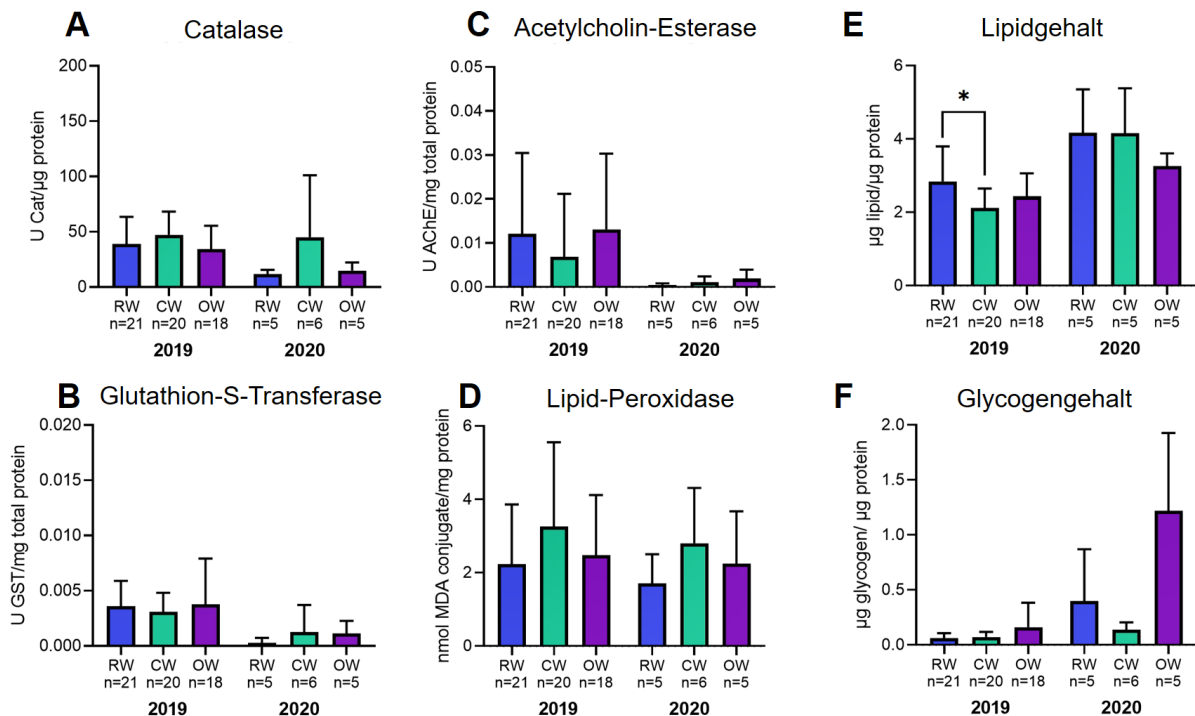


Abb. 14: Ergebnisse von *H. incognita* für die Biomarker-Messungen aus den Versuchsjahren 2019 und 2020, aufgetrennt nach Versuchswässern und Jahren. RW: Ruhrwasser, CW: konventionell gereinigtes Abwasser, OW: zusätzlich ozoniertes Abwasser. Signifikante Unterschiede sind auf Basis des Kruskal Wallis-Tests mit Dunn's post hoc-Test sind mit \* :  $p \leq 0,05$  gekennzeichnet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Treatment-unabhängige Analysen: Reaktionen auf bestimmte

#### Mikroschadstoffklassen

Die übergreifende Betrachtung der Zusammenhänge zwischen den Mikroschadstoffkonzentrationen und den biologischen Antwortvariablen zeigte, dass je nach Stoffklasse unterschiedlich starke biologische Reaktionen hervorgerufen wurden. Für die beiden Wirbellosenarten *H. incognita* und *L. geniculata* war zudem ein starker Zusammenhang zwischen Biomarker- und Verhaltensreaktionen feststellbar. *H. incognita* beispielsweise reagierte nicht nur auf Ebene des Biomarkers Acetylcholinesterase (Marker für Neurotoxizität), sondern parallel dazu auch mit einer Verhaltensänderung. Der Zusammenhang zwischen negativen Einflüssen auf die neuronale Signalverarbeitung und einer veränderten Lokomotion bzw. Ventilation von Organismen wurde hier erstmals eindeutig nachgewiesen.

Ferner waren Verhaltens- und Biomarkerreaktion nicht nur miteinander, sondern auch mit bestimmten Stoffklassen verknüpft. Insbesondere Pflanzenschutzmittel spielten dabei eine herausragende Rolle. Die Umweltqualitätsnormen (Jahresdurchschnitt) der hier untersuchten relevanten Pflanzenschutzmittel liegen vorwiegend im Bereich von 0,002 bis 0,1 µg/L (Brinke et al., 2017), was verdeutlicht, dass einzelne Pflanzenschutzmittel auch schon in sehr geringen Konzentrationen toxisch auf Gewässerorganismen wirken. Da der Eintrag von Pflanzenschutzmitteln in Fließgewässer aber nicht ausschließlich über Kläranlagenabflüsse erfolgt, sondern vor allem diffus (flächenhaft) aus landwirtschaftlichen Flächen im Einzugsgebiet von Fließgewässern, stellt sich die Frage nach geeigneten Verfahren zur Reduktion der Pflanzenschutzmittel-Einträge. Hinsichtlich der diffusen Einträge erscheinen vor allem breite, dicht geschlossene und mit standorttypischer Vegetation bestandene Gewässerrandstreifen geeignet. Mit ihnen können Einträge über den Oberflächenabfluss und über die Luft wirkungsvoll abgepuffert werden. Zudem sollte die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln stark eingeschränkt werden, um ihre Einträge generell zu reduzieren (Prasuhn et al., 2018).

Mit Blick auf die Verbesserung des ökologischen Zustandes von Fließgewässern sollte somit die Abwasserbehandlung in Kläranlagen von Maßnahmen zur Reduktion von Pflanzenschutzmitteleinträgen in der Fläche begleitet werden, um negative Auswirkungen auf aquatische Wirbellose durch Mikroschadstoffe zu vermindern. Viele Pflanzenschutzmittel fallen unter die prioritären Stoffe, deren schrittweise Reduzierung in einem der fünf übergeordneten Ziele der Wasserrahmenrichtlinie (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 2001, Amtsblatt der Europäischen Union, 2013) gefordert ist, oder sind als potenziell prioritäre Stoffe eingestuft (Engelmann et al., 2009).

### 4.2 Treatment-abhängige Analysen: Reinigungsleistung der Ozonierung

Die Reinigungsleistung der zusätzlichen Ozonierung im Vergleich zum konventionell gereinigten Abwasser lag für viele pharmazeutische Mikroschadstoffe bei rund 50%, während für Röntgenkontrastmittel (im Mittel bis 40%), die Hälfte der untersuchten Pflanzenschutzmittel (im Mittel bis 20%) und Industriechemikalien (im Mittel bis 25%) eine geringere Reinigungsleistung erzielt wurde. Für zwei Substanzen, 4-Acetamidoantipyrin und Metformin, zeigten sich sogar negative Reinigungsleistungen, was einer im Vergleich zum konventionell gereinigten Abwasser höheren Stoffkonzentration nach Ozonierung entspricht. 4-Acetamidoantipyrin ist ein Metabolit des Schmerzmittels Metamizol, was die höhere Konzentration des Metabolits im ozonierten Abwasser erklären könnte. Der umgekehrte Fall ist bei Metformin denkbar. Metformin ist ein Antidiabetikum, dessen häufigster Metabolit

Guanylurea im konventionell behandelten Abwasser in höheren Konzentrationen gefunden wurde als im zusätzlich ozonierten Abwasser. Es ist davon auszugehen, dass die Metabolisierungsrate von Metformin im konventionell behandelten Abwasser deutlich höher war und zu entsprechend niedrigeren Konzentrationen von Metformin führte. Gleichzeitig wurden höhere Konzentrationen von Guanylurea gemessen, was die negative Reinigungsleistung erklärt.

### 4.3 Chronische Endpunkte und Einfluss veränderter Sauerstoffbedingungen

Im Jahr 2019 lagen die Minima der Sauerstoffsättigung mit durchschnittlich 94% im Ruhrwasser deutlich höher als im konventionell behandelten (68%) und im zusätzlich ozonierten Abwasser (45%). Ursache der niedrigeren Sauerstoffsättigung in den Abwässern war vermutlich der erhöhte biologische Sauerstoffbedarf infolge der durch die Schadstoffe induzierten höheren mikrobiellen Aktivität im behandelten Abwasser. Mikroorganismen sind in der Lage, Schadstoffe aerob zu metabolisieren (Chiellini et al., 2013). Verstärkt wird dieser Mechanismus im ozonbehandelten Abwasser durch die oxidative Wirkung des Ozons. Hierdurch werden Stoffe, die während der konventionellen Abwasserbehandlung nicht weiter abgebaut werden konnten, wieder für Mikroorganismen verfügbar, wodurch der biologische Sauerstoffbedarf zusätzlich erhöht und der Sauerstoffgehalt im Wasser weiter vermindert wird (KomOzon, 2011). Frühere Studienergebnisse zum chemischen und biologischen Sauerstoffbedarf belegen, dass der biologische Sauerstoffbedarf in fünf Tagen (BSB<sub>5</sub>) in ozoniertem Abwasser um 13–20% höher liegt als in konventionell behandeltem Abwasser (KomOzon, 2011; Sallanko und Okkonen, 2009; Schaar, 2015). Der chemische Sauerstoffbedarf bleibt dabei weitgehend konstant (KomOzon, 2011). Auch im vorliegenden Forschungsprojekt wurde der chemische Sauerstoffbedarf im Rahmen der Wasseranalysen erhoben und zeigte keine merklichen Differenzen zwischen den Wässern (Anhang 8, 9).

Ohne Zugabe von Sauerstoff über die Belüftung der Versuchswässer reagierten die Organismen im zusätzlich ozonierten Abwasser mit einer meist signifikant erhöhten Aktivität im Vergleich zum Ruhrwasser. Die höhere Aktivität hängt mutmaßlich mit dem Anstieg der Ventilationsbewegung der Versuchsorganismen zusammen. Eine Studie von van der Geest (2007) mit der mit *H. incognita* eng verwandten Köcherfliegenlarve *Hydropsyche angustipennis* zeigte, dass Hypoxie, also eine verminderte Sauerstoffsättigung des Wassers, für eine erhöhte Ventilation sowie eine allgemein erhöhte Aktivität sorgte, was van der Geest auf ein Vermeidungs- oder Fluchtverhalten zurückführte. Ähnlich könnten auch die Mechanismen hinter den erhöhten Aktivitäten der hautatmenden Steinfliegenlarve *L. geniculata* und der mit eigenständig beweglichen Kiemen ausgestatteten *E. danica* (Anhang 5) gewesen sein, da alle drei Arten die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser mittels Bewegung fördern (López-Rodríguez et al., 2009, van der Geest 2007). *Ephemera danica*, bei der ein signifikanter Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf das Verhalten festgestellt wurde, zeigte im gleichen Versuchsjahr ebenfalls signifikante Reaktionen auf Ebene zweier Biomarker, weshalb hier ein Einfluss des Sauerstoffs auf die physiologischen Reaktionen in Form von Biomarkergehalten nicht ausgeschlossen werden kann.

Allen verwendeten Verhaltensdaten wurde eine mehrfaktorielle ANOVA vorgeschaltet: Dazu wurde die Aktivität der Tiere als abhängige Variable festgesetzt und in 24 Stunden-Intervallen die Faktoren Sauerstoff (unter/über 7 mg/L des jeweiligen Versuchstages) und Temperatur (unter/über 24°C am jeweiligen Versuchstag) getestet, um Versuche mit signifikantem Einfluss durch einen oder beide Faktoren zu identifizieren. Mittels der mehrfaktoriellen ANOVA wurden zwei Versuche mit extremen Bedingungen ermittelt (Anhang 6, 7), bei denen der Sauerstoffgehalt einen signifikanten Einfluss hatte. Für die anderen Versuche des Jahres 2019

lassen sich aber die Einflüsse des Sauerstoffgehaltes und der Temperatur auf das Verhalten der Organismen dennoch nicht ausschließen, da diese Analyseverfahren über die Verwendung eines Schwellenwertes, über oder unter dem der jeweilige Faktor liegt, die Bedingungen nur näherungsweise erfassen kann.

Auf Ebene des ökologischen Zustands bedeutet dies: leiten Kläranlagen, die mit einer Ozonierung als weitergehende Reinigungsstufe ausgestattet sind, in kleine Gewässer mit einem hohen Klarwasseranteil ein, kann dies zu einem Sauerstoffdefizit im Gewässer und damit zu verändertem Verhalten bei Organismen führen. Eine verminderte Sauerstoffsättigung bzw. eine stärkere Sauerstoffzehrung des eingeleiteten ozonierten Abwassers in ein kleines Gewässer kann beispielsweise eine erhöhte Aktivität der im Gewässer lebenden EPT-Taxa zur Folge haben, was eine erhöhte Verdriftung und eine erhöhte Verfügbarkeit für Prädatoren nach sich zieht. Negative Auswirkungen auf Populationsebene sind in diesem Szenario sehr wahrscheinlich und würden der verbesserten Reinigungsleistung der Ozonierung im Hinblick auf eine Reduzierung der Mikroschadstoffkonzentrationen entgegenwirken. Gleichwohl ist es unter Ökosystembedingungen oftmals schwierig, die Kausalität negativer Effekte durch Sauerstoffdefizite bzw. Schadstoffwirkungen nachzuweisen (siehe auch Schertzing et al., 2019).

Im Versuchsjahr 2020 wurde allen drei Versuchswässern über eine Belüftung Sauerstoff zugeführt. Dadurch konnte eine deutliche Erhöhung der Sättigungsminima auf 99% (Ruhwasser) 73% (konventionell behandeltes Abwasser) und 75% (zusätzlich ozoniertes Abwasser) erreicht werden. Auf Verhaltensebene zeigte sich, dass die Aktivität der im zusätzlich ozonierten Abwasser exponierten Tiere nun vergleichbar mit der Aktivität im Ruhwasser war. Im konventionell behandelten Abwasser hingegen zeigten sich bei höherer Sauerstoffsättigung signifikante, jedoch artspezifisch unterschiedliche Veränderungen der Aktivität.

#### **4.4 Akute Effekte von konventionell behandeltem und ozoniertem Abwasser**

Weder mit noch ohne zusätzliche Luftzufuhr kam es in den beiden Abwässern zu höheren Mortalitätsraten als im Ruhwasser. Somit ist nicht davon auszugehen, dass konventionell behandeltes oder zusätzlich ozoniertes Abwasser im Freiland akute Auswirkungen auf die Mortalität der untersuchten EPT-Taxa hat. Die im Versuch gewählte Verdünnung im Verhältnis von 1 : 2 (Abwasser : Ruhwasser) stellt unter der Annahme eines Basisabflusses in der Ruhr ein Extremszenario dar, denn hier sind unter normalen Abflussbedingungen höhere Verdünnungen des Abwassers zu erwarten. Es ist allerdings möglich, dass akute Effekte auftreten, wenn die Organismen den Bedingungen länger als 14 Tage ausgesetzt sind. In einer Studie, die im selben Fließrinnensystem mit dem Flohkrebs *G. fossarum* durchgeführt wurde und in der unverdünntes konventionell behandeltes Abwasser und Ruhwasser untersucht wurden (Rothe et al., 2021, submitted), zeigten sich jedoch auch nach 21 Tagen keine signifikanten akuten Effekte auf die Mortalität. Auch löste das konventionell behandelte Abwasser in dieser Studie mit *G. fossarum* keine chronischen Effekte auf Biomarker oder Verhalten aus (Rothe et al., 2021, submitted). Da die Fließrinnenversuche mit Insektenlarven allerdings in einem Zeitfenster stattfinden müssen, in dem die Tiere groß genug für eine Detektion der Veränderungen im elektrischen Feld und für die Biomarkeranalyse sein müssen, aber gleichzeitig noch nicht in das Stadium der Verpuppung und des Schlupfes gelangen sollten, ist der zeitliche Rahmen für derartige Versuche begrenzt. Langzeitstudien zu chronischen Effekten können im Rahmen eines Monitorings durchgeführt werden.



## 4.5 Auswirkungen einer Ozonierung auf den ökologischen Zustand

Fallstudien zum Einfluss einer Ozonierung als weitere Verfahrensstufe bei der Abwasserreinigung auf den ökologischen Zustand gibt es bisher kaum. Ashauer (2016) untersuchte mittels des SPEAR-Index (species at risk, Liess und Van der Ohe, 2005) die Abundanz von Makroinvertebraten eines kleinen Gewässers (Furtbach, Schweiz) mit hohem Klarwasseranteil sowohl vor als auch nach Implementierung einer Ozonierungsstufe mit nachgeschaltetem Sandfilter. Nach der Ozonierung stieg der ökologische Zustand des Gewässers unterhalb der Kläranlageneinleitung, beurteilt nach ökologischen Zustandsklassen der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL), von unbefriedigend auf mäßig. Dies impliziert, dass die Ozonierung sich positiv auf die Gewässerqualität nach WRRL auswirken kann. Allerdings ist dieses Fallbeispiel nur bedingt mit den Bedingungen in der Ruhr bei Schwerte vergleichbar: Im Gegensatz zum Fallbeispiel, in dem der Klarwasseranteil des Gewässers 50–60% betrug und die ökologische Zustandsklasse vor Implementierung der Ozonierung unbefriedigend war (Ashauer, 2016), beträgt der Klarwasseranteil der Ruhr in Schwerte unter extremen Trockenwetterbedingungen maximal ca. 35% und die ökologische Zustandsklasse unterhalb der Einleitung ist mäßig. Es ist außerdem davon auszugehen, dass sich die Mikroschadstoffzusammensetzungen der jeweiligen Kläranlagen unterscheiden. Zudem besitzt die Ruhr als mittelgroßer Mittelgebirgsfluss (Typ 9.2 nach Pottgiesser und Sommerhäuser, 2004) eine andere Makrozoobenthos-Fauna als es im Fallbeispiel Furtbach zu erwarten ist. Trotz der Unterschiede ist es, basierend auf den Ergebnissen dieses Projektes, gut möglich, dass sich eine Abwasserozonierung auch bei Einleitung in größere Flüsse positiv auf die Gewässerqualität auswirken kann.

Wurde die Sauerstoffsättigung in den Versuchswässern durch Belüftungsmaßnahmen angehoben, fanden sich keine chronischen Effekte auf das Verhalten im zusätzlich ozonierten Abwasser. Im konventionell behandelten Abwasser hingegen waren chronische Effekte erkennbar, was sich mit den erhöhten Mikroschadstoffgehalten im konventionell behandelten Abwasser deckt. Die Einleitung von sauerstoffarmem (ozoniertem) Abwasser in Fließgewässer kann vorübergehend mit Sauerstoffdefiziten im Gewässer verbunden sein, insbesondere dann, wenn eine gute Anreicherung mit Luftsauerstoff durch Strömungsreduktion (z. B. Rückstau) vermindert ist. In diesem Fall sollte das gereinigte Abwasser vor Eintritt in den Vorfluter belüftet werden. In natürlich fließenden und wenig beschatteten, breiten Gewässerabschnitten ist die Sauerstoffversorgung in der Regel ausreichend, zumal dann, wenn es aufgrund des Pflanzenwachstums und der damit verbundenen Photosyntheseaktivität am Tag zur Sauerstoffanreicherung kommt. Unter diesen Voraussetzungen kann ein eventuelles Sauerstoffdefizit im Kläranlagenausfluss zumindest während der hellen Tagesstunden unmittelbar abgepuffert werden. Eine zusätzliche Belüftung des gereinigten Abwassers ist dann nicht notwendig. In der Nacht kann es in den Pflanzenbeständen zwar zur vorübergehenden Sauerstoffzehrung infolge der Pflanzenatmung kommen. Die Menge des über Kläranlagen eingeleiteten, gereinigten Abwassers dürfte in dieser Zeit jedoch auch deutlich zurückgehen.

Unter einer ausreichenden Sauerstoffversorgung führte die Abwasserozonierung in den bis zu 14 Tage dauernden Versuchen im Vergleich zum Ruhrwasser weder zu negativen Effekten auf die Verhaltensreaktion noch zu physiologischen Effekten auf Biomarkerebene. Im konventionell behandelten Abwasser hingegen zeigte *L. geniculata* eine signifikant erhöhte Aktivität. Eine höhere Bewegungsaktivität kann dabei mit einem höheren Driftrisiko verbunden sein, da dann die Wahrscheinlichkeit steigt, mit der ein Individuum von der fließenden Welle erfasst und weiter stromabwärts verdriftet wird. Zudem kann die höhere Aktivität mit einem

Anstieg des Prädationsdruckes verbunden sein, da aktivere Individuen eher von Räubern erfasst werden können. Erhöhte Aktivitäten können somit in Summe zum Fehlen von Arten führen, was zu veränderten Lebensgemeinschaften und damit auch zu einer abweichenden ökologischen Bewertung beiträgt.

Mikroschadstoffe können aber auch zu einer Abnahme der Aktivität führen, was durch die Reaktion von *H. incognita* im konventionell behandelten Abwasser beispielhaft gestützt wird. Dort war die Aktivität der Köcherfliegenart signifikant reduziert. Eine verminderte Aktivität und damit ein reduzierter Energieverbrauch können helfen vorhandene Energiereserven zu schonen, bis sich die Umweltbedingungen wieder verbessern (Gerhardt, 1996). Dauert der ungünstige Zustand aber über einen längeren Zeitraum an, könnte es infolge der reduzierten Aktivität zur Entwicklungsverzögerung, beispielsweise zu einem verspäteten Schlupf und damit verbundenen auch zu einer verspäteten Eiablage kommen. Dies würde sich wiederum auf die nachfolgende Generation auswirken.

#### **4.6 Mikroschadstoffquellen und Schlussfolgerungen für das Management**

Begleitet von in den letzten Jahrzehnten stetig verbesserten Analysemethoden und -verfahren offenbart das Monitoring der Fließgewässer in Deutschland eine wachsende Belastung der Oberflächengewässer mit Mikroschadstoffen. Gleichzeitig erreichen viele dieser Fließgewässer nicht den gemäß der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie geforderten guten ökologischen Zustand.

Als ein Grund für diese Zielverfehlung wird das Vorkommen von Mikroschadstoffen im Wasser angesehen, weswegen zur Reduzierung deren Eintrags die Errichtung zusätzlicher Behandlungsstufen in Kläranlagen gefordert wird. Die im Rahmen dieses Forschungsprojekts hierzu am Beispiel der Abwasserozonierung durchgeführten Untersuchungen belegen, dass eine Verringerung des Konzentrationsniveaus von Stoffen, die mittels einer vierten Reinigungsstufe behandelbar sind, keine negativen Auswirkungen auf das Überleben, die Verhaltensaktivität und die Biomarkerreaktionen der Gewässerorganismen hat. Im Vergleich zu den entsprechenden Parametern, die für die Organismen nach Exposition im konventionell behandelten Abwasser erhoben wurden, ähneln die Ergebnisse für das Überleben, die Verhaltensaktivität und die Biomarkerreaktionen nach Exposition in ozoniertem Abwasser eher denen, die aus der Hälterung in dem als Umweltreferenz verwendeten Ruhrwasser resultieren.

Die chemischen Analysen des Ruhrwassers zeigen, dass insbesondere Gewässer in einem anthropogen stark genutzten Umfeld Belastungen mit Mikroschadstoffen aufweisen, die unabhängig von den kommunalen Kläranlageneinleitungen über unterschiedliche, teilweise diffuse Pfade in diese eingetragen werden. Hierzu zählen die Pflanzenschutzmittel und einzelne Industriechemikalien. Im Rahmen der treatment-unabhängigen Analysen war ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Verhaltens- und Biomarkerreaktionen der Gewässerorganismen mit Industriechemikalien und Pflanzenschutzmittel nachweisbar.

Im Hinblick auf die Zielerreichung eines guten ökologischen Gewässerzustands bedeutet dies für das zukünftige Management von Maßnahmen: Die Etablierung von vierten Reinigungsstufen auf Kläranlagen wird zu einer Verringerung der detektierbaren Mikroschadstoffbelastung in den Gewässern beitragen. Ebenfalls wird dies grundsätzlich mit einer Verbesserung der Lebensbedingungen der Gewässerorganismen verbunden sein. Diese kann aber in vielen Fällen (in Abhängigkeit von der Gewässergröße bzw. vom Klarwasseranteil) nicht ausreichend sein, um einen substanziellen Beitrag für die Erreichung eines guten ökologischen Zustands zu leisten, da die Stoffe, die nach den Ergebnissen dieses Forschungsprojekts maßgeblich von negativem Einfluss auf das Wohlbefinden der Gewässerorganismen

sind, oft nicht durch die vierten Reinigungsstufen auf Kläranlagen erfasst werden. Erst mit zusätzlichen Maßnahmen auch in diesem außerhalb der Siedlungsentwässerung liegenden Aktionsfeld (z.B. Etablierung von Gewässerrandstreifen mit standorttypischer Vegetation, Verringerung des Einsatzes von Industriechemikalien und Pflanzenschutzmitteln) dürfte es daher gelingen, aus stofflicher Sicht die notwendigen Voraussetzungen zur Erfüllung der Vorgaben der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie zu schaffen.

## 5. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

### 5.1 Öffentlichkeitsarbeit

Zu Beginn des Projekts wurde eine Pressemitteilung auf der Seite der Universität Duisburg-Essen herausgegeben (<https://www.uni-due.de/2017-12-11-kleinlebewesen-im-fluss>). Eine weitere Information der Medien erfolgte im Frühjahr 2018 mit dem Beginn der Versuche auf der Kläranlage Schwerte

(<https://www.ruhrverband.de/presse/pressemitteilungen/detailansicht/news///ruhrverband-und-uni-duisburg-essen-starten-versuchsbetrieb-zu-forschungsprojekt/>).

2019 erfolgten mehrere Beiträge zum Projekt auf der Seite vom Forschungskolleg Future Water, in dem Louisa Rothe assoziierte Kollegiatin ist (<http://www.nrw-futurewater.de/index.php/universitaet-duisburg-essen.html>).

Das Projekt wurde in Vorträgen auf verschiedenen Veranstaltungen vorgestellt.

### 5.2 Veröffentlichungen

**Rothe, L. E., Botha, T. L., Feld, C. K., Weyand, M., Zimmermann, S., Smit, N., Wepener, V., Sures, B.** (2021): Ecotoxicological effects of conventionally treated and ozonated wastewater containing micropollutants on survival, physiology, morphology, and behavior of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 286, 117241, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117241>

Baetz, N., **Rothe, L.E.**, Wirzberger, V., **Sures, B.**, Schmidt, T., Tuerk, J. (2021): High-Performance Thin-Layer Chromatography in Combination with a Yeast-Based Multi-Effect Bioassay to Determine Endocrine Effects in Environmental Samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 1321–1335, <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03095-5>

**Rothe, L. E., Löffler, F., Gerhardt, A., Feld, C. F., Stift, R., Weyand, M., Grabner, D., Sures, B.** (2021): Parasite infection influences the biomarker response and locomotor activity of *Gammarus fossarum* exposed to conventionally-treated wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (submitted)

Wirzberger, V., Merkus, V., Klein, M., Hohrenk, L., **Rothe, L. E.**, Baetz, N., Tuerk, J., **Sures, B.**, Lutze, H., Schmidt, T.: Influence of matrix composition on the formation of reaction products during ozonation of N-containing substances, (in preparation)

**Rothe, L. E., Feld, C. K., Sures, B., Weyand, M., Gerhardt, A.** (2020): Einfluss von Mikroschadstoffen auf Makrozoobenthosorganismen (MZB). *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser*. In: *Gewässerschutz – Wasser – Abwasser*, Schriftenreihe des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen, 2020, 252, S. 9/1 - 9/8

**Weyand, M., Rothe, L. E. (2020):** Einfluss von Mikroschadstoffen auf das Makrozoobenthos. Ruhrgütebericht 2019.

### 5.3 Vorträge

Ökosystemrelevante Bewertung von Schadstoffen, Sures, B., Rothe, L. E., Feld, C. K., DBU-Tagung Pestizide in der Umwelt – Defizite erkennen, Handlungsoptionen entwickeln 2019, Osnabrück

Effekte von Mikroschadstoffen aus konventionellem und ozoniertem Abwasser auf Makrozoobenthos-Organismen: Ein Projektüberblick, Rothe, L. E., Feld, C. K., Weyand, M., Gerhardt, A., Sures, B., Tagung SETAC GLB 2019, Landau

Effects of conventional and ozonated wastewater on macroinvertebrates: A Project-Overview. Rothe, L. E., Feld, C. K., Weyand, M., Gerhardt, A., Sures, B., Tagung GfÖ 2019, Münster

Effekte von Mikroschadstoffen auf aquatische Ökosysteme, Sures, B., 2020, Abschlusskonferenz Mikromodell, Dresden

Einfluss von konventionell gereinigtem und ozoniertem Abwasser auf Mortalität, Verhalten und Biomarker ausgewählter Makrozoobenthos-Organismen, Rothe, L.E., Feld, C. K., Weyand, M., Gerhardt, A., Sures, B., Future Water Kolloquium, 2021, Essen, online

Da ist der (Kratz-)wurm drin: Parasiteninfektion verändert die Reaktionen von Gammarus fossarum auf konventionell gereinigtes Abwasser. Rothe, L. E., Löffler, F., Gerhardt, A., Feld, C. F., Stift, R., Weyand, M., Grabner, D., Sures, B., Tagung SETAC GLB 2021, online

Butter bei die Fische: Auswirkungen von konventionellem und ozonbehandeltem Abwasser auf Embryonen des Zebrafisches Danio rerio. Rothe, L. E., Botha, T. L., Feld, C. K., Weyand, M., Zimmermann, S., Smit, N. J., Wepener, V., Sures, B., Tagung SETAC GLB 2021, (Kurzvortrag) online

## 6. Fazit/Ausblick

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Auswirkungen von verdünntem, konventionell behandeltem Abwasser, verdünntem zusätzlich ozoniertem Abwasser sowie von Ruhrwasser auf drei Vertreter aquatischer Insektenlarven untersucht, die als Indikatorarten einen bedeutenden Einfluss auf das Bewertungsergebnis des ökologischen Gewässerzustands gemäß Wasserrahmenrichtlinie haben. Die Verdünnungen erfolgten im Verhältnis ein Teil Abwasser zu zwei Teilen Ruhrwasser und stellten ein Verdünnungsverhältnis in der Ruhr unter extremen Trockenwetterverhältnissen nach, um die Effekte von Mikroschadstoffen möglichst konservativ abschätzen zu können. Die Versuche fanden in Fließrinnen und über einen Expositionszeitraum von 14 Tagen statt.

Die Untersuchung der Mikroschadstoffkonzentrationen in konventionell behandeltem und zusätzlich ozoniertem Abwasser zeigte, dass die Reinigungsleistung der Ozonierung für einen Großteil der pharmazeutischen Stoffe um 50% lag, wobei im Fall von Röntgenkontrastmitteln, Pflanzenschutzmitteln und besonders Industriechemikalien geringere Reinigungsleistungen vorlagen. Hinsichtlich der Ozonierung dürfen jedoch Transformationsprodukte, die beim Oxiationsprozess entstehen, nicht außer Acht gelassen werden. Ein wichtiger, in der Literatur häufig beschriebener Faktor ist die biologische Nachbehandlung des ozonierten Abwassers, um entstandene, potenziell toxische Transformationsprodukte durch Mikroorganismen weiter zu metabolisieren, bevor sie in Kontakt mit Gewässerorganismen kommen. Diese erfolgte bei den in diesem Forschungsprojekt durchgeführten Untersuchungen in Form einer dynamischen Rezirkulation des ozonierten Abwassers in die biologische Behandlungsstufe der Kläranlage. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die Metabolisierung je nach Mikroorganismus unter biologischem Sauerstoffbedarf erfolgt und eine daraus möglicherweise resultierende geringe Sauerstoffsättigung ebenfalls zu veränderten Reaktionen der Gewässerorganismen führen kann.

Die untersuchten Endpunkte Mortalität und Biomarker zeigten bei Sauerstoffgehalten über 7 mg/L keine Unterschiede der untersuchten Abwässer im Vergleich zum Ruhrwasser. Der Endpunkt Verhalten konnte zeigen, dass unter Exposition mit zusätzlich ozoniertem Abwasser keine abweichenden Reaktionsmuster im Vergleich zum Ruhrwasser auftraten. Im konventionell behandelten Abwasser hingegen traten Abweichungen der Aktivität im Vergleich zum Ruhrwasser auf. Abweichende Verhaltensreaktionen können im Falle einer signifikant erhöhten Aktivität zu vermehrter Verdriftung und Verfügbarkeit für Prädatoren, im Falle einer signifikant verringerten Aktivität zu einem verspäteten Schlupf und verspäteter Eiablage führen, was Auswirkungen auf die nachfolgende Generation hätte. Daraus lässt sich schließen, dass eine zusätzliche Abwasserozonierung unter den beschriebenen Gegebenheiten für die untersuchten Organismen bessere Umfeldbedingungen schafft als rein konventionell behandeltes Abwasser.

Die Frage, ob eine Abwasserozonierung zu einem verbesserten ökologischen Zustand nach Wasserrahmenrichtlinie führen kann, erfordert eine differenzierte Antwort. Zum einen zeigten die Untersuchungen der Endpunkte, dass die Mortalitätsraten, Biomarker und Aktivitäten bei einer Exposition mit zusätzlich ozoniertem Abwasser nicht von den im Ruhrwasser gezeigten Reaktionen abwichen. Zum anderen zeigte eine übergreifende Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Mikroschadstoffkonzentrationen und biologischen Antwortvariablen ohne die separate Berücksichtigung der Wassertypen, dass sich insbesondere die Schadstoffklassen Pflanzenschutzmittel und Industriechemikalien stark auf die Verhaltens- und Biomarkerreaktionen auswirkten. Die Analyse der Mikroschadstoffgehalte in den

Versuchswässern legte dar, dass diese Schadstoffklassen auch im Ruhrwasser vertreten waren, da deren Eintrag nicht nur durch Punktquellen wie Kläranlagen, sondern auch durch diffuse Einträge aus der Fläche erfolgt. Nur die Effekte, die durch Einträge über Punktquellen wie Kläranlagen ausgelöst werden, können mit der 4. Reinigungsstufe vermindert werden. Somit sollten Maßnahmen zur Schadstoffreduktion an Kläranlagen von Maßnahmen zur Reduktion z.B. des Pflanzenschutzmitteleintrags begleitet werden, um in stark anthropogen überprägten Gewässern negative Auswirkungen auf Makroinvertebraten vermindern zu können. Daher stellt unter derartigen Rahmenbedingungen, wie sie für die Ruhr und auch für viele andere Gewässer in Deutschland anzutreffen sind, der Ausbau kommunaler Kläranlagen zur Reduzierung sonstiger Stoffeinträge nur eine Teillösung zum Erreichen eines guten ökologischen Gewässerzustands dar und sollte unbedingt durch die Reduktion diffuser Einträge, beispielsweise durch die Anlage von Gewässerrandstreifen mit standorttypischer Vegetation sowie einer Verringerung des Einsatzes von Industriechemikalien und Pflanzenschutzmitteln begleitet werden.

## Literatur

- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften. Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 2001. Entscheidung Nr. 2455/2001/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung der Liste prioritärer Stoffe im Bereich der Wasserpolitik und zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG. <http://www.wrrl-info.de/docs/entscheidung.pdf>
- Amtsblatt der Europäischen Union. Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 2013. Richtlinie 2013/39/EU der Kommission vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:DE:PDF>
- Ashauer, R., (2016) Post-ozonation in a municipal wastewater treatment plant improves water quality in the receiving stream. *Environmental Sciences Europe* 28, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0068-z>
- Brinke, M., Bänsch-Baltruschat, B., Keller, M., Szöcs, E., Schäfer, R. B., Foit, K., Liess, M., (2017) Bestandsaufnahme zur Erhebung von Daten zur Belastung von Kleingewässern der Agrarlandschaft. Umweltbundesamt Deutschland 121–122. [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2017-10-04\\_texte\\_89-2017\\_pestizide-kleingewaesser.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2017-10-04_texte_89-2017_pestizide-kleingewaesser.pdf)
- Chiellini, C., Gori, R., Tiezzi, A., Brusetti, L., Pucciarelli, S., D'Amato, E., Chiavola, A., Sirini, P., Lubello, C., Petroni, G. (2014) Ozonation effects for excess sludge reduction on bacterial communities composition in a full-scale activated sludge plant for domestic wastewater treatment. *Environmental Technology* 35, 1462–1469. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.870588>
- Eiseler, B. (2010) Taxonomie für die Praxis. Bestimmungshilfen- Makrozoobenthos (1) LANUV-Arbeitsblatt 14. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, 119/181.
- Elliott, J.M., Humpesch, U.H., and Macan, T.T. (1988) Larvae of the British Ephemeroptera: A key with ecological notes, Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 49.

- Engelmann, U., Rohde, S., Ziegler, K. (2009) Potentielle prioritäre Stoffe in Fließgewässern und kommunalen Abwassereinleitungen in Sachsen. Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie 3–6. [https://www.wasser.sachsen.de/download/PotPriorStoffe\\_Bericht\\_2008\\_19.pdf](https://www.wasser.sachsen.de/download/PotPriorStoffe_Bericht_2008_19.pdf)
- Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M., Fridlund, B., (1994) Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. *Environment International* 20, 209–219. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0160-4120(94)90138-4)
- Gerhardt, A., Clostermann, M., (1998c) A new biomonitor system based on magnetic inductivity for freshwater and marine environments. *Environment International* 24, 699–701. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00069-5)
- Gerhardt, A., Badouin, N., Weiler, M., (2020) In situ online biomonitoring of groundwater quality using freshwater amphipods exposed to organic fertilizer and rainfall events. *Current Topics in Toxicology* 16, 13-23.
- Holzenthal, R. W., Blahnik, R. J., Prather, A. L., and Kjer, C. M. (2007) Order Trichoptera Kirby, 1813 (Insecta), Caddisflies. *Zootaxa*, 1668, 639-698.
- Hynes, H.B.N. (1970) *The Ecology of Running Waters*, Toronto: University of Toronto Press, Toronto, 555 pp.
- Kirkpatrick, A.J., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., Laming, P., Berges, J.A. (2006) Suitability of *Crangonyx pseudogracilis* (Crustacea: Amphipoda) as an early warning indicator in the multispecies freshwater biomonitor. *Environmental Science and Pollution Research* 13, 242-250. <https://doi.org/10.1065/espr2006.06.313>
- Ladle, M., and Radke, R. (1990) Burrowing and feeding behaviour of the larva of *Ephemera danica* Müller (Ephemeroptera: Ephemeridae), *Entomologist's Gazette*, 41, 113-118.
- Liess M., Von Der Ohe P. C. (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4):954-965
- López-Rodríguez, M. J., de Figueroa, J. M. T. & Alba-Tercedor, J. (2009) Life history of two burrowing aquatic insects in southern Europe: *Leuctra geniculata* (Insecta: Plecoptera) and *Ephemera danica* (Insecta: Ephemeroptera). *Aquatic Insects* 31, 99–110. <https://doi.org/10.1080/01650420802620345>
- Meier, C., Haase, P., Rolauffs, P., Schindehütte, K., Schöll, F., Sundermann, A., Hering, D. (2006), *Methodisches Handbuch Fließgewässerbewertung. Handbuch zur Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern auf der Basis des Makrozoobenthos vor dem Hintergrund der EG-Wasserrahmenrichtlinie* 110 pp. Universität Essen. [https://www.gewaesser-bewertung.de/files/meier\\_handbuch\\_mzb\\_2006.pdf](https://www.gewaesser-bewertung.de/files/meier_handbuch_mzb_2006.pdf)
- Mevik, B.-H., Wehrens, R. (2007) The pls package: Principal component and partial least squares regression in R. *Journal of Statistical Software*, 18(2): 1-24.
- Mevik, B.-H., Wehrens, R., Hovde Liland, K. (2020) pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression. R package version 2.7-3. <https://CRAN.R-project.org/package=pls>.
- Pitsch, T. (1993) Zur Larvaltaxonomie, Faunistik und Ökologie mitteleuropäischer Fließwasser-Köcherfliegen (Insecta: Trichoptera). *Landschaftsentwicklung und Umweltforschung*, Universitätsverlag der TU Berlin, Schriftenreihe des Fachbereichs Landschaftsentwicklung, Sonderheft 8, 249.
- Pottgiesser, T., Sommerhäuser, M. (2004), *Fließgewässertypologie Deutschlands: Die Gewässertypen und ihre Steckbriefe als Beitrag zur Umsetzung der EU-Wasserrahmenrichtlinie*. In: Steinberg, C., W. Calmano, R.-D. Wilken & H. Klapper (Hrsg.): *Handbuch der Limnologie*. 19. Erg.Lfg. 7/04. VIII-2.1: 1-16 und Anhang.
- Prasuhn, V., Doppler, T., Spycher, S., Stamm, C., (2018) Pflanzenschutzmitteleinträge durch Erosion und Abschwemmung reduzieren. *Agrarforschung Schweiz* 9, 44–51.

- Oberflächengewässerverordnung vom 20. Juni (2016) (BGBl. I S. 1373), Anlage 6 (zu § 2 Nummer 6, § 5 Absatz 5 Satz 1 und 2, § 10 Absatz 2 Satz 1). Umweltqualitätsnormen für flussgebietsspezifische Schadstoffe zur Beurteilung des ökologischen Zustands und des ökologischen Potenzials. Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz. 43-49. <https://www.gewaesser-bewertung.de/files/ogewv2016.pdf>
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- REACH - Verordnung (EG) 1907/2006 (2007) Europäische Chemikalienverordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:de:PDF>
- Sallanko, J., Okkonen, J. (2009) Effect of ozonation on treated municipal wastewater. J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 44, 57–61. <https://doi.org/10.1080/10934520802515350>
- Sattler, W. (1958) Beiträge zur Kenntnis von Lebensweise und Körperbau der Larve und Puppe von *Hydropsyche Pict.* (Trichoptera) mit besonderer Berücksichtigung des Netzbaues. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere, 47 (2), 115 – 92.
- Schaar, H., Kreuzinger, N., Knasmüller, S., Ferk, F., Mišík, M., Sommer, R., Schürhagl, R., Grillitsch, B., Altmann, D., Möstl, E., Bartel, K. (2011) KomOzon- Technische Umsetzung und Implementierung einer Ozonungsstufe für nach dem Stand der Technik gereinigtes kommunales Abwasser Heranführung an den Stand der Technik.
- Schaar, H. (2015) Ozonung von Kläranlagenablauf zur weitergehenden Abwasserreinigung. Dissertationsschrift, Technische Universität Wien.
- Schertzinger, G., Zimmermann, S., Sures, B. (2019) Predicted sediment toxicity downstream of combined sewer overflows corresponds with effects measured in two sediment contact bioassays. Environmental Pollution 248, 782–791.
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J., (2011) Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. Water Research 45, 1015–1024. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.008>
- Van Der Geest, H.G. (2007) Behavioural responses of caddisfly larvae (*Hydropsyche angustipennis*) to hypoxia. Contributions to Zoology 76, 255–260. <https://doi.org/10.1163/18759866-07604004>
- Wallace, J. B. (1975) The larval retreat and food of *Arctopsyche*; with phylogenetic notes on feeding adaptations in Hydropsychidae larvae (Trichoptera). Annals of the Entomological Society of America, 68 (1), 167-73.
- Wallace, J. B. & Malas, D. (1976) The significance of the elongated rectangular mesh found in capture nets of fine particle filter feeding Trichoptera larvae. Archiv für Hydrobiologie, 77 (2), 205-12.
- Waringer, J. & Graf, W. (2011) Atlas der mitteleuropäischen Köcherfliegenlarven. Erik Mauch Verlag, Dinkelscherben. 367-368.
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 58 (2): 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)



## Anhang

Anhang 1: Übersicht über die Versuchsreihen der Jahre 2018, 2019 und 2020. Artnamen: *B. vernus*: *Baetis vernus*; *E. danica*: *Ephemera danica*; *D. berilloni*: *Dikerogammarus berilloni*; *A. cinereus*: *Athripsodes cinereus*; *G. roeseli*: *Gammarus roeseli*; *R. sensu stricto*: *Rhyacophila sensu stricto*; *L. geniculata*: *Leuctra geniculata*; *H. incognita*: *Hydropsyche incognita*; *E. villosus*: *Echinogammarus villosus*

Versuch 2018	Arten	Anmerkungen	Versuch 2019	Arten	Anmerkungen	Versuch 2020	Arten	Anmerkungen
1	<i>Oretochilus sp.</i> <i>Hydropsyche sp.</i>	Computerabsturz Unverdünntes Abwasser	8	<i>H. incognita</i> <i>R. sensu stricto</i>	Sauerstoffwerte kurzfristig unter 7mg/l (CW, OW)	18	<i>E. danica</i>	Ozonanlage ausgefallen
2	<i>B. vernus</i> <i>E. danica</i>	Unverdünntes Abwasser	9	<i>E. danica</i>		19	<i>H. incognita</i> <i>L. geniculata</i>	
3	<i>B. vernus</i> <i>E. danica</i>	Unverdünntes Abwasser	10	<i>R. sensu stricto</i> <i>L. geniculata</i>	Computerabsturz	20	<i>H. incognita</i> <i>L. geniculata</i>	Versuchsablauf bis Tag 13 normal, dann Ausfall der Schaufelräder
4	<i>D. berilloni</i> <i>E. danica</i> <i>A. cinereus</i>	Unverdünntes Abwasser	11	<i>H. incognita</i> <i>L. geniculata</i>		21	<i>E. danica</i>	Schaufelräder ausgefallen
5	<i>G. roeseli</i> <i>E. danica</i>	Unverdünntes Abwasser	12	<i>H. incognita</i> <i>L. geniculata</i>		22	<i>E. danica</i>	Ozonanlage ausgefallen
6	<i>R. sensu stricto</i> <i>L. geniculata</i> <i>H. incognita</i>	Unverdünntes Abwasser	13	<i>Gammarus sp.</i> <i>E. danica</i>	Ozonanlage nach Starkregenereignis ausgefallen	23	<i>E. danica</i>	Computerabsturz Tag 3, danach Dateien teilweise nicht verwendbar
7	<i>E. villosus</i> <i>D. berilloni</i>	Unverdünntes Abwasser	14	<i>E. danica</i>	Zuläufe verstopft, Stromausfall			
			15	<i>E. danica</i>	Zuläufe verstopft			
Extra	<i>G. fossarum</i> + <i>P. minutus</i>	Publikation in Arbeit	16	<i>E. danica</i>	Ozonanlage ausgefallen			
			17	<i>E. danica</i>	Zuläufe verstopft			

### Gesamtproteinbestimmung (BCA)

Um den Gesamtproteingehalt im Probenüberstand zu analysieren, wurde das Verfahren des BCA-Protein-Assay-Kits (Pierce, Waltham, Massachusetts, USA) angewendet (vgl. Chen et al., 2015). Rinderserumalbumin-Standards (BSA) wurden entsprechend dem BCA-Assay hergestellt. Zur Herstellung der Probenlösung des BCA-Assays wurden 10 µl Aliquot des Probenüberstandes mit 90 µl Verdünnungspuffer (25 mM Tris-HCl mit pH 7,4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM EDTA, 5% Glycerin, dest. H<sub>2</sub>O) aufgefüllt. 25 µl jedes Standards und jeder verdünnten Probe wurden in dreifacher Ausführung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Schließlich wurden 200 µl Lösung der Mischung aus Reagenz A und Reagenz B (20 µl Reagenz B pro ml Reagenz A) in jedes Well gegeben und umgehend im Plattenlesegerät (Tecan infinite M200, Männedorf, Schweiz) bei 562 nm, 37° C gemessen. Es wurde eine Standardkurve erstellt, indem die durchschnittlichen leerwertkorrigierten Werte für jeden BCA-Standard gegen seine Konzentration in µg pro ml aufgetragen wurden, um den Gesamtproteingehalt in den unbekanntenen Proben zu bestimmen.

### Bestimmung der Katalase-Aktivität

Um die Aktivität der Katalase in den jeweiligen Proben zu analysieren, wurde eine photometrische Messung des Abfalls der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration durch die Katalaseaktivität in der Probe durchgeführt (Beers und Sizer, 1952; Brand et al., 2019) Es wurden zunächst Standardlösungen durch Mischen von 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stammlösung und 25 mM Tris-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,4) hergestellt. Die Probenaliquote wurden verdünnt, um eine Gesamtproteinkonzentration von etwa 5 bis 10 µg pro ml für jede Probe zu erreichen. 300 µl jedes Standards in dreifacher Ausführung wurden in eine 96-UV-Well-Platte übertragen. 210 µl jeder Probe wurden in dreifacher Ausführung in die Well-Platte pipettiert und 90 µl 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden im Plattenlesegerät zu den Proben gegeben. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe im Plattenlesegerät bei 240 nm über einen Zeitraum von vier Minuten und einer Messung alle 15 s bei 25° C. Um die Einheiten der Katalase (U) pro mg Gesamtprotein zu berechnen, wurde die Extinktion pro Minute ( $\Delta E_{240}$ ) mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\Delta E_{240} = \frac{E_{240} \text{Time1} - E_{240} \text{Time2}}{\text{Time2 [min]} - \text{Time1 [min]}}$$

Durch Division des  $\Delta E$ -Wertes mit der Steigung (a) der Standardverdünnung wurde die Änderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration pro Minute ( $\Delta C$ ) mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\Delta C \left[ \frac{mM}{min} \right] = \frac{\Delta E \left[ \frac{E}{min} \right]}{a \left[ \frac{E}{mM} \right]} = \Delta E \left[ \frac{E}{min} \right] * \frac{1}{a} \left[ \frac{mM}{E} \right]$$

Das Ergebnis wurde dann mit 0,3 multipliziert, um µM pro min pro Well zu erhalten, was Einheiten (U) pro Well entspricht, und dann durch das Gesamtprotein pro Well in µg geteilt.

## Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase (GST) wurde photometrisch bestimmt, indem die Zunahme der Absorption des Glutathion-Dinitrobenzol-Konjugats bei 340 nm über die Zeit gemessen wurde (Boylund und Chasseaud, 1969; Brand et al., 2019). Zur Analyse der Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität wurden die Proben 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Eine Reagenzienmischung wurde mit 0,01 M Phosphatpuffer (35,2 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 32,4ml 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8g NaCl, 0,2g KCl) mit pH 6,5, 200 mM Glutathion und 100 mM 1-Chlor, 2, 4-dinitrobenzol (CDNB) hergestellt. Phosphatpuffer wurde als Blank verwendet (ein Triplikat) und 5 µl von jeder Probe wurden in Triplikaten in die UV-transparente 96-Well-Platte pipettiert. Jedes Well wurde dann mit dem Reagenzienmix auf 200 µl aufgefüllt. Die Messung erfolgte bei 340nm bei 25°C mit für 5 min alle 30 s im Plattenlesegerät (Tecan infinite M200, Männedorf, Schweiz).

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität von GST pro mg Gesamtprotein wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{\frac{\Delta A_{340}}{\text{min}} * V(\text{ml}) * \text{dil}}{\epsilon_{mM} * V_{enz}(\text{ml})} = \mu \text{mol/ml / min}$$

Dabei steht  $V$  für das Reaktionsvolumen von 0,2 ml,  $V_{enz}$  entspricht dem Volumen des Enzyms in der getesteten Probe,  $\text{dil}$  dem Verdünnungsfaktor der ursprünglichen Probe und  $\epsilon_{mM}$  dem Extinktionskoeffizienten für das CDNB-Konjugat bei 340 nm.

Die Aktivität von GST ist direkt proportional zum Anstieg der Extinktion. Die Linearitätsbestimmung wurde durch Auftragen der Absorptionswerte gegen die Zeit gemessen. Die Änderung der Absorption ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) im linearen Bereich des Plots wird berechnet, indem der Anfangsmesswert vom Endmesswert subtrahiert und der resultierende Wert anschließend durch die Reaktionszeit dividiert wird. Der Blindwert wird ebenfalls vom Probenwert subtrahiert. Die GST-Aktivität jeder Probe wird durch das Gesamtprotein im Probenvolumen geteilt, um U/ µg Gesamtprotein zu erhalten.

## Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität

Die kolorimetrische Bestimmung der Cholinesterase-Aktivitäten wurde nach Ellman's Assay (Ellman et al., 1961) mit Modifikationen durchgeführt. Zur Durchführung der Analyse wurde Ellman's Reagenz aus 0,1 M Phosphatpuffer (57,7 ml 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 42,3 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit pH 7,0 und 0,5mM DTNB (5,5' -Dithio-bis 2-Nitrobenzoesäure) hergestellt. Eine 20 mM Lösung des Substrats (Acetylthiocholinjodid) wurde vorbereitet und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. 50 µl der Proben wurden in eine 96-Well-UV-transparente Platte gegeben; Phosphatpuffer wurde als Blank verwendet. 140 µl Ellman's-Reagenz (1,25 ml DTNB und 48,75 ml 0,1 M Phosphatpuffer) wurden in die Wells gegeben. Schließlich wurden 10 µl des Substrats dazugegeben, um die endgültige Reaktionskonzentration von 70 mM Phosphatpuffer, 0,425 mM DTNB und 1mM Acetylthiocholin zu erhalten. Spektrophotometrische Messungen (412nm, 25°C) wurden alle 30s für 10 min mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite M200, Männedorf, Schweiz) durchgeführt. Der Anstieg der Absorptionsrate wurde korrigiert, indem die für den Reagenzienleerwert (ohne Probe) beobachtete Rate von jeder Probe abgezogen wurde. Die Cholinesterase-Aktivitäten wurden unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 13,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für DTNB berechnet und werden als Einheiten (1 U ≡ 1 µmol ≡ 1000 nmol hydrolysiertes Substrat pro min) pro

Masseneinheit des Gesamtproteins im Probenvolumen ausgedrückt. Der Lichtweg,  $l$ , beträgt 0,51969 cm für 200  $\mu$ l Gesamtvolumen pro Well.

### **Glykogenanalyse**

Der Glykogen- und Lipidgehalt wurden nach Van Handel (1985a; 1985b), modifiziert nach Chen et al. (2015) analysiert. Um den Glykogengehalt der Versuchsorganismen zu bestimmen, wurden 40  $\mu$ l des bei der BCA-Analyse erhaltenen Probenaliquots verwendet. Zu 40  $\mu$ l des Gesamthomogenats wurden 20  $\mu$ l 2 %ige  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und 540  $\mu$ l einer Chloroform-Methanol-Lösung (1:2; v/v) hinzugefügt. Es folgten eine einstündige Inkubation auf Eis und anschließend eine Zentrifugation bei 3000 rcf für 10 min bei 4°C. Der erhaltene Überstand wurde zur Bestimmung des Lipidgehalts der Proben verwendet und die Pellets wurden zur Analyse des Glykogengehalts verwendet. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l MiliQ-Wasser gelöst und es wurden Glukose-Standardlösungen von 25, 50, 100, 150, 200 und 400  $\mu$ g pro ml hergestellt.

100  $\mu$ l der Proben und der Standardlösung wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 4,9 ml Anthron-Reagenz (0,2 %ige Anthron-Lösung, 95 %ige Schwefelsäure) zugegeben. Die Proben und Standards wurden für 17 min bei 95 °C erhitzt, 20 s lang mittels Vortexmischer vermengt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Messung erfolgte mit 300  $\mu$ l Teilproben der Lösung in Triplikaten in einer 96-Well-Platte bei 625 nm in einem Plattenlesegerät (Tecan infinite M200, Männedorf, Schweiz). Der Glykogengehalt wurde bestimmt, indem die durchschnittlichen leerwertkorrigierten Messungen jedes Glykogenstandards gegen die Konzentration in  $\mu$ g/ml aufgetragen wurden. Die Standardkurve wurde anschließend zur Bestimmung des Glykogengehalts in den Versuchsproben verwendet.

### **Lipidanalyse**

Um den Lipidgehalt der Testorganismen zu analysieren, wurden Cholesterinstandards hergestellt, indem 100  $\mu$ l einer Stammlösung von 10 mg pro ml Cholesterin mit 900  $\mu$ l Chloroform-Methanol gemischt wurden (um 1 mg pro ml Stammlösung herzustellen). Eine weitere Stammlösung (0,1 mg/ml) wurde durch Mischen von 100  $\mu$ l von 1mg pro Liter Stammlösung mit 900  $\mu$ l Chloroform-Methanol hergestellt. Cholesterin-Standardlösungen wurden in Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss in den folgenden Konzentrationen hergestellt: 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000  $\mu$ g pro ml. 100  $\mu$ l jedes Probenüberstandes, der bei der Glykogenanalyse gewonnen wurde, wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss überführt. Die Proben und die Standards wurden unter dem Abzug bei 90° C für 15 Minuten eingedampft. Zu jeder Probe und den Standards wurden 200  $\mu$ l 95 %ige Schwefelsäure zugegeben und die Proben und Standards anschließend bei 90° C für 10 min inkubiert. Die Proben wurden dann auf Eis abgekühlt und 15 ml Falcon-Röhrchen wurden mit 4,8 ml Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz in jedes der Falcon-Röhrchen vorbereitet. 200  $\mu$ l von jeder Probe und jedem Standard wurden in 4,8 ml Vanillin-Phosphorsäure-Reagenz (450 mg Vanillin verdünnt in 75 ml heißem Wasser und 300 ml 85 %iger Phosphorsäure) überführt und jedes Röhrchen wurde mittels Vortexmischer vermengt. Nach dem Mischen wurden 300  $\mu$ l der Proben und Standards in Triplikaten in 96-Well-Platten gegeben und in der Mikrotiterplatte bei 535 nm gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Tecan infinite M200 Plattenlesegerät (Männedorf, Schweiz). Die durchschnittlichen Blank-korrigierten Messungen jedes Cholesterinstandards wurden gegen die Konzentration in  $\mu$ g pro ml aufgetragen. Die aufgetragene Standardkurve wurde anschließend zur Berechnung des Lipidgehalts in den Versuchsproben verwendet.

## Bestimmung der Lipidperoxidation

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde photometrisch durch Quantifizierung von Malondialdehyd (MDA) in einer Thiobarbitursäurelösung (TBA) bestimmt (Kohn und Liversedge, 1944). Um die Lipidperoxidation in den Proben zu analysieren, wurden MDA-Standards hergestellt, indem 0, 5, 10, 20 und 40 µl einer 0,2 Mm MDA-Stammlösung zum Verdünnungspuffer hinzugefügt und auf 200 µl aufgefüllt wurden. Die Proben wurden 3-fach mit Verdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden 110 µl des Probenüberstandes und der Standards in 2ml-Schraubdeckeltubes pipettiert. 27,5 µl einer 8,1%igen Natriumaurylsulfat (SDS)-Lösung wurden zu den Proben und Standards gegeben und diese wurden mittels Vortexmischer vermengt. 440 µl Färbereagenz, eine Mischung aus 10 %iger Trichlorsäure (TCA) und 0,5 %iger Thiobarbitursäure (TBA), wurden in jedes Röhrchen gegeben und für 20 Minuten im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Die Reaktionsgefäße wurden zum Abkühlen für 5 min auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen wurden sie mittels Vortexmischer vermengt und bei 4000 \*g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die 96-Well-Platte wurde in dreifacher Ausführung mit 150 µl Überstand pro Well beladen. Die Absorption des MDA-TBA- Komplexes wurde bei 532 nm mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite M200, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Standardkurve wurde zur Bestimmung der Probenkonzentration verwendet und die Werte wurden in nmol MDA-Konjugat pro mg Gesamtprotein angegeben.

Anhang 3: Übersicht der 50 analysierten Mikroschadstoffe, zugeordnet zu acht Stoffklassen (abgekürzt als AN=Antibiotika, PA=Schmerzmittel, PS=Psychopharmaka, Röntgenkontrastmittel (XR), Betablocker (BE), Andere Pharmazeutika (OT), Industriechemikalien (IN) und Pflanzenschutzmittel (AG)), getrennt nach Versuchswässern. Angegeben sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung, (erster Tabellenteil), Median, minimale und maximale Stoffkonzentration (zweiter Tabellenteil).

Substanzname	Abkürzung	Spurenstoffklasse		Mittelwert						Standardabweichung					
				RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020
Sulfamethoxazol	AN_Sulfame	Antibiotika	µg/L	0,040	0,059	0,403	0,240	0,116	0,165	0,004	0,067	0,194	0,120	0,064	0,087
Ranitidin	AN_Ranitid	Antibiotika	µg/L	0,005	0,005	0,047	0,006	0,020	0,005	0,000	0,000	0,024	0,002	0,013	0,000
Azithromycin	AN_Azithro	Antibiotika	µg/L	0,005	0,021	0,201	0,079	0,066	0,060	0,000	0,024	0,146	0,053	0,062	0,068
Clarithromycin	AN_Clarith	Antibiotika	µg/L	0,010	0,024	0,196	0,078	0,060	0,053	0,004	0,021	0,150	0,040	0,054	0,030
Clindamycin	AN_Clindam	Antibiotika	µg/L	0,012	0,016	0,090	0,088	0,030	0,061	0,003	0,022	0,052	0,037	0,020	0,023
Sulfapyridin	AN_Sulfapy	Antibiotika	µg/L	0,036	0,082	0,646	0,785	0,192	0,416	0,005	0,202	0,307	0,409	0,113	0,180
Trimethoprim	AN_Trimeth	Antibiotika	µg/L	0,006	0,014	0,126	0,044	0,033	0,030	0,003	0,020	0,071	0,028	0,023	0,017
<b>Diclofenac</b>	PA_Diclofe	Schmerzmittel	µg/L	0,058	0,117	0,937	1,037	0,234	0,574	0,018	0,256	0,470	0,527	0,143	0,285
4-Acetamidoantipyrin	PA_4Acetam	Schmerzmittel	µg/L	0,261	0,314	0,722	0,914	0,594	1,349	0,071	0,241	0,331	0,422	0,225	0,532
4-Formylaminoantipyrin	PA_4Formyl	Schmerzmittel	µg/L	0,545	0,752	3,995	3,252	1,233	2,334	0,077	0,824	1,663	1,367	0,570	0,923
<b>4'-Hydroxydiclofenac</b>	PA_4Hydrox	Schmerzmittel	µg/L	0,015	0,027	0,136	0,129	0,033	0,090	0,000	0,055	0,081	0,070	0,033	0,044
Amisulprid	PS_Amisulp	Psychopharmaka	µg/L	0,014	0,024	0,169	0,135	0,052	0,081	0,004	0,028	0,069	0,067	0,031	0,039
Citalopram	PS_Citalop	Psychopharmaka	µg/L	0,006	0,012	0,094	0,081	0,036	0,057	0,003	0,019	0,041	0,036	0,025	0,026
Oxazepam	PS_Oxazepa	Psychopharmaka	µg/L	0,006	0,013	0,103	0,081	0,037	0,052	0,002	0,017	0,046	0,039	0,027	0,024
Desvenlafaxin	PS_Desvenl	Psychopharmaka	µg/L	0,056	0,074	0,401	0,416	0,110	0,243	0,007	0,085	0,156	0,182	0,038	0,095
Venlafaxin	PS_Venlafa	Psychopharmaka	µg/L	0,027	0,037	0,203	0,187	0,064	0,116	0,005	0,043	0,087	0,084	0,037	0,050
Amidotrizoesäure	XR_Amidotr	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,134	0,268	2,627	2,558	1,515	1,735	0,035	0,340	2,430	1,877	1,636	1,289
Iohexol	XR_Iohexol	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,200	0,296	0,184	1,686	0,154	1,654	0,086	0,687	0,104	0,922	0,091	0,755
Iopamidol	XR_Iopamid	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,027	0,057	0,389	0,394	0,162	0,322	0,008	0,088	0,317	0,221	0,136	0,172
Iopromid	XR_Iopromi	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,114	0,103	2,315	0,209	1,314	0,231	0,085	0,066	1,828	0,110	1,652	0,136
Metoprolol	BE_Metopro	Betablocker	µg/L	0,091	0,142	1,152	0,959	0,385	0,659	0,015	0,250	0,595	0,490	0,333	0,319
Candesartan	BE_Candes	Betablocker	µg/L	0,195	0,229	1,081	1,149	0,372	0,776	0,028	0,278	0,412	0,517	0,202	0,337
Hydrochlorothiazid	BE_Hydroch	Betablocker	µg/L	0,049	0,112	1,014	0,920	0,284	0,545	0,013	0,234	0,470	0,437	0,244	0,251
Irbesartan	BE_Irbesar	Betablocker	µg/L	0,033	0,062	0,518	0,309	0,174	0,205	0,007	0,076	0,227	0,142	0,124	0,094
Telmisartan	BE_Telmisa	Betablocker	µg/L	0,052	0,110	0,942	0,858	0,285	0,544	0,016	0,234	0,452	0,427	0,200	0,287
Valsartansäure	BE_Valsart	Betablocker	µg/L	0,247	0,234	0,874	1,075	0,313	0,675	0,037	0,210	0,319	0,469	0,129	0,297
Guanylurea	BE_Guanyl	Betablocker	µg/L	2,615	5,475	20,000	13,943	10,165	7,493	0,604	10,310	7,607	11,637	3,993	3,443

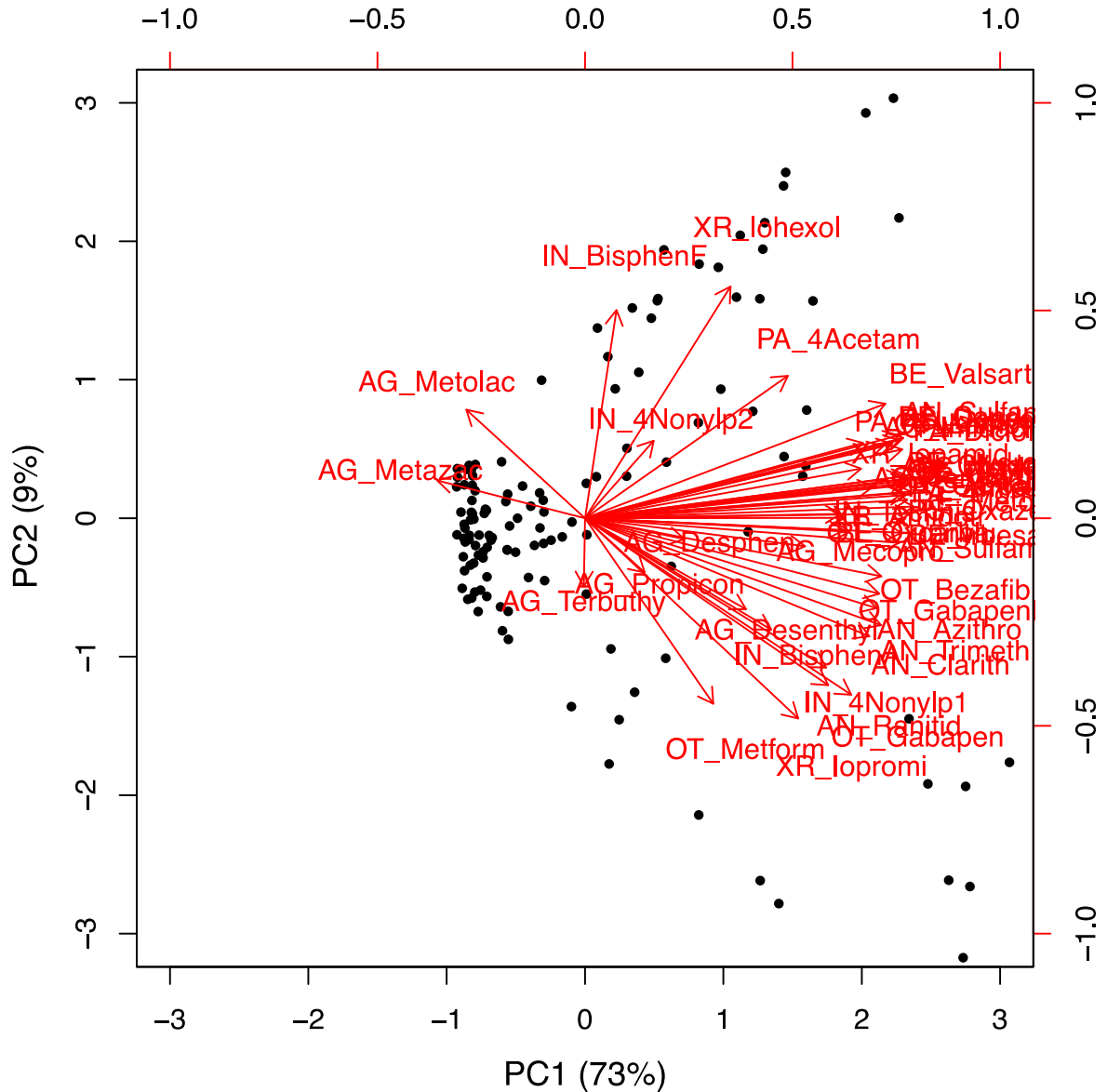
Substanzname	Abkürzung	Spurenstoffklasse		Mittelwert						Standardabweichung					
				RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020
Oxypurinol	OT_Oxypuri	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,907	1,392	9,400	8,717	4,425	6,393	0,213	2,039	4,215	4,287	3,221	3,318
10,11-Dihydro-10,11-Dihydroxycarbamazepin	OT_1011Dih	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,146	0,164	0,675	0,639	0,277	0,464	0,025	0,141	0,309	0,255	0,150	0,177
Gabapentin	OT_Gabapen	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,297	0,426	2,619	0,970	1,551	0,766	0,069	0,277	1,991	0,353	1,294	0,264
Lamotrigin	OT_Lamotri	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,108	0,117	0,423	0,448	0,216	0,323	0,011	0,073	0,134	0,204	0,101	0,155
Metformin	OT_Metform	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,464	0,424	0,686	0,480	0,738	0,439	0,222	0,097	0,317	0,147	0,496	0,159
Gabapentin-Lactam	OT_GabapenL	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,075	0,102	0,613	0,389	0,202	0,208	0,008	0,126	0,462	0,158	0,145	0,099
Carbamazepin	OT_Carbama	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,057	0,073	0,312	0,256	0,093	0,154	0,007	0,053	0,131	0,109	0,026	0,054
Oxcarbazepin	OT_Oxcarba	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,010	0,013	0,146	0,111	0,045	0,089	0,004	0,037	0,116	0,107	0,054	0,050
Bezafibrat	OT_Bezafib	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,008	0,018	0,211	0,092	0,071	0,102	0,003	0,025	0,121	0,043	0,060	0,053
Technisches Nonylphenol	IN_Technis	Industriechemikalien	µg/L	0,010	0,012	0,028	0,027	0,017	0,021	0,005	0,009	0,010	0,009	0,009	0,009
4-Nonylphenol-1-ethoxylat	IN_4Nonylp	Industriechemikalien	µg/L	0,005	0,011	0,026	0,014	0,016	0,012	0,003	0,003	0,013	0,005	0,007	0,004
4-Nonylphenol-2-ethoxylat	IN_4Nonylp	Industriechemikalien	µg/L	0,005	0,010	0,013	0,012	0,008	0,011	0,002	0,007	0,008	0,006	0,005	0,005
Bisphenol A	IN_BisphenA	Industriechemikalien	µg/L	0,009	0,015	0,022	0,014	0,015	0,014	0,004	0,008	0,013	0,005	0,008	0,008
Bisphenol F	IN_BisphenF	Industriechemikalien	µg/L	0,014	0,004	0,003	0,015	0,003	0,015	0,006	0,003	0,001	0,005	0,001	0,005
Mecoprop (MCPP)	AG_Mecopro	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,009	0,007	0,035	0,027	0,015	0,018	0,006	0,007	0,019	0,018	0,015	0,010
Desphenylchloridazon	AG_Desphen	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,015	0,015	0,017	0,015	0,014	0,015	0,000	0,004	0,005	0,000	0,004	0,000
Terbutryn	AG_Terbutr	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,006	0,031	0,027	0,010	0,028	0,000	0,002	0,018	0,018	0,008	0,015
Imidacloprid	AG_Imidacl	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,003	0,003	0,013	0,016	0,006	0,010	0,001	0,003	0,006	0,007	0,004	0,006
Metazachlor ESA	AG_Metazac	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,035	0,035	0,028	0,025	0,026	0,025	0,003	0,009	0,009	0,006	0,010	0,005
Metolachlor ESA	AG_Metolac	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,017	0,015	0,015	0,015	0,009	0,014	0,001	0,003	0,004	0,004	0,004	0,005
Desethylterbutylazin	AG_Desenthyl	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,006	0,010	0,008	0,009	0,008	0,000	0,003	0,009	0,005	0,007	0,005
Terbutylazin	AG_Terbuty	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,025	0,018	0,005	0,019	0,005	0,000	0,047	0,024	0,001	0,032	0,000
Propiconazol	AG_Propicon	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,006	0,007	0,008	0,006	0,006	0,007	0,002	0,003	0,004	0,003	0,003	0,004

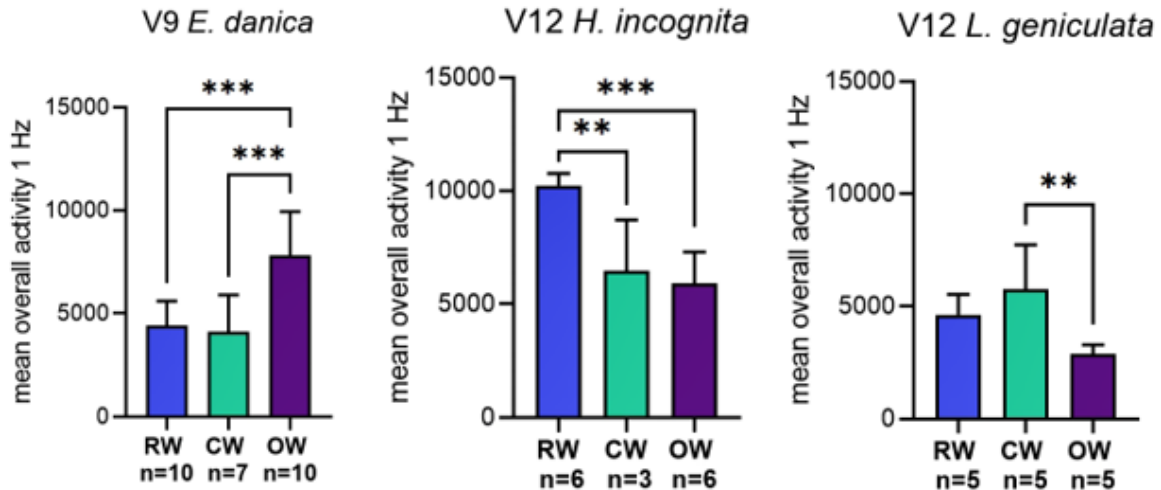
Substanzname	Abkürzung	Spurenstoffklasse		Median						Maximum						Minimum					
				RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020
Sulfamethoxazol	AN_Sulfame	Antibiotika	µg/L	0,039	0,046	0,450	0,240	0,092	0,140	0,049	0,340	0,790	0,420	0,280	0,330	0,032	0,018	0,087	0,035	0,038	0,065
Ranitidin	AN_Ranitid	Antibiotika	µg/L	0,005	0,005	0,047	0,005	0,020	0,005	0,005	0,005	0,098	0,012	0,048	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Azithromycin	AN_Azithro	Antibiotika	µg/L	0,005	0,015	0,145	0,070	0,035	0,044	0,005	0,120	0,550	0,230	0,210	0,290	0,005	0,005	0,035	0,005	0,005	0,016
Clarithromycin	AN_Clarith	Antibiotika	µg/L	0,011	0,020	0,135	0,080	0,039	0,049	0,015	0,110	0,480	0,150	0,190	0,130	0,005	0,011	0,038	0,012	0,011	0,020
Clindamycin	AN_Clindam	Antibiotika	µg/L	0,013	0,012	0,088	0,098	0,023	0,065	0,018	0,110	0,190	0,130	0,073	0,092	0,005	0,005	0,020	0,012	0,005	0,023
Sulfapyridin	AN_Sulfapy	Antibiotika	µg/L	0,037	0,037	0,645	0,830	0,185	0,390	0,044	0,940	1,300	1,400	0,460	0,670	0,027	0,020	0,120	0,045	0,044	0,120
Trimethoprim	AN_Trimeth	Antibiotika	µg/L	0,005	0,011	0,105	0,042	0,023	0,031	0,014	0,099	0,240	0,110	0,085	0,064	0,005	0,005	0,021	0,005	0,005	0,005
Diclofenac	PA_Diclofe	Schmerzmittel	µg/L	0,057	0,061	0,950	1,100	0,190	0,510	0,098	1,200	1,900	2,000	0,600	1,200	0,026	0,026	0,180	0,070	0,047	0,180
4-Acetamidoantipyrin	PA_4Acetam	Schmerzmittel	µg/L	0,270	0,255	0,695	0,875	0,540	1,450	0,360	1,300	1,400	2,100	1,100	2,200	0,150	0,170	0,300	0,330	0,200	0,490
4-Formylaminoantipyrin	PA_4Formyl	Schmerzmittel	µg/L	0,520	0,540	3,650	3,200	1,100	2,350	0,670	4,200	6,500	5,200	2,800	3,600	0,450	0,270	1,200	0,650	0,550	0,880
4-Hydroxydiclofenac	PA_4Hydrox	Schmerzmittel	µg/L	0,015	0,015	0,125	0,115	0,015	0,087	0,015	0,260	0,350	0,310	0,150	0,170	0,015	0,015	0,033	0,015	0,015	0,015
Amisulprid	PS_Amisulp	Psychopharmaka	µg/L	0,014	0,018	0,185	0,145	0,048	0,071	0,023	0,140	0,270	0,240	0,130	0,160	0,005	0,005	0,039	0,014	0,016	0,027
Citalopram	PS_Citalop	Psychopharmaka	µg/L	0,005	0,005	0,105	0,091	0,030	0,053	0,011	0,093	0,160	0,130	0,094	0,110	0,005	0,005	0,020	0,005	0,005	0,018
Oxazepam	PS_Oxazepa	Psychopharmaka	µg/L	0,005	0,008	0,105	0,087	0,027	0,048	0,012	0,084	0,190	0,130	0,096	0,089	0,005	0,005	0,025	0,005	0,005	0,016
Desvenlafaxin	PS_Desvenl	Psychopharmaka	µg/L	0,056	0,055	0,470	0,430	0,110	0,235	0,070	0,430	0,630	0,690	0,190	0,400	0,046	0,033	0,100	0,058	0,045	0,098
Venlafaxin	PS_Venlafa	Psychopharmaka	µg/L	0,026	0,027	0,210	0,185	0,051	0,110	0,038	0,220	0,320	0,320	0,160	0,220	0,018	0,017	0,051	0,027	0,023	0,046
Amidotrizoesäure	XR_Amidotr	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,140	0,205	1,800	2,300	0,790	1,450	0,210	1,700	8,800	6,100	6,700	4,700	0,086	0,082	0,330	0,160	0,190	0,470
Iohexol	XR_Iohexol	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,200	0,130	0,155	1,600	0,105	1,750	0,330	3,200	0,430	4,000	0,360	2,800	0,075	0,050	0,050	0,190	0,050	0,390
Iopamidol	XR_Iopamid	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,025	0,025	0,330	0,330	0,104	0,310	0,054	0,420	1,500	0,740	0,590	0,730	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,064
Iopromid	XR_Iopromi	Röntgenkontrastmittel	µg/L	0,087	0,087	1,750	0,170	0,585	0,180	0,340	0,320	8,000	0,490	6,500	0,490	0,025	0,025	0,160	0,089	0,071	0,067
Metoprolol	BE_Metopro	Betablocker	µg/L	0,089	0,090	1,150	0,955	0,250	0,605	0,120	1,200	2,200	1,900	1,200	1,400	0,072	0,049	0,210	0,097	0,063	0,220
Candesartan	BE_Candesar	Betablocker	µg/L	0,190	0,170	1,150	1,150	0,310	0,685	0,250	1,400	1,700	2,000	0,880	1,400	0,160	0,076	0,310	0,220	0,170	0,310
Hydrochlorothiazid	BE_Hydroch	Betablocker	µg/L	0,051	0,059	1,000	0,960	0,215	0,525	0,076	1,100	2,200	1,600	1,100	0,980	0,028	0,028	0,220	0,064	0,048	0,160
Irbesartan	BE_Irbesar	Betablocker	µg/L	0,033	0,045	0,595	0,310	0,135	0,200	0,046	0,380	0,890	0,520	0,500	0,360	0,023	0,024	0,110	0,035	0,032	0,060
Telmisartan	BE_Telmisa	Betablocker	µg/L	0,050	0,057	1,050	0,920	0,240	0,470	0,086	1,100	1,800	1,500	0,780	1,200	0,021	0,031	0,180	0,063	0,046	0,170
Valsartansäure	BE_Valsart	Betablocker	µg/L	0,250	0,200	0,940	1,100	0,260	0,575	0,300	1,100	1,500	2,000	0,600	1,400	0,200	0,073	0,300	0,240	0,170	0,320
Guanylurea	BE_Guanylu	Betablocker	µg/L	2,700	3,200	19,000	10,500	10,500	6,750	3,500	49,000	30,000	51,000	18,000	14,000	1,700	1,700	5,500	3,300	2,300	3,600



Substanzname	Abkürzung	Spurenstoffklasse		Median						Maximum						Minimum					
				RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020	RW 2019	RW 2020	CW 2019	CW 2020	OW 2019	OW 2020
Oxypurinol	OT_Oxypuri	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,930	0,910	10,500	9,000	2,950	6,250	1,300	9,900	16,000	16,000	12,000	15,000	0,570	0,270	2,100	0,540	1,100	1,900
10,11-Dihydro-10,11-Dihydroxycarbamazepin	OT_1011Dih	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,140	0,140	0,620	0,675	0,255	0,435	0,190	0,740	1,300	0,980	0,590	0,790	0,110	0,060	0,150	0,150	0,100	0,210
Gabapentin	OT_Gabapen	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,320	0,370	1,600	0,990	0,950	0,715	0,390	1,500	6,000	1,800	4,500	1,300	0,180	0,220	0,380	0,390	0,250	0,370
Lamotrigin	OT_Lamotri	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,110	0,100	0,445	0,450	0,185	0,295	0,130	0,410	0,590	0,920	0,440	0,770	0,093	0,036	0,140	0,083	0,088	0,160
Metformin	OT_Metform	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,380	0,415	0,600	0,445	0,575	0,405	0,860	0,630	1,600	0,760	2,400	0,750	0,210	0,270	0,360	0,280	0,320	0,190
Gabapentin-Lactam	OT_GabapenL	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,078	0,074	0,380	0,365	0,130	0,175	0,087	0,630	1,400	0,650	0,530	0,450	0,056	0,028	0,110	0,110	0,074	0,096
Carbamazepin	OT_Carbama	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,054	0,064	0,325	0,260	0,089	0,140	0,072	0,290	0,520	0,460	0,160	0,260	0,050	0,026	0,095	0,053	0,052	0,079
Oxcarbazepin	OT_Oxcarba	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,012	0,005	0,130	0,087	0,029	0,075	0,014	0,170	0,480	0,410	0,220	0,180	0,005	0,005	0,018	0,011	0,005	0,021
Bezafibrat	OT_Bezafib	Andere Pharmazeutika	µg/L	0,005	0,014	0,190	0,093	0,056	0,115	0,013	0,120	0,440	0,150	0,230	0,190	0,005	0,005	0,031	0,011	0,005	0,028
Technisches Nonylphenol	IN_Technis	Industriechemikalien	µg/L	0,012	0,010	0,025	0,024	0,013	0,021	0,016	0,045	0,048	0,044	0,035	0,044	0,003	0,005	0,013	0,015	0,007	0,006
4-Nonylphenol-1-ethoxylat	IN_4Nonylp	Industriechemikalien	µg/L	0,003	0,011	0,020	0,015	0,014	0,011	0,010	0,021	0,046	0,023	0,032	0,021	0,003	0,007	0,011	0,003	0,009	0,007
4-Nonylphenol-2-ethoxylat	IN_4Nonylp	Industriechemikalien	µg/L	0,006	0,011	0,011	0,011	0,008	0,011	0,008	0,024	0,036	0,028	0,020	0,022	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Bisphenol A	IN_BisphenA	Industriechemikalien	µg/L	0,008	0,012	0,020	0,014	0,012	0,011	0,018	0,031	0,050	0,028	0,032	0,037	0,003	0,004	0,006	0,003	0,005	0,006
Bisphenol F	IN_BisphenF	Industriechemikalien	µg/L	0,016	0,003	0,003	0,016	0,003	0,016	0,020	0,013	0,006	0,021	0,006	0,020	0,005	0,002	0,002	0,005	0,002	0,004
Mecoprop (MCPP)	AG_Mecopro	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,007	0,003	0,034	0,023	0,009	0,018	0,019	0,029	0,075	0,081	0,059	0,046	0,003	0,003	0,007	0,011	0,003	0,006
Desphenylchloridazon	AG_Desphen	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,015	0,015	0,015	0,015	0,014	0,015	0,015	0,025	0,031	0,015	0,023	0,015	0,015	0,005	0,012	0,015	0,005	0,015
Terbutryn	AG_Terbutr	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,005	0,032	0,017	0,005	0,026	0,005	0,016	0,063	0,058	0,029	0,059	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Imidacloprid	AG_Imidacp	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,003	0,003	0,012	0,017	0,003	0,012	0,007	0,015	0,022	0,027	0,015	0,017	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Metazachlor ESA	AG_Metazac	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,035	0,036	0,026	0,026	0,027	0,026	0,039	0,047	0,042	0,039	0,042	0,034	0,031	0,015	0,015	0,014	0,005	0,016
Metolachlor ESA	AG_Metolac	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,017	0,014	0,014	0,016	0,011	0,015	0,019	0,021	0,021	0,018	0,018	0,025	0,014	0,011	0,010	0,005	0,005	0,005
Desethylterbutylazin	AG_Desethyl	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,019	0,037	0,021	0,028	0,019	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Terbutylazin	AG_Terbuty	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,009	0,012	0,005	0,011	0,005	0,005	0,210	0,110	0,010	0,150	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Propiconazol	AG_Propicon	Pflanzenschutzmittel	µg/L	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,013	0,013	0,017	0,016	0,012	0,021	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005

Anhang 4: PCA-Biplot der skalierten Konzentrationen von 50 Mikroschadstoffen zur Darstellung der Kollinearität im Datensatz. Die Skalierung erfolgte über eine z-Transformation der Konzentrationswerte jedes Mikroschadstoffes (Mittelwert = 0, Standardabweichung = 1). Die Mehrzahl der Mikroschadstoffe ist hoch miteinander korreliert und wird durch die erste Hauptkomponente (PC1) repräsentiert. Die Lesbarkeit wurde nicht erhöht, da sie für die Interpretation des Ergebnisses nicht relevant ist (Abkürzungen s. Anhang 3).





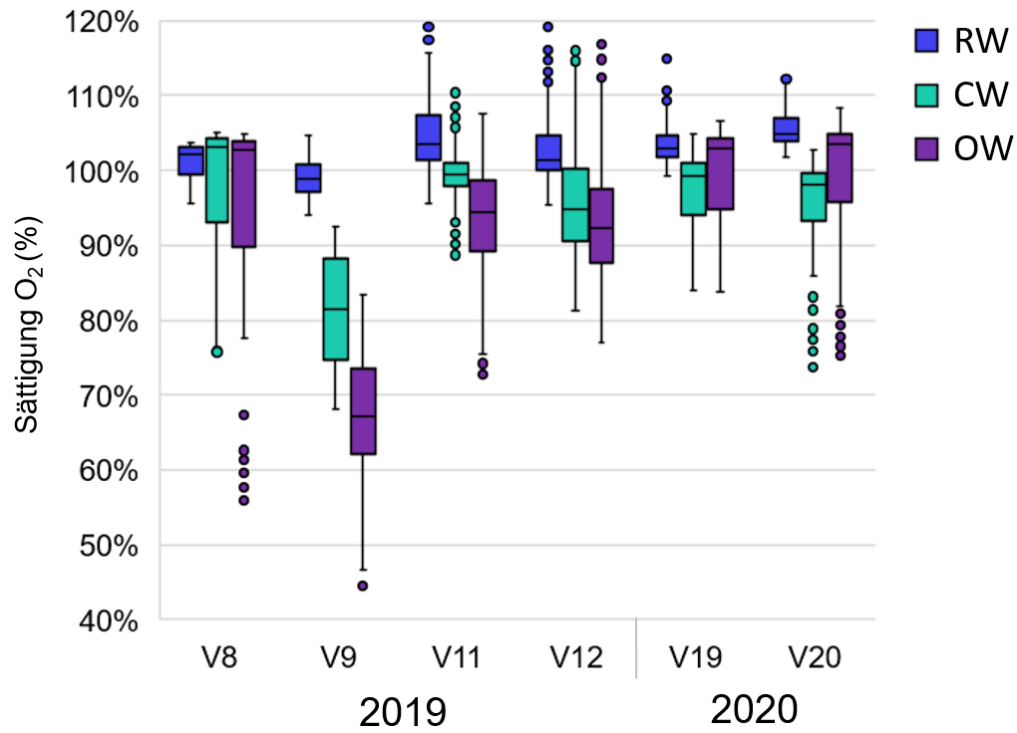
Anhang 5: Gesamtaktivität von *E. danica*, *L. geniculata* und *H. incognita* in den Versuchen der Jahre 2019 (V9, 12), welche von Sauerstoffdefiziten beeinflusst waren (s. Anhang 5). Dargestellt ist die Gesamtaktivität jedes überlebenden Tieres, zusammengefasst in den Gruppen RW (Ruhrwasser), CW (konventionell behandeltes Abwasser) und OW (zusätzlich ozoniertes Abwasser) über den Zeitraum des jeweiligen Versuchs. \*: signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: hoch signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*: höchst signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,001$ ).

Anhang 6: Tägliche Aktivität jedes überlebenden Versuchstiers, getestet gegenüber den Faktoren Wasser (Treatment), Versuchstag (Day), Sauerstoffunterschreitung („Oxy“, Grenzwert: 7mg/L) und Temperaturüberschreitung („Temp“, Grenzwert: 23°C) am jeweiligen Versuchstag. Getestet wurde auf signifikanten Einfluss der Faktoren auf das Verhalten der Versuchstiere mithilfe einer ANOVA und anschließendem Tukey post-hoc Test, zunächst mit allen verfügbaren Faktoren (grau markiert), dann in einem zweiten Schritt unter Ausschluss des Faktors „treat“. \*: signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ), \*\*: hoch signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*: höchst signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,001$ ).

		treat	oxy	day	oxy\$day	temp	
V8	Hyd	***					2019
V9	Eph	***	***				
V11	Hyd	***					
V11	Leu	***					
V12	Hyd	***	***				
V12	Leu	***	*				2020
V19	Hyd	***					
V19	Leu	***					
V20	Hyd	***			*		
V20	Leu	***					

treat Treatment: RW, CW, OW  
 oxy Oxygen < 7mg/l  
 temp Temperature > 24°C  
 used as factor

Anhang 7: Sauerstoffsättigungen (Stundenwerte) der Versuche, zusammengefasst in den Gruppen RW (Ruhwasser), CW (konventionell behandeltes Abwasser) und OW (zusätzlich ozoniertes Abwasser) über den Zeitraum des jeweiligen Versuchs.



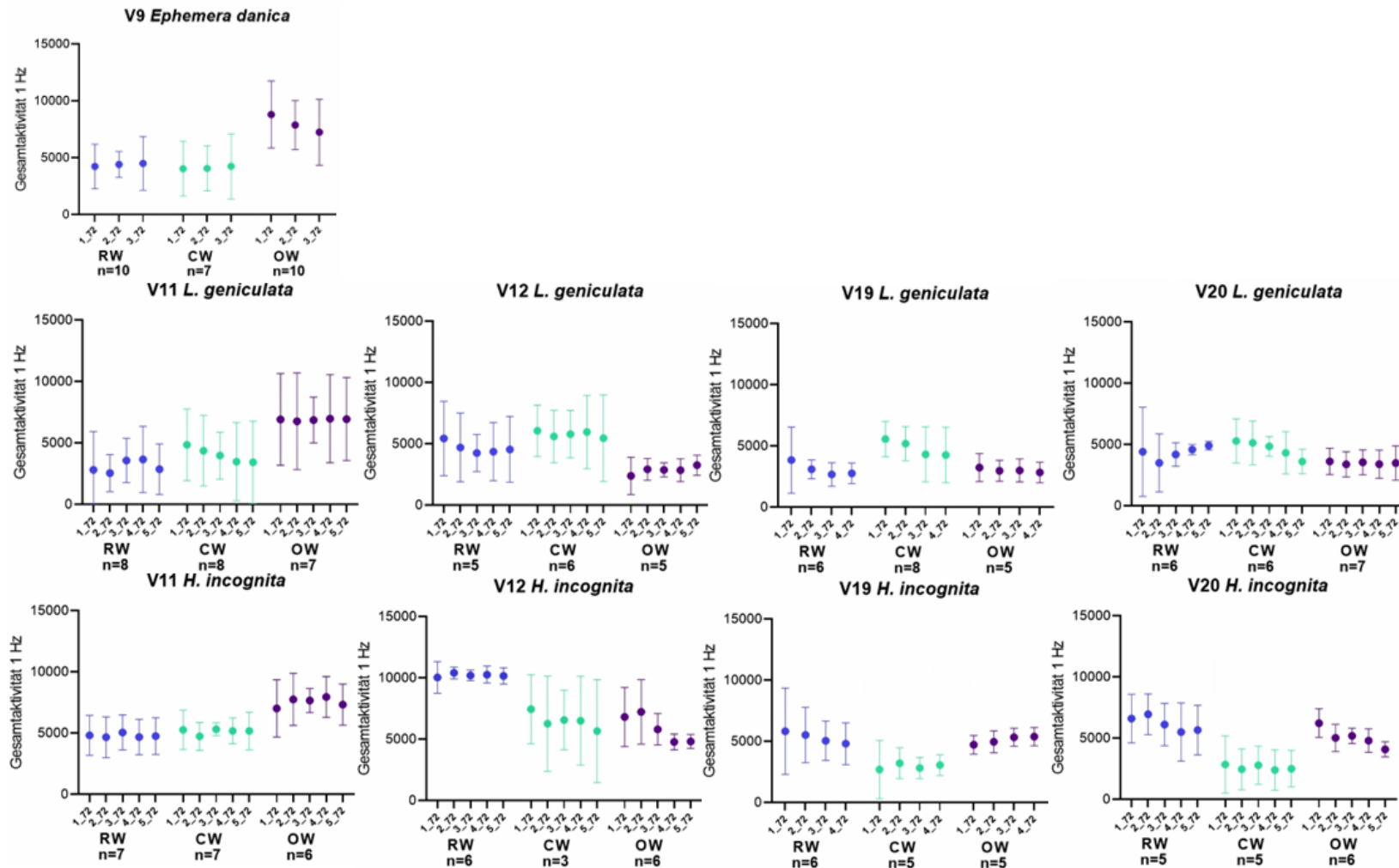
Anhang 8: Wasserparameter, Metall- und Nährstoffprofile der drei Wassertypen in den Messungen des Jahres 2019. In manchen Fällen war die Konzentration niedriger als die Bestimmungsgrenze (LOD = "Level of detection"). Dann wurde die Messung nicht in die Berechnung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) einbezogen. Die Information über die Werte unter der Bestimmungsgrenze ist in der Spalte „n<LOD“ eingefügt.

2019	Ruhwasser (RW)					Konventionell behandeltes Abwasser (CW)			Ozoniertes Abwasser (OW)				
	Parameter	Einheit	n	LOD	MW	SD	n<LOD	MW	SD	n<LOD	MW	SD	n<LOD
pH-value		12			7,9	0,2		7,9	0,2		7,9	0,2	
Conductivity	µS/cm	12			506	54		510	63		512	63	
Chemical oxygen demand (BSB5)	mg/l	12	<15				12			12			12
Ammonium nitrogen (NH3-N)	mg/l	12	<0,10	0,19	0,09		10	0,20		11	0,19	0,09	7
Nitrite nitrogen (NO2-N)	mg/l	12	<0,05				12			12			12
Nitrate nitrogen (NO3-N)	mg/l	12		2,61	0,62			2,59	0,63		2,62	0,62	
Phosphorus (P)	µg/l	12		91,3	33,9			91,9	35,8		93,2	34,8	
Carbon, total organically bound	mg/l	12		5,54	5,18			4,64	3,91		5,11	4,60	
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	mg/l	12		47,5	10,6			47,3	11,0		48,0	11,1	
Bromide (Br-)	mg/l	12	<0,05				12			12	0,05		11
Chloride (Cl-)	mg/l	12		53,7	9,0			54,8	11,0		54,9	11,0	
Chrome (Cr)	µg/l	12	<2,0				12			12			12
Copper (Cu)	µg/l	12		2,98	0,69		1	3,01	0,69		3,03	0,67	1
Nickel (Ni)	µg/l	12		3,34	0,94		2	3,30	0,89		3,39	0,94	
Zinc (Zn)	µg/l	12		27,5	11,4			27,2	10,9		28,0	11,2	
Iron (Fe)	µg/l	12		105	83			112	98		113	97	
Lead (Pb)	µg/l	12	<1,0				12	1,50		11			12
Cadmium (Cd)	µg/l	12	<0,10	0,77			11			12			12
Calcium (Ca)	mg/l	12		54,06	5,7			53,4	4,9		54,0	5,6	
Magnesium (Mg)	mg/l	12	<0,01	6,76	0,85			6,67	0,75		6,75	0,84	
Manganese (Mn)	mg/l	12		0,03	0,01		3	0,03	0,02	2	0,03	0,02	1

Anhang 9: Wasserparameter, Metall- und Nährstoffprofile der drei Wassertypen in den Messungen des Jahres 2020. In manchen Fällen war die Konzentration niedriger als die Bestimmungsgrenze (LOD = "Level of detection"). Dann wurde die Messung nicht in die Berechnung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) einbezogen. Die Information über die Werte unter der Bestimmungsgrenze ist in der Spalte „n<LOD“ eingefügt.

Parameter	Einheit	2020				Ruhwasser (RW)			Konventionell behandeltes Abwasser (CW)			Ozoniertes Abwasser (OW)		
		n	LOD	MW	SD	n<LOD	MW	SD	n<LOD	MW	SD	n<LOD		
pH-value		15		8,0	0,1		8,0	0,1		8,0	0,1			
Conductivity	µS/cm	15		531	104		534	104		535	103			
Chemical oxygen demand	mg/l	14	<15	0		14	15		14	15	0	12		
Ammonium nitrogen (NH3-N)	mg/l	14	<0,10	0,16	0,05	5	0,40	1,07	7	0,16	0,05	9		
Nitrite nitrogen (NO2-N)	mg/l	14	<0,05			14			14			14		
Nitrate nitrogen (NO3-N)	mg/l	14		3,06	0,99		3,10	1,00		3,12	0,99			
Phosphorus (P)	µg/l	14		106	55		107	55		108	55			
Carbon, total organically bound	mg/l	14		4,58	0,84		4,60	0,86		4,61	0,84			
Carbon, dissolved organically bound	mg/l	14		3,89	0,82		3,90	0,84		3,92	0,83			
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	mg/l	14		50,0	15,4		50,5	15,4		50,7	15,2			
Bromide (Br <sup>-</sup> )	mg/l	14	<0,05	0,06		13	0,07	0,02	5	0,07	0,02	6		
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	mg/l	14		54,8	14,9		55,2	15,1		55,4	14,9			
Chrome (Cr)	µg/l	14	<2,0	4,10		13	3,28	1,42	7			14		
Copper (Cu)	µg/l	14		3,79	0,79		3,88	0,94		3,89	0,94			
Nickel (Ni)	µg/l	14		8,56	8,79		8,61	8,78		8,68	8,74			
Zinc (Zn)	µg/l	14		24,0	11,4		23,8	11,5		24,1	11,3			
Iron (Fe)	µg/l	14		96,1	150,1		96,1	150,1		96,3	150,1			
Lead (Pb)	µg/l	14	<1,0			14			14			14		
Cadmium (Cd)	µg/l	14	<0,10			14			14			14		
Calcium (Ca)	mg/l	14		53,3	5,1		53,6	5,1		53,5	5,1			
Magnesium (Mg)	mg/l	14	<0,01	6,54	0,86		6,57	0,87		6,58	0,86			
Manganese (Mn)	mg/l	14		0,03	0,01	6	0,03	0,01		0,03	0,01			

Anhang 10: Zeitlich aufgelöste Darstellung der Gesamtaktivität von *E. danica*, *L. geniculata* und *H. incognita* in den Versuchen der Jahre 2019 und 2020. Dargestellt ist die Gesamtaktivität jedes überlebenden Tieres, zusammengefasst in den Gruppen RW (Ruhwasser), CW (konventionell behandeltes Abwasser) und OW (zusätzlich ozoniertes Abwasser) über 72h-Zeiträume des jeweiligen Versuchs (mit „V“ gekennzeichnet)



## Literatur Anhang

- Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195, 133–140.
- Boylard, E., Chasseaud, L.F. (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 32, 173–219.
- Brand, S.J., Erasmus, J.H., Labuschagne, M., Grabner, D., Nachev, M., Zimmermann, S., Wepener, V., Smit, N., Sures, B. (2019) Bioaccumulation and metal-associated biomarker responses in a freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, following short-term platinum exposure. *Environmental Pollution* 246, 69–78.
- Chen, H.Y., Grabner, D.S., Nachev, M., Shih, H.H., Sures, B. (2015) Effects of the acanthocephalan *Polymorphus minutus* and the microsporidian *Dictyocoela duebenum* on energy reserves and stress response of cadmium exposed *Gammarus fossarum*. *PeerJ* 2015 3, e1353.
- Ellmann, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Kohn, H.I. & Liversedge, M. (1944) On a New Aerobic Metabolite Whose Production by Brain Is Inhibited by Apomorphine, Methine, Ergotamine, Epinephrine and Menadione, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 83:292–300.
- Van Handel, E. (1985a) Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 299–301.
- Van Handel, E., (1985b,) Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 302–304.

## Im Rahmen des Projekts bereits veröffentlichte Publikationen.

- 1) Rothe, L. E., Botha, T. L., Feld, C. K., Weyand, M., Zimmermann, S., Smit, N., Wepener, V., Sures, B. (2021): Ecotoxicological effects of conventionally treated and ozonated wastewater containing micropollutants on survival, physiology, morphology, and behavior of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 286, 117241, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117241>
- 2) Baetz, N., Rothe, L.E., Wirzberger, V., Sures, B., Schmidt, T., Tuerk, J. (2021): High-Performance Thin-Layer Chromatography in Combination with a Yeast-Based Multi-Effect Bioassay to Determine Endocrine Effects in Environmental Samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 1321–1335, <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03095-5>
- 3) Rothe, L. E., Feld, C. K., Sures, B., Weyand, M., Gerhardt, A. (2020): Einfluss von Mikroschadstoffen auf Makrozoobenthosorganismen (MZB). *Gewässerschutz-Wasser-Abwasser*. In: *Gewässerschutz – Wasser – Abwasser*, Schriftenreihe des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen, 2020, 252, S. 9/1 - 9/8
- 4) Weyand, M., Rothe, L. E. (2020): Einfluss von Mikroschadstoffen auf das Makrozoobenthos. *Ruhrgütebericht* 2019.