

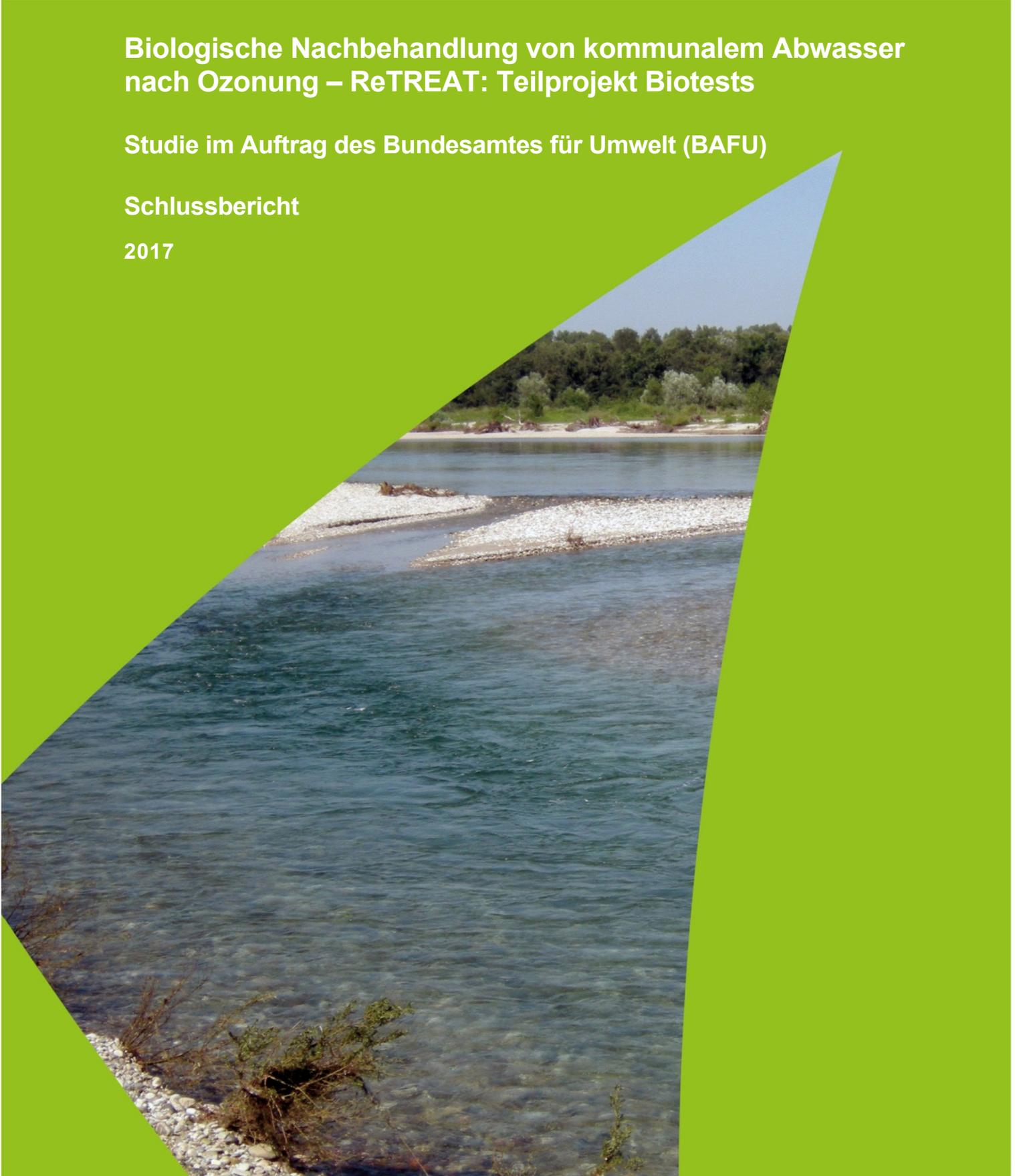


# Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests

Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

Schlussbericht

2017



## Impressum

### Herausgeber

Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL,  
8600 Dübendorf

### Im Auftrag von

Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abteilung Wasser, CH-3003 Bern. Das BAFU ist ein Amt des Eidgenössischen Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

### Autoren

Cornelia Kienle, Miriam Langer, Barbara Ganser, Sereina Gut, Andrea Schifferli, Christina Thiemann, Etienne Vermeirssen, Inge Werner

Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL

### Danksagung

Die Autoren möchten folgenden Personen für Ihre Unterstützung und Ihre wertvollen Beiträge danken:

Bereitstellung und Betreuung der Versuchshalle und Abwässer	Max Schachtler, Nathalie Hubaux und Mitarbeiter <i>ARA Neugut, Dübendorf, CH</i>
Messung Gentox (p53)-CALUX®	Harrie Besselink und Bart van der Burg <i>Biodetection Systems BDS, Amsterdam, NL</i>
Koordination und Aufbau	Marc Böhler, Julian Fleiner und Hansruedi Siegrist <i>Eawag, Abteilung Verfahrenstechnik, Dübendorf, CH</i>
Chemische Analytik	Christa McArdell, Rebecca Teichler und Marc Bourgin <i>Eawag, Abteilung Umweltchemie, Dübendorf, CH</i>
Messung von Biomarkern in Regenbogenforellen	Kristin Schirmer und Stephan Fischer <i>Eawag, Abteilung Umwelttoxikologie, Dübendorf, CH</i>
Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	Sergio Santiago <i>Soluval Santiago, Couvet, CH</i>
Ames-Test	Sini Flückiger <i>Xenometrix AG, Allschwil, CH</i>
FELST mit Regenbogenforellen, Glanzwurm-Test	Lisa Schlüter-Vorberg und Mirco Weil <i>ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim, D</i>
Mitarbeit beim FELST	Sina Hasler und Eszter Simon <i>Oekotoxzentrum Eawag-EPFL</i>
Betreuung Histopathologie	Rita Triebkorn <i>Universität Tübingen, Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere, Tübingen, D</i>

### Hinweis

Diese Studie wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt durchgeführt. Der Herausgeber/Auftragnehmer ist allein für den Inhalt verantwortlich. Die Studie wurde vom Bundesamt für Umwelt (ReTREAT Projekt), von der EU innerhalb FP7 (DEMEAU, project no. 308339) und vom Schweizerischen Zentrum für angewandte Ökotoxikologie finanziert.



### **Kontakt**

Cornelia Kienle: [cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch](mailto:cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch)

### **Zitiervorschlag**

Kienle C., Langer M., Ganser B., Gut S., Schifferli A., Thiemann C., Vermeirssen E. und Werner I. (2017) Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests. Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU). Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.

**Titelfoto: Andri Bryner, Eawag**





## Zusammenfassung

### Das Wichtigste in Kürze:

- Die Ozonung reduziert ökotoxikologische Effekte deutlich und verbessert die Abwasserqualität signifikant.
- Unmittelbar nach der Ozonung sind nur in Einzelfällen geringe „Auffälligkeiten“ aufgetreten (z.B. Mutagenität). Das ist nicht erstaunlich, da es sich bei der ARA Neugut um ein Abwasser handelt, das für eine Ozonung geeignet ist (d.h. durch die Ozonbehandlung wird grundsätzlich eine Verbesserung der Abwasserqualität erreicht, und es werden keine oder kaum problematische Oxidationsnebenprodukte gebildet).
- Die Abwasserqualität ist durch die Nachbehandlung nach Ozonung in nur wenigen Fällen noch weiter verbessert worden
- Da durch die Ozonung keine deutlichen messbaren toxischen Effekte (Toxizitätszunahme) aufgetreten sind, ist ein Vergleich der Nachbehandlungsverfahren anhand der verwendeten Biotests schwierig.
- Auf Grund der zusätzlichen Elimination von organischen Spurenstoffen (Kombination einer „vollen“ Ozonung mit einer Aktivkohlebehandlung) hat der Filter mit neuer granulierter Aktivkohle etwas besser abgeschnitten. Bezüglich der Elimination von toxischen labilen Reaktionsprodukten – die Hauptaufgabe einer Nachbehandlungsstufe – hat sich dieser GAK-Filter nicht von den anderen Nachbehandlungsverfahren unterschieden.

## Einleitung

Mikroverunreinigungen im Abwasser, wie beispielsweise Rückstände von Medikamenten und Pflegeprodukten, werden durch weitergehende Reinigungsstufen eliminiert. Dadurch verringert sich der Eintrag dieser Substanzen ins Gewässerökosystem, und die Tier- und Pflanzenwelt sowie die Trinkwasserressourcen werden geschützt. Studien zeigen, dass die Ozonung – neben der Aktivkohlebehandlung – ein geeignetes Verfahren zur Entfernung von Mikroverunreinigungen darstellt.

Ozon reagiert nicht nur mit den Mikroverunreinigungen, sondern oxidiert auch die Abwassermatrix (organische, aber auch anorganische Stoffe). Daraus können labile Reaktionsprodukte, wie Aldehyde, Ketone, organische Säuren etc., entstehen, die möglicherweise toxisch sind [1]. Diese Produkte sind in der Regel unproblematisch, da sie in einer Nachbehandlung gut biologisch abbaubar sind. Aus diesem Grund ist der Ozonung eine biologisch aktive Behandlungsstufe nachzuschalten. Hierfür können beispielsweise Sandfilter, Wirbel- oder Festbettverfahren eingesetzt werden, in denen Bakterien in Biofilmen Stoffe biologisch umsetzen. Zudem ist der Einsatz von granulierten Aktivkohlefiltern (GAK) möglich in denen organische Mikroverunreinigungen und labile Reaktionsprodukte aus der Ozonung durch den Biofilm auf der Kohle abgebaut werden. Zusätzlich werden auch noch Mikroverunreinigungen durch Sorption eliminiert.

Im vorliegenden ReTREAT-Projekt wurde die Effizienz der Ozonung in Kombination mit verschiedenen Nachbehandlungsverfahren zur Reduzierung der labilen Reaktionsprodukte und dadurch von möglichen ökotoxikologischen Wirkungen („**Auffälligkeiten**“) untersucht. Insbesondere ging es darum zu beobachten, ob anhand der angewendeten Biotests die Leistung (hinsichtlich des Abbaus von labilen Reaktionsprodukten und der damit verbundenen Toxizität) der untersuchten Nachbehandlungsverfahren unterschieden werden kann. Zusätzlich können mit einem Teil der Biotests auch Aussagen über die **Leistungsfähigkeit** der Ozonung (und der Nachbehandlungen) zur Entfernung von Mikroverunreinigungen gemacht werden. Das vorliegende Projekt wurde auf der Abwasserreinigungsanlage (ARA) Neugut in Dübendorf – der ersten grosstechnischen Ozonungsanlage zur Behandlung von kommunalem Abwasser – durchgeführt. Im Projekt wurden die folgenden Nachbehandlungsverfahren untersucht:

- Sandfilter (SF) (volltechnisch)
- Wirbelbett (WB) (Pilotmassstab)
- Festbett (FB) (Pilotmassstab)



- Granulierter Aktivkohlefilter mit neuer (d.h. nur wenig beladener) Aktivkohle (13'000 bis 20'000 Bettvolumina (BV)) (GAK2; Pilotmassstab)
- Granulierter Aktivkohlefilter mit stark vorbeladener Aktivkohle (35'000 bis 43'000 BV; siehe dazu [2]; GAK3; Pilotmassstab)

## Methoden

Um die Effizienz der Ozonung und der Nachbehandlungen zu evaluieren, wurden Proben vor und nach den verschiedenen Reinigungsstufen auf ökotoxikologische Effekte untersucht. Die Biotests wurden von Februar bis April 2015 durchgeführt. In dieser Zeit wurden die Ozondosis und weitere Betriebsparameter konstant gehalten (2.7 g O<sub>3</sub>/m<sub>3</sub>). Eingesetzt wurden die folgenden Biotests im Labor und im Durchfluss auf der Kläranlage:

**In-vitro- / in vivo-Testsysteme (im Labor)** (mit 48h Sammelproben aus 3 Messkampagnen)

zur Untersuchung von Auffälligkeiten in der Ozonung

- Gentox (p53)-CALUX®: erbgutschädigende (gentoxische) Wirkungen
- Ames-Test: vererbare erbgutverändernde (mutagene) Wirkungen
- Wasserflöhe (*Ceriodaphnia dubia*): Auswirkungen auf die Fortpflanzung

zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Ozonung und der Nachbehandlungen:

- Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*): Allgemein toxische Wirkungen
- Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*): Auswirkungen auf Photosynthese und Wachstum

**In-vivo-Testsysteme (im Durchfluss)** v.a. zur Untersuchung von Auffälligkeiten nach der Ozonung und wenn möglich auch zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Behandlungen:

- Glanzwürmer (*Lumbriculus variegatus*): Auswirkungen auf die Fortpflanzung
- Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*): Untersuchung der Entwicklung von frühen Lebensstadien mit einem *Fish Early Life Stage Toxicity-Test*
  - Erfassung von Sterblichkeit (letal Endpunkt)
  - Erfassung verschiedener subletaler Endpunkte: allgemeine Entwicklungsparameter wie Schlupf, Aufschwimmen und Länge bzw. Gewicht, Veränderungen von Geweben und Organen sowie die Expression verschiedener schadstoffrelevanter Gene als Biomarker.

Anhand der **Genexpression** kann eine Aussage über die Belastung des Organismus gemacht werden. Dabei können folgende Reaktionen auftreten: eine allgemeine Stressantwort, oxidativer Stress, Biotransformation (d.h. eine Umwandlung von Fremdstoffen im Organismus durch Enzyme), Regulierung des Immunsystems, hormonelle Wirkung sowie Reaktionen auf Schwermetall-Belastung.

## Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Biotests zunächst unter dem Gesichtspunkt Auffälligkeiten nach der Ozonung und anschliessend bezüglich der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Behandlungen zusammengefasst.

**Leichte Auffälligkeiten nach der Ozonung** wurden in zwei Biotests gemessen: dem Ames-Test und dem Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen. Diese Auffälligkeiten wurden durch die Nachbehandlungen teilweise verringert bzw. eliminiert. Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Biotests zusammen, die zur Beurteilung der Nachbehandlungen in Bezug auf möglicherweise toxische, labile Reaktionsprodukte herangezogen wurden.



Durchgeführter Test	Messparameter	Auffälligkeiten	
		nach Ozonung	nach Nachbehandlung
<b>in-vitro -Biotests</b>			
Gentox (p53)-CALUX®	Gentoxizität	k.E.	k.E.
Ames-Test	Mutagenität	in 1 von 12 Tests: Mutagenität bei 20-facher Anreicherung	in 1 von 12 Tests: Mutagenität bei 20facher Anreicherung im SF
<b>in-vivo -Biotests im Labor</b>			
Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	Fortpflanzung	schwacher Effekt in 1 von 3 Messkampagnen	schwacher Effekt in 1 von 3 Messkampagnen bei SF, GAK3 (beladen) und FB

k.E. kein Effekt; SF Sandfilter; FB Festbett, GAK Granulierte Aktivkohle  
 in grün: keine Auffälligkeiten bei 2-3 Messkampagnen, in grau: kein Effekt

**Mutagenität** im Ames-Test konnte bei 1-facher Probenkonzentration in keiner der Abwasserproben nachgewiesen werden. Nach 20-facher Anreicherung zeigte sich bei einem von 12 Tests direkt nach der Ozonung Mutagenität (in der ersten Messkampagne). Diese Effekte wurden im nachgeschalteten Sandfilter deutlich reduziert. Die anderen untersuchten Nachbehandlungsverfahren eliminierten die Mutagenität. Einzig nach dem Sandfilter wurde in einem von 12 Tests Mutagenität nachgewiesen (in der dritten Messkampagne). Dieses Resultat ist unerwartet und kann mit der aktuellen Datenlage nicht erklärt werden.

Die **Fortpflanzung der Wasserflöhe** war nach der Ozonung in einer von drei Messkampagnen leicht beeinträchtigt. Dieser Effekt wurde durch GAK2 und WB eliminiert, bei den weiteren Nachbehandlungen trat keine Veränderung auf. Da dieses Resultat nur bei einer Messkampagne auftrat, wird keine der Behandlungen in Bezug auf Toxizität gegenüber Wasserflöhen als bedenklich angesehen.

Die **Fortpflanzung von Glanzwürmern** wurde durch keine der untersuchten Abwasserproben signifikant beeinträchtigt, auch nicht direkt nach der biologischen Reinigung. Auch die **Entwicklung von frühen Lebensstadien von Regenbogenforellen** im Durchfluss auf der Kläranlage zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen an. Einzig die subletalen Endpunkte bei den Regenbogenforellen – d.h. die Histopathologie und die Genexpression, die in angegliederten Projekten bearbeitet wurden – gaben Hinweise auf Unterschiede durch Ozonung und die Nachbehandlungen.

Es hat sich gezeigt, dass ein Teil der eingesetzten **Biotestverfahren** geeignet waren, um die **Leistungsfähigkeit der Ozonung und der Nachbehandlungen** zu beurteilen:

Drei Biotests zeigten eine **Verbesserung von ökotoxikologischen Effekten durch die Ozonung** (Leuchtbakterientest, kombinierter Algentest und Genexpression im Regenbogenforellentest). Bei den Regenbogenforellen war die Mehrheit der untersuchten Biomarker signifikant erhöht (induziert), wenn die Forellen dem biologisch gereinigten Abwasser (Ablauf Nachklärung) ausgesetzt wurden. Diese negativen Reaktionen – insbesondere auf die Biotransformation, die hormonelle Wirkung, die Immunregulation sowie den Zellzyklus – wurden durch die Behandlung mit Ozon signifikant verringert.

Bei den getesteten **Nachbehandlungen** konnten mit den im Labor durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Biotests **nur geringfügige Unterschiede der ökotoxikologischen Effekte im Vergleich zu den Effekten nach Ozonung** aufgezeigt werden, da die Toxizität nach der Ozonung bereits sehr niedrig war. Bei den *in vivo*-Biotests im Durchfluss wurde einzig beim Gewebezustand und der Genexpression der Regenbogenforellen eine teilweise Verbesserung der Effekte gemessen. Die Ergebnisse der Biotests, die zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Reinigungsstufen in Bezug auf die Elimination von Mikroverunreinigungen herangezogen wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:



Durchgeführter Test	Messparameter	Leistungsfähigkeit der Ozonung	Leistungsfähigkeit der Nachbehandlungen				
			SF	FB	WB	GAK 2 (unbeladen)	GAK 3 (beladen)
<b>in-vitro / in-vivo -Biotests im Labor</b>							
Leuchtbakterientest	Leuchtkraft	+ (-66 % Effekt)	var.	var.	var.	+ (-31 % Effekt)	+ (-31 % Effekt)
Kombinierter Algentest	Photosynthese	+ (-80 % Effekt)	k.V.	k.V.	k.V.	+ (-66 % Effekt)	k.V.
	Wachstum	+ (-73 % Effekt)	var.	k.V.	var.	var.	var.
<b>in-vivo-Biotests im Durchfluss</b>							
Regenbogenforellentest	Gewebezustand		k.V.	k.V.	k.V.	+	k.V.
	Genexpression	+	k.V.	+	k.V.	+	k.V.

+ Verbesserung; var. variable Ergebnisse; k.V. keine Veränderung

SF Sandfilter; FB Festbett; WB Wirbelbett; GAK Granulierte Aktivkohle

in grün: Verbesserung bei 2-3 Messkampagnen; in grau: keine Veränderung oder variable Ergebnisse

Abwasser aus dem **Sandfilter, dem Festbett oder dem Wirbelbett** zeigte je nach Biotest keine Veränderung von nach der Ozonung beobachteten Effekten oder bewirkte variable Ergebnisse abhängig von der Messkampagne. SF und WB erzielten eine leichte Veränderung der Genexpression, FB bewirkte eine weitere Verbesserung. Das heisst, die Genexpression der Tiere, die diesem Abwasser ausgesetzt waren, war dem Genexpressionsmuster der Kontrolltiere am ähnlichsten und unterschied sich deutlich von dem Genexpressionsmuster nach Ozonung.

Der **unbeladene granulierte Aktivkohlefilter (GAK2)** verringerte die Effekte im Leuchtbakterien-Test ebenso wie die Photosynthese-Hemmung der Grünalgen und bewirkte auch eine Verbesserung des Gewebezustands und der Genexpression im Regenbogenforellentest. Auch hier ähnelte die Genexpression der Tiere derjenigen der Kontrolltiere und unterschied sich deutlich von den Fischen aus dem ozonierten Abwasser. Beim **beladenen granulierten Aktivkohlefilter (GAK3)** wurde eine Verringerung der Photosynthesehemmung gemessen. Dies kann mit einem zusätzlichen Reinigungseffekt der GAK durch Adsorption erklärt werden, was auch bei der Spurenstoffelimination deutlich wurde. Bei den weiteren Biotests variierten die Ergebnisse je nach Messkampagne oder es zeigten sich keine Veränderungen.

## Schlussfolgerungen

Die ARA Neugut ist grundsätzlich ein gut geeigneter Standort für eine Ozonung. Sie reinigt kommunales Abwasser und Industrieabwasser aus der Nahrungsmittelindustrie. Nach Vorabklärungen wurde daher dort die erste volltechnische Ozonung der Schweiz gebaut. Im Projekt ReTREAT konnte bestätigt werden, dass durch die Ozonung keine oder kaum problematische Reaktionsprodukte („Auffälligkeiten“) gebildet wurden und das Toxizitätsniveau direkt nach der Ozonung erwartungsgemäss sehr gering war. Die Ozonung verursachte nur in einem Fall ein mutagenes Potential, welches durch den Sandfilter aber wieder reduziert und durch die anderen Nachbehandlungsverfahren (Festbett, Wirbelbett, GAK2, GAK3) eliminiert wurde. Das einmalige Auftreten von mutagenem Potential im Sandfilter (bei 20facher Anreicherung), ohne vorherige Auffälligkeit in der Ozonung, war unerwartet und kann mit der aktuellen Datenlage nicht erklärt werden.

Auch konnte mit den durchgeführten Biotests die Leistungsfähigkeit der Ozonung und teilweise auch der Nachbehandlungen gut beurteilt werden: Durch die zusätzliche Behandlung des biologisch gereinigten Abwassers mit Ozon konnten ökotoxikologische Effekte – wie Algen- und Leuchtbakterientoxizität oder erhöhte Genexpression von schadstoffrelevanten Genen – signifikant verringert und dadurch verbessert werden. Auf Grund des geringen Toxizitätsniveaus direkt nach der Ozonung war ein direkter Vergleich der untersuchten Nachbehandlungsverfahren mit Hilfe der angewandten Biotests schwierig. Einzig bei zwei Biotests im Labor (Leuchtbakterien- und kombinierter Algentest) sowie den subletalen Endpunkten in Langzeitversuchen mit Regenbogenforellen konnten geringfügige Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Nachbehandlungen zur Elimination der Effekte von Spurenstoffen aufgezeigt werden.



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
1 Einleitung .....	1
2 Material und Methoden .....	3
2.1 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Biotests im Labor .....	3
2.1.1 Probenahme und Probenaufbereitung .....	3
2.1.2 Toxizitätsparameter .....	4
2.1.3 Überblick über durchgeführte Biotests .....	6
2.1.4 Gentox (p53)-CALUX® .....	6
2.1.5 Ames-Test mit Bakterien .....	7
2.1.6 Leuchtbakterientest .....	8
2.1.7 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen .....	9
2.1.8 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen .....	10
2.2 <i>In vivo</i> -Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut .....	11
2.2.1 Glanzwurm-Fortpflanzungstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	11
2.2.2 <i>Fish Early Life Stage Toxicity</i> -Test mit Regenbogenforellen .....	13
3 Ergebnisse und Diskussion .....	16
3.1 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Biotests im Labor .....	16
3.1.1 Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstest mit menschlichen Zelllinien .....	16
3.1.2 Ames-Test mit Bakterien .....	16
3.1.3 Leuchtbakterientest .....	19
3.1.4 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen .....	21
3.1.5 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen .....	27
3.2 <i>In vivo</i> -Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut .....	29
3.2.1 Glanzwurm-Fortpflanzungstest .....	29
3.2.2 <i>Fish Early Life Stage Toxicity</i> -Test mit Regenbogenforellen .....	30
3.2.3 Weiterführende Untersuchungen mit Regenbogenforellen – Histopathologie und Genexpression .....	39
4 Erfolgskontrolle der erweiterten Abwasserbehandlungsmethoden .....	47
4.1 Change Index .....	47
4.2 Vergleich der Biotestergebnisse .....	49
4.2.1 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Biotests im Labor .....	49
4.2.2 <i>In vivo</i> -Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut .....	52
5 Schlussfolgerungen .....	54
6 Referenzen .....	55
7 Glossar .....	59
8 Verzeichnisse .....	60
8.1 Abbildungsverzeichnis .....	60



8.2 Tabellenverzeichnis .....	62
Anhang 1 Hintergrundinformation zur Probenaufbereitung .....	64
Anhang 2 Beispiel für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen .....	65
Anhang 3 Tabellen mit Ergebnissen der <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Biotests .....	66
Anhang 4 Fortpflanzungstest mit <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	74
Anhang 5 Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen.....	75
Physikalisch-chemische Parameter .....	75
Schlupf der Larven .....	77
Überleben der Larven nach Schlupf während der Exposition (bis Tag 64 nach Schlupf) .....	81
Standard-Länge und Gesamt-Länge der Fische nach Testende.....	82
Gewicht der Fische nach Testende.....	83



## 1 Einleitung

Über die kommunalen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) werden verschiedenste organische und anorganische Spurenstoffe in Oberflächengewässer eingetragen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Verbrauchsprodukte (Körperpflegeprodukte, Reinigungsmittel), Medikamente und Rückstände von Pflanzenschutzmitteln oder Bioziden. Diese sogenannten „Mikroverunreinigungen“, die in sehr niedrigen Konzentrationen (Milliardstel- bis Millionstel-Gramm pro Liter, ng/L- $\mu\text{g/L}$ ) in Oberflächengewässern nachgewiesen werden [3-7], können sich nachteilig auf aquatische Organismen und Ökosysteme auswirken [8].

Mikroverunreinigungen im Abwasser werden durch weitergehende Reinigungsmethoden reduziert, wodurch der Eintrag dieser Substanzen in Gewässerökosysteme verringert und die Tier- und Pflanzenwelt der Gewässer sowie Trinkwasserressourcen geschützt werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Ozonung eine vielversprechende Behandlung darstellt [9]. Es können dabei zwar labile, toxische Reaktionsprodukte entstehen, diese werden aber auf der nachfolgenden biologischen Nachbehandlungsstufe wieder effizient eliminiert [10]. Als biologisch aktive Nachbehandlungsverfahren können z.B. Sandfilter, Wirbel- und Festbett-Behandlungen oder granulierten Aktivkohlefilter eingesetzt werden. Die ARA Neugut in Dübendorf hat als erste gross-technische Anlage der Schweiz eine Ozonung als erweiterte Abwasserbehandlungsmethode im Frühjahr 2014 in Betrieb genommen.

Das Projekt ReTREAT auf der ARA Neugut hat das Ziel, verschiedene Nachbehandlungsverfahren auf deren Leistungsfähigkeit zu untersuchen. Dazu wurde einerseits die technisch-betriebliche Eignung der Verfahren untersucht (siehe dazu [2]). Andererseits wurde ein Augenmerk auf die Bildung von Reaktionsprodukten in der Ozonung, deren anschliessende Elimination in den unterschiedlichen Nachbehandlungsverfahren sowie die Eliminationsleistung für Mikroverunreinigungen gelegt. Zur Erfassung von Auffälligkeiten nach der Ozonung und zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit von Ozonung und Nachbehandlungen hinsichtlich der Elimination von Mikroverunreinigungen wurden, zusätzlich zu einer chemisch-analytischen Bestimmung der Spurenstoffe, ökotoxikologische Biotests eingesetzt [11]. Biotests sind „Analysemethoden, die lebende Zellen, Organismen oder Gemeinschaften in definierter Art und Anzahl einsetzen, um deren Reaktion auf eine Exposition zu messen“ [12].

Die Auswahl der Biotests für das Projekt ReTREAT umfasst verschiedene Organismen auf mehreren Ernährungsebenen, wobei sowohl spezifische Tests auf Zellebene (sogenannte „*in vitro*“-Biotests) als auch Biotests auf Organismenebene (sogenannte „*in vivo*“-Biotests) angewendet wurden. Die Eignung dieser Tests konnte bereits in früheren Projekten evaluiert und gezeigt werden (z.B. [13-16]). Bei der Auswahl der Tests wurde vor allem auf die Eignung zur Beurteilung der Nachbehandlungen Wert gelegt. Daher werden z.B. Tests für östrogen-aktive Substanzen, die durch die Ozonung sehr gut entfernt werden, nicht im Rahmen des Projektes durchgeführt. Beispielsweise reduzierten sich die östrogenen Effekte im Projekt Micropoll durch eine Ozonung bereits um 99% [15]. Es wurden daher folgende toxische Effekte (Endpunkte) untersucht:

- **Mutagenität:** Um die Auswirkungen möglicher genotoxischer oder mutagener Abbauprodukte in der Ozonung zu erfassen, wurde ein Mutagenitätstest durchgeführt. Der Ames-Test mit dem gentechnisch veränderten Bakterium *Salmonella typhimurium* dient zum Nachweis einer möglichen mutagenen Wirkung. Dieser Test ist empfindlich, standardisiert, weit verbreitet und wird kontinuierlich weiterentwickelt [17, 18]. Verwendet wurden 2 Bakterienstämme (TA 98 und TA 100), die unterschiedliche genetische Veränderungen aufzeigen. Zusätzlich wurde ein *in vitro*-Biotest mit einer menschlichen Zelllinie eingesetzt (Gentox (p53)-CALUX®) [19]. Mit diesem Test bestehen weniger Erfahrungen als mit dem Ames-Test.
- **Unspezifische Toxizität:** Mit dem Leuchtbakterientest wurde die allgemeine, nicht spezifische Toxizität des Abwassers auf das Bakterium *Aliivibrio fischeri* als Vertreter der Ernährungsgruppe der Zersetzer untersucht. Die Bakterien reagieren empfindlich auf eine grosse Anzahl von Schwermetallen und auf unspezifisch wirkende Chemikalien [12].
- **Algentoxizität:** Ein chronischer, kombinierter Algentest mit einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) diente zur Beurteilung der Toxizität des Abwassers auf planktonische



Primärproduzenten. Hierbei wurden sowohl spezifische Auswirkungen auf die Photosynthese der Algen als auch die nicht spezifische Toxizität durch Hemmung des Algenwachstums betrachtet [20].

- **Chronische Toxizität auf Wasserflöhe:** In einem chronischen Fortpflanzungstest wurden die Auswirkungen des Abwassers auf den Wasserfloh *Ceriodaphnia dubia* untersucht. Diese Organismen spielen als planktonische Primärkonsumenten (u.a. von Grünalgen) und als Beuteorganismen für Fische und andere Wasserlebewesen eine wichtige Rolle im Gewässerökosystem. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Industrieabwasser ist aus früheren Studien bekannt (z.B. [21]).
- **Toxizität auf Glanzwürmer:** In früheren Studien haben sich zudem Organismen, die sich von Sediment ernähren (sogenannte Detritusfresser), wie der Glanzwurm (*Lumbriculus variegatus*) als empfindlich gegenüber möglichen Transformationsprodukten der Ozonung gezeigt [22, 23]. Daher wurde die Fortpflanzung dieser Organismen in einem chronischen Test untersucht. Detritusfresser spielen eine wichtige ökologische Rolle und stellen eine Nahrungsquelle für bestimmte Fische dar.
- **Fischtoxizität:** Auf der nächst höheren Ernährungsebene (Sekundärkonsumenten) wurden mögliche Auswirkungen des Abwassers auf frühe Lebensstadien der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) in einem *Fish Early Life Stage Toxicity*-Test untersucht [24]. Diese Lebensstadien gelten als besonders empfindlich gegenüber Schadstoffen (z.B. [25]).

In 3 Messkampagnen mit *in vitro*- und *in vivo*-Biotests im Labor, sowie mit Glanzwurm- und Fischtest im Durchfluss auf der ARA Neugut wurden die ökotoxikologischen Auswirkungen von biologisch behandeltem Abwasser, von ozoniertem Abwasser und von Abwasser aus verschiedenen Nachbehandlungsstufen nach Ozonung evaluiert. In den nächsten Abschnitten werden die Methoden beschrieben und ein Überblick über die Ergebnisse gegeben. Im Anschluss wird die Effizienz der Reinigungsleistung der verschiedenen Nachbehandlungsstufen verglichen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 *In vitro*- und *in vivo*-Biotests im Labor

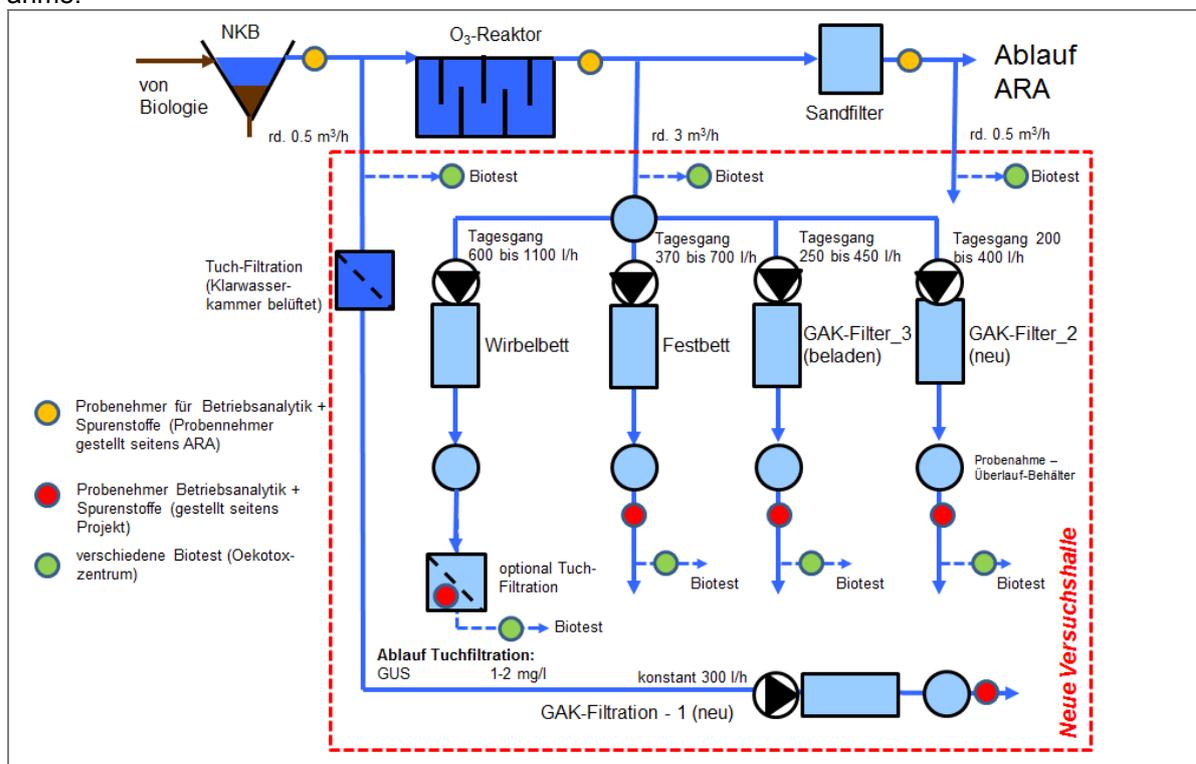
#### 2.1.1 Probenahme und Probenaufbereitung

Zur Evaluation der ausgewählten weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren auf der ARA Neugut wurden mehrere Messkampagnen durchgeführt. Die Probenahme erfolgte flussproportional mit automatischen Probennehmern an 8 Probenahmestellen.

Folgende Proben wurden untersucht:

- Abwasser aus dem Kläranlagenzulauf (Vorklärbecken, **VKB**)
- Abwasser nach der biologischen Reinigung (Nachklärbecken, **NKB**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon (Ozon, **O3** oder **OZ**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Sandfilter (**SF**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Festbett (**FB**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Wirbelbett (**WB**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und wenig vorbelasteter (neuer) granulierter Aktivkohle (**GAK2**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und stark vorbelasteter granulierter Aktivkohle (**GAK3**)

Abb. 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Reinigungsstufen und Stationen der Probenahme.



**Abb. 1: Überblick über die Pilotanlage auf der ARA Neugut und die verschiedenen Probenahmestellen.**  
 NKB = Nachklärbecken, O3 = Ozon, GAK = granuliert Aktivkohle



Insgesamt wurden 3 Messkampagnen im Abstand von jeweils 3-4 Wochen an den folgenden Daten durchgeführt:

- 1. Messkampagne: 2.-3.2.2015, erreichte Bettvolumina (BV): GAK2: 12'600 - GAK3: 35'300
- 2. Messkampagne: 9.-10.3.2015, erreichte BV: GAK2: 16'500 - GAK3: 39'000
- 3. Messkampagne: 14.-15.4.2015, erreichte BV: GAK2: 20'000 - GAK3: 42'600

Für die Biotests wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 24 h-Mischproben (von 8.<sup>00</sup>-8.<sup>00</sup>) mit automatischen Probennehmern in konditionierten Glasflaschen flussproportional gesammelt und bei 4°C gelagert. Nach Abschluss jeder 48 h-Messkampagne wurden die beiden 24 h-Mischproben gekühlt ans Oekotoxzentrum transportiert und dort mengen-proportional zu 48 h-Mischproben vereinigt. Je ein Aliquot (2.5 L) dieser Proben wurde noch am Tag der Probenlieferung gekühlt zu Soluval Santiago (Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen) transportiert. Der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (siehe Kapitel 2.1.8) wurde mit nativen Abwasserproben durchgeführt und noch am Tag der Anlieferung der Proben (d.h. am letzten Tag der 48 h-Messkampagne) gestartet.

Ein weiteres Aliquot wurde aufkonzentriert (siehe Tab. 19 für die jeweiligen Anreicherungsfaktoren und Tab. 20 für die Methode im Anhang) für die *in vitro*-Biotests im Labor: Gentox-CALUX® (siehe Kapitel 2.1.4), Ames-Test (siehe Kapitel 2.1.5), Leuchtbakterientest (siehe Kapitel 2.1.6) und kombinierter Algentest (siehe Kapitel 2.1.6). Für die Extraktion wurden zunächst die Proben im Labor über einen Glasfaserfilter filtriert (1 µm, Millipore, type APFD 09050), der pH-Wert mit HCl (1 M) auf 3 angepasst und bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Anreicherung anhand einer Standardarbeitsanweisung [26]: Je 200 mL (Probe Kläranlagenzulauf) bzw. 500 mL (alle anderen Proben) wurden mittels Lichrolut RP18/EN Kartuschen (Merck, Darmstadt, Deutschland) extrahiert. Fünfhundert Milliliter Reinstwasser diente als Negativkontrolle. Nach Elution der Kartuschen mit 4 x 1 mL Aceton und 1 mL Methanol wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff auf ca. 0.5 mL eingengt und anschliessend mittels einer 1 mL Hamilton-Spritze mit Ethanol auf 1 mL addiert. Die nun in 1 mL einer Lösungsmittelmischung (~50% Ethanol, ~50% Aceton und Methanol) vorliegenden 200-fach (Probe Kläranlagenzulauf) bzw. 500-fach aufkonzentrierten Proben (alle weiteren Probenahmestellen) wurden bei -20°C bis zur Analyse im Biotest gelagert. Zur Durchführung der Tests wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur gebracht.

## 2.1.2 Toxizitätsparameter

Die in den Biotests gemessenen Parameter wie Rezeptoraktivität, Zellzahl und Zellvitalität werden als Endpunkte bezeichnet. Toxizitätsparameter, die mit Hilfe statistischer oder mathematischer Methoden berechnet werden, dienen dazu, die Toxizität für die jeweiligen Endpunkte auszudrücken. Folgende Toxizitätsparameter können für Biotests mit gängigen Programmen wie Microsoft Excel oder einem Statistikprogramm (z.B. GraphPad Prism) berechnet werden (Abb. 2):

**EC<sub>x</sub>** Die EC<sub>x</sub> ist die Konzentration (oder % der Probe), bei der x% (z.B. 10, 20 oder 50%) des maximal induzierbaren Effekts erreicht werden (z.B. Hemmung der Reproduktion). Der EC<sub>50</sub> wird eher für akute Tests, der EC<sub>10</sub> für chronische Testendpunkte verwendet. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Abb. 2A).

Je niedriger der EC<sub>x</sub>-Wert, d.h. je niedriger die ermittelte Konzentration bzw. die Verdünnung ist, bei der x% Effekt auftritt, desto toxischer ist die untersuchte Substanz oder Probe.

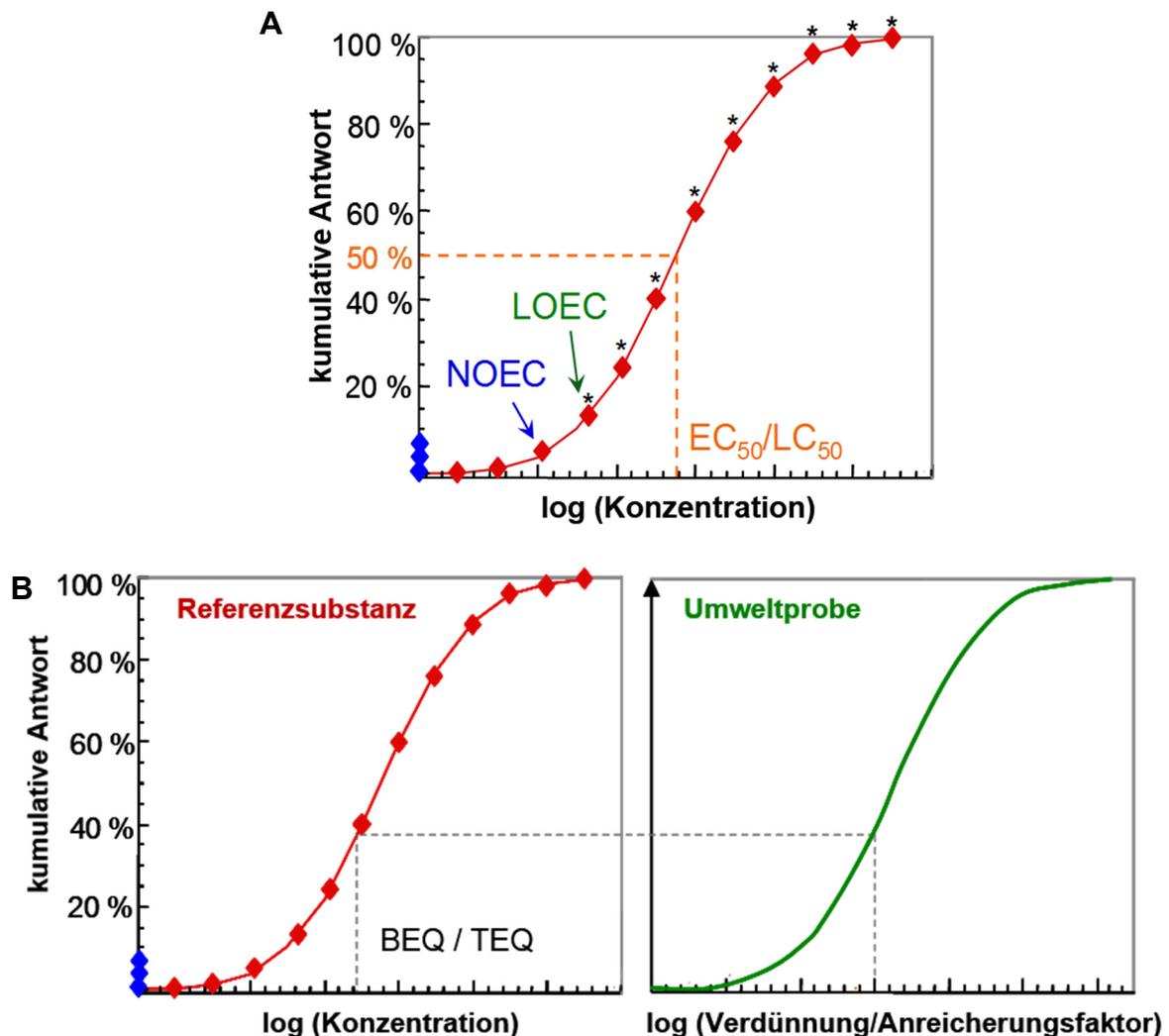
**NOEC** Die NOEC (*No Observed Effect Concentration*) ist die höchste getestete Konzentration, die noch keinen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Dieser Parameter wird vor allem für chronische Testendpunkte verwendet (Abb. 2A).

**LOEC** Die LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) ist die niedrigste getestete Konzentration die einen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle hervorruft (Abb. 2A). Auch dieser Parameter wird hauptsächlich für chronische Testendpunkte verwendet.



**BEQ/TEQ** Die bioanalytische Äquivalenzkonzentration (BEQ) (je nach Testendpunkt auch Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (TEQ) genannt [27]) ist definiert als jene Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt wie die Umweltprobe hat (z.B. [20]). Die Referenzsubstanzen variieren je nach gemessenem spezifischen Endpunkt. Somit kann die Wirksamkeit einer Mischung als Konzentration einer Referenzsubstanz ausgedrückt werden (Abb. 2B). TEQs werden bei toxischen Wirkungen wie Wachstums-, Photosynthese- oder Lumineszenzhemmung verwendet, wohingegen BEQs bei allen weiteren Wirkungen wie z.B. Rezeptorbindung ermittelt werden.

Je höher der BEQ- bzw. TEQ-Wert, desto wirksamer ist die untersuchte Probe.



**Abb. 2:** Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und EC<sub>50</sub>.

◇ Kontrolle, ◇ Behandlung, \* signifikante Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 2A). Abb. 2B zeigt die Ableitung von bioanalytischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) bzw. Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen (TEQ) durch den Vergleich der Effektkonzentrationen einer Umweltprobe mit jener einer Referenzsubstanz, z.B. Diuron. Die BEQ bzw. TEQ ist definiert als jene Konzentration der Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe. NOEC No Observed Effect Concentration, LOEC Lowest Observed Effect Concentration, EC Effektkonzentration, LC Letale Konzentration.



### 2.1.3 Überblick über durchgeführte Biotests

Die folgende Tabelle (Tab. 1) gibt einen Überblick über die durchgeführten Biotests mit einer Unterteilung in Biotests, die Auffälligkeiten nach Ozonung anzeigen, und Biotests, die für die Leistungsbeurteilung der weitergehenden Abwasserbehandlung eingesetzt wurden.

**Tab. 1: Überblick über im Projekt ReTREAT durchgeführte Biotests**

Durchgeführter Test	Messparameter	Beurteilung von	
		Auffälligkeiten nach Ozonung	Leistungsfähigkeit der Behandlung
<b><i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>-Biotests im Labor</b>			
Gentox (p53)-CALUX®	Gentoxizität	x	
Ames-Test	Mutagenität	x	
Leuchtbakterientest	Leuchtkraft		x
Kombinierter Algentest	Photosynthese		x
	Wachstum		x
Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	Fortpflanzung	x	
<b><i>in vivo</i>-Biotests im Durchfluss</b>			
Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern	Fortpflanzung	x	
Regenbogenforellentest	Entwicklung	x	x
	Gewebezustand	x	x
	Genexpression	x	x

### 2.1.4 Gentox (p53)-CALUX®

Der p53-CALUX®-Test wird mit einer menschlichen Zelllinie durchgeführt. Es ist ein Rezeptorbindungstest zum Nachweis verschiedener direkt-wirkender gentoxischer Substanzen [28].

#### Testorganismus

Der Test wird mit der genetisch veränderten menschlichen Zelllinie U2OS durchgeführt, die neben dem Gen für den p53-Rezeptor, welcher bei gentoxischer Schädigung aktiviert wird, ein Luciferase-Gen enthält, das bei Ablesung des p53-Gens ebenfalls abgelesen wird. Die Zellen werden von der Firma Biodetection Systems (BDS) in den Niederlanden kultiviert und vertrieben.

#### Testdurchführung

Der Test wurde von der Firma Biodetection Systems (BDS, Amsterdam, Niederlande) in 96-Well-Mikrotiterplatten nach der Methode von Van der Linden und Kollegen [28] durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten Actinomycin D (für Ansätze ohne Zugabe von S9-Mix) und Cyclophosphamid (für Ansätze mit Zusatz von S9-Mix). Die Zugabe von S9-Mix, einem Homogenat aus Rattenlebern mit einer Vielzahl von Stoffwechsellenzymen, ermöglicht es auch Substanzen zu erfassen, die erst nach Aktivierung durch Stoffwechsellenzyme (Biotransformation) im Organismus gentoxisch wirken. Wachstumsmedium (DF-Medium) diente als Negativkontrolle und DF-Medium mit 1% des Lösungsmittels DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Am Tag vor Testbeginn wurden 96-Well-Platten mit Zellen und DF-Medium besiedelt und für 24 h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Des Weiteren wurden je 200 µL der Probenextrakte in 20 µL DMSO überführt. Am Testtag, nach 24 h Inkubation, wurde das DF-Medium mit Testmedium ersetzt. Das Testmedium war entweder mit der Referenzsubstanz, den Probenextrakten (1% DMSO) in 1, 3, 10, 30 und 100facher Verdünnung oder der Lösungsmittelkontrolle versetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten getestet. Die Konzentrationen der Positivkontrolle reichten von 1.0x10<sup>-10</sup> - 1.0x10<sup>-06</sup> M (0.1-1200 µg/L) (Actinomycin D) und 3.0x10<sup>-9</sup> - 3.0x10<sup>-5</sup> M (0.8-7800 µg/L) (Cyclophosphamid). Die Probenextrakte wurden ab einem Anreicherungsfaktor von 5 getestet.



Nach weiteren 24 h Inkubation wurde das Probe-Medium entfernt und die Zellen in 30  $\mu$ L Triton-Lyse-Puffer lysiert.

Im Anschluss wurde die Aktivität des Enzyms Luciferase, die das Protein Luciferin unter Erzeugung von Licht umwandelt, mittels eines Luminometers gemessen (Lucy 2, Anthos, Austria) und als *relative light units* (RLU) ausgedrückt. Die Lichtproduktion ist proportional zum erzeugten Effekt.

### Datenauswertung

Die ermittelten Werte wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in Cyclophosphamid- bzw. Actinomycin D-Äquivalenzkonzentrationen umgerechnet. Die Datenauswertung erfolgte mit Excel und dem Statistikprogramm GraphPad Prism durch Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve für die Referenzsubstanz und die Umweltproben.

## 2.1.5 Ames-Test mit Bakterien

### Testorganismus

Der Test wird mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* durchgeführt. Im Test wird eine Mutante eingesetzt, die gentechnisch so verändert wurde, dass sie die Aminosäure Histidin, die die Bakterien zum Wachstum brauchen, nicht selbst herstellen kann. Im Test wurden 2 Bakterienstämme verwendet: TA 98 und TA 100. Beide weisen unterschiedliche genetische Veränderungen auf (TA98: Basenpaarsubstitution (Austausch von DNA-Basenpaaren) und TA100: Frameshift-Mutation (Verschiebung im DNA-Leseraster)). Dadurch kann auf die Art der mutagenen Wirkung der Abwasserprobe geschlossen werden. Auch hier wurde der Test, wie beim Gentox-CALUX® (Kapitel 2.1.4), jeweils mit und ohne Zusatz von Rattenleberenzymen (S9-Mix) durchgeführt, um eine Umwandlung und Aktivierung der Substanzen durch Stoffwechsellenzyme zu simulieren. Einen Tag vor Testbeginn wurden die Bakterien in Wachstums-Medium (Oxoid Broth, Uni-pathOxoid, Basingstoke, UK) vorkultiviert.

### Testprinzip und -durchführung

Der Test wurde von der Firma Xenometrix AG (Xenometrix AG, Allschwil, Schweiz) in 384-Well-Mikrotiterplatten nach Gee, Maron [29] durchgeführt. Er ist eine veränderte Version des klassischen Ames-Tests [30], bei der in flüssigen Phasen gearbeitet wird. Mit diesem Test können vererbte Veränderungen des Erbguts (mutagene Wirkung) untersucht werden. Die im Test eingesetzten gentechnisch veränderten Bakterien können unter Kontrollbedingungen in histidinfreiem Nährmedium nicht wachsen. Befinden sich jedoch mutagen-wirkende Substanzen in der Abwasserprobe, können sie wieder zurückmutieren und so die Fähigkeit zur Bildung von Histidin erneut erhalten. Diese Bakterien können sich nun im histidinfreien Nährmedium vermehren.

Vor dem Test wurden 10  $\mu$ L Extrakt in das Lösungsmittel DMSO überführt. Die Proben (siehe Kapitel 2.1.1) wurden 3fach in 1:2 Verdünnungsreihen untersucht mit einem maximalen Konzentrationsfaktor von 20. Das Lösungsmittel DMSO diente als Negativkontrolle und 3 mutagene Substanzen (2-Nitrofluoren (2-NF), 4-Nitroquinolin-N-Oxid und 2-Aminoanthrazen (2-AA)) als Positivkontrollen (je 3 Replikate).

Am Testtag wurde die Bakterienkultur (25  $\mu$ L/Vertiefung) in 24-Well-Platten zusammen mit Expositionsmedium mit begrenztem Histidin (215  $\mu$ L/Vertiefung, jeweils mit oder ohne S9-Mix) und der zu testenden Probe (je 10  $\mu$ L) für 90 min auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschliessend wurden in jede Vertiefung 2.6 mL histidinfreies Indikator-Medium, in dem nur rückmutierte Bakterienkolonien wachsen können, zugegeben und gemischt. Diese Mischung wurde in Aliquots von je 50  $\mu$ L auf 384-Well-Platten verteilt. Das Indikator-Medium enthielt zusätzlich einen pH-Indikatorfarbstoff, der sich bei einem Wachstum der Bakterien, d.h. dem Auftreten von Rückmutationen, von lila hin zu gelb verfärbt.

Daraufhin wurden die Bakterien bei 37°C über 48 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Anzahl der Vertiefungen mit rückmutierten Bakterienkolonien bestimmt. Je mehr solcher Vertiefungen



mit rückmutierten Bakterienkolonien auftreten, desto höher ist die mutagene Aktivität der untersuchten Schadstoffe oder Umweltproben. Neben der mutagenen Wirkung wurde auch eine mögliche Zelltoxizität der Abwasserextrakte untersucht.

### Datenauswertung

Zur Bestimmung der mutagenen Wirkung der Abwasserproben (je 3 Replikate pro Verdünnung) wurde die Zunahme (*fold increase*) der rückmutierten Kolonien im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt (18 Replikate). Hierfür wurde die Anzahl positiver Vertiefungen bei der jeweiligen Proben-Konzentration durch den Mittelwert + Standardabweichung der Vertiefungen in der Lösungsmittelkontrolle geteilt. Die von Xenometrix verwendete Einteilung der Mutagenität findet sich in Tab. 2, eine genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung findet sich in [31].

**Tab. 2: Definition der Mutagenität im Ames-Test**

<sup>a</sup>einzelner Messwert mit Induktion  $\geq 2$ , <sup>b</sup>mehrere Messwerte mit Induktion  $\geq 2$  oder einzelner Messwert mit Induktion  $\geq 2$  in der höchsten Konzentration.

Anstieg	Dosis-Wirkungsbeziehung	Mutagenität
< 2	jede Art von Dosis-Wirkungsbeziehung	negativ
$\geq 2$	keine	wahrscheinlich negativ <sup>a</sup> wahrscheinlich positiv <sup>b</sup>
$\geq 2$	ja	positiv

### 2.1.6 Leuchtbakterientest

Der Leuchtbakterientest wird zur Ermittlung einer allgemeinen, nicht spezifischen Toxizität verwendet. Die Bakterien reagieren empfindlich auf eine grosse Anzahl von Schwermetallen und auf unspezifisch wirkende Chemikalien [32]. Das Testprinzip basiert auf einer durch toxische Substanzen ausgelösten Störung des Energiemetabolismus, was sich in einer verminderten Lichtemission äussert [33]. Die Erzeugung des Lichts resultiert aus dem Zerfall eines Produktes, welches aus der Oxidation von Luziferin entsteht. Diese Reaktion wird durch das Enzym Luziferase katalysiert [34].

#### Testorganismus

Der Test wird mit dem gramnegativen, marinen Bakterium *Aliivibrio fischeri* durchgeführt. Dieser Organismus ist ubiquitär in Ozeanen, Flussmündungsgebieten, Brackwasser und marinen Sedimenten verbreitet und weist ein natürliches Leuchten (Biolumineszenz) auf [34]. Die verwendeten Bakterien sowie die Rekonstitutionslösung wurden von der Firma Hach Lange bezogen (HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, DE).

#### Testdurchführung

Der Test wurde gemäss der SOP „Bacterial Bioluminescence Inhibition Test“ [33] in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Substanz 3,5-Dichlorphenol und reines Bakterienmedium und Ethanol (20  $\mu$ L/Vertiefung, n = 8 Vertiefungen/Platte) als Negativkontrollen.

Die Positivkontrolle und die Umweltproben wurden in 3facher Ausführung (Triplikate) in einer 1:2 Verdünnungsreihe getestet mit einer Anfangskonzentration von 3,5-Dichlorphenol von  $3 \times 10^{-4}$  M (48.9 mg/L) (in Testmedium). Die extrahierten Proben wurden auf der Testplatte 1:2 mit Ethanol verdünnt. Die maximalen Anreicherungsfaktoren der Abwasserproben lagen bei 25 (VKB), 125 (NKB) und 167 (alle weiteren Reinigungsstufen). Nach vollständigem Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Substanzen in 120  $\mu$ L Bakterienmedium rückgelöst.

Die gefriergetrockneten Bakterien wurden unmittelbar vor Testbeginn mit einer Reaktivierungslösung versetzt und anschliessend 15 min bei 15°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Bakte-



rien für den Test verwendet. Kurz vor Ende des Abdampfens der Lösungsmittel wurden die Bakterien mit Bakterienmedium verdünnt, 100 µL der Bakterienlösung zu jeder Vertiefung einer weissen 96-Well-Platte hinzugefügt und die Lumineszenz der Bakterien als Wert zum Zeitpunkt 0 gemessen. Anschliessend wurden 100 µL der rückgelösten Proben auf die Bakterienplatte pipetiert und die Platte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Lichtemission der Leuchtbakterien wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Spektrometers (Synergy 2, Biotek, Winooski, USA) nach 30 min bestimmt.

### Datenauswertung

Zur Quantifizierung von allgemeiner Toxizität auf Bakterien wurden Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen (Basis-TEQ) berechnet (siehe Kapitel 2.1.2). Für die Ermittlung dieser allgemeinen Toxizität wird ein „virtueller basistoxischer Stoff“ herangezogen (logKow: 3; Molekulargewicht: 300 g/mol) [35]. Bei der statistischen Auswertung wurden um ein vielfaches höhere Ergebnisse aus dem Vorklärbecken und dem Nachklärbecken nicht einbezogen. Der Grund hierfür war, dass der Schwerpunkt der ReTREAT-Studie auf dem Effizienzvergleich der Nachbehandlungen lag. Deshalb wurden bei der statistischen Auswertung jeweils die Ergebnisse der Ozonung mit den Ergebnissen aus den Nachbehandlungen verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test).

### 2.1.7 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen

Der kombinierte Algentest wird mit einzelligen Grünalgen der Art *Raphidocelis subcapitata* (früher: *Pseudokirchneriella subcapitata*) durchgeführt. Mit diesem Test können Auswirkungen auf die Photosynthese der Algen bestimmt werden. Diese spezifische Wirkung von bestimmten Herbiziden und anderen Stoffen mit dem entsprechenden Wirkmechanismus (Photosystem II-Hemmstoffe) tritt sehr schnell auf (innerhalb 2 h nach Exposition der Algen). Die Hemmung des Photosystems II (PSII) wird mit dem Maxi-IPAM (imaging pulse amplitude modulation) anhand der photochemischen Quantenausbeute (Y) gemessen, indem eine Reihe aufeinanderfolgender Lichtimpulse auf die Algen gegeben wird. Bei Inhibition des PSII wird die Energie durch das Photosystem der Algenzellen nicht umgewandelt, sondern in Form von Fluoreszenz emittiert und mit dem IPAM detektiert. Auswirkungen auf das Wachstum (Verringerung der Wachstumsrate) werden über 24 h gemessen. Die Wachstumshemmung steht für eine unspezifische Toxizität und wird anhand der Zelldichte bestimmt.

### Testorganismus

Der kombinierte Algentest wurde am Oekotoxzentrum durchgeführt. Die Algen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Göttingen, Deutschland).

### Testdurchführung

Der Test wurde nach Escher et al. [36] durchgeführt. Das Herbizid Diuron (in Ethanol gelöst) diente als Positivkontrolle und reines Algentest-Medium sowie Ethanol (50 µL/Vertiefung, n = 8 Vertiefungen/Platte) als Negativkontrollen. Die Positivkontrolle und die Umweltproben wurden in Triplikaten in einer 1:2 Verdünnungsreihe getestet. Die Anfangskonzentration von Diuron betrug in der ersten Vertiefung  $3 \times 10^{-7}$  M und die maximalen Anreicherungsfaktoren der Abwasserproben waren 27, 40 oder 53 (VKB, jeweils MK 1,2,3) 100, 117 oder 133 (NKB, jeweils MK 1,2,3), 133 (alle weiteren Reinigungsstufen). Nach vollständigem Abdampfen der Lösungsmittel wurden die Substanzen in 150 µL Algenmedium rückgelöst. Schliesslich wurden 150 µL der Algenkultur mit einer optischen Dichte ( $OD_{685}$ ) von 0.1 zu jeder Vertiefung hinzugefügt. Die Photosynthesehemmung wurde über die effektive Quantenausbeute (Y) mittels eines IPAM (Walz, Efeltrich, Deutschland) nach 2 und 24 h gemessen (siehe auch [36] und [37]). Die Dichte der Algen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 685 nm ( $OD_{685}$ ) mittels eines Mikrotiterplatten-Spektrometers (Synergy 2, Biotek, Winooski, USA) an 4 Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden (nach 0, ca. 2.5, ca. 14.5 und 24 h Exposition) bestimmt und die Wachstumsrate errechnet.



## Datenauswertung

Zur Quantifizierung der Photosynthesehemmung und der allgemeinen Toxizität wurden bioanalytische Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) berechnet (siehe Kapitel 2.1.2). Für die Ermittlung einer allgemeinen Toxizität im kombinierten Algentest (Endpunkt: Wachstumshemmung) wird, wie im Leuchtbakterientest, ein „virtueller basistoxischer Stoff“ herangezogen (logKow: 3; Molekulargewicht: 300 g/mol) [35]. Zur Bestimmung des Endpunktes PSII-Hemmung im kombinierten Algentest wird Diuron eingesetzt. Die ermittelten Werte wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in Diuron-Äquivalenzkonzentrationen ( $\mu\text{g DEQ/L}$ ) (Photosynthese-Hemmung) bzw. in Basis-Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen ( $\text{mg Basis-TEQ/L}$ ) (Wachstumshemmung) umgerechnet. Auch beim kombinierten Algentest wurde bei der statistischen Auswertung jeweils die Ergebnisse der Ozonung mit den Nachbehandlungen verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test).

### 2.1.8 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen

#### Testorganismus

Im verwendeten Biotest wurden die Auswirkungen der untersuchten Abwässer auf den Blattfusskrebs *Ceriodaphnia dubia* in einem chronischen Toxizitätstest in 7 Tagen bestimmt (Hemmung des Populationswachstums nach ISO/CD 20665 [38] und AFNOR T90-376 [39]).

#### Testdurchführung

Der Test wurde von Soluval Santiago (Couvét, CH) mit einer leichten Modifikation der Standards durchgeführt: Das Kontroll- bzw. Verdünnungsmedium, eine Mischung aus  $\frac{1}{4}$  Evian Mineralwasser,  $\frac{1}{4}$  Elendt M4 Medium [40] und  $\frac{1}{2}$  entionisiertem Wasser, entsprach einem mässig harten Wasser, das mit Selen und Vitamin B12 ergänzt war. Als Futter diente eine Mischung aus Hefe, einer aufgeschlossenen Suspension von Fischflocken (TetraMin®) und Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata* und *Chlorella* sp.).

Die Testorganismen stammten aus einer Laborkultur (Soluval Santiago, Couvét, CH). Die Jungtiere (zu Beginn des Tests jünger als 24 h und mit weniger als 8 h Altersunterschied voneinander) wurden bis zu 7 Tage in einem statischen System mit täglichem Wasserwechsel gegenüber den verschiedenen Testansätzen exponiert (ein Kontrollansatz und 5 - 6 Abwasserverdünnungen mit 12 Replikaten pro Ansatz). Die Proben wurden in einer geometrischen Reihe getestet mit einem Verdünnungsfaktor von etwa 2 in einem Bereich von 90% bis 11% Abwasseranteil. Alle Tests wurden bei  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  in einer Klimakammer durchgeführt, mit einem 16:8 h hell:dunkel-Rhythmus und einer Beleuchtungsintensität von 300 bis 500 Lux.

Das Überleben der Mütter und der Nachkommen, sowie die Anzahl der Nachkommen wurden täglich, jeweils beim Wasserwechsel, bestimmt. Alle Validitätskriterien waren erfüllt.

Die physikalisch-chemischen Charakteristika der Proben (pH, gelöster Sauerstoff ( $\text{mg/L}$ ) und elektrische Leitfähigkeit ( $\mu\text{S/cm}$ )) wurden bei Ankunft der Proben im Labor, zu 4-5 Zeitpunkten während der Tests und am Testende gemessen.

#### Datenauswertung

Zeigten die Proben toxische Effekte, wurden die Ergebnisse integriert und als  $\text{EC}_{50}$  bzw.  $\text{EC}_x$  angegeben (siehe Kapitel 2.1.2). Die Werte für die  $\text{EC}_x$  wurden mit 95% Konfidenzintervallen angegeben, berechnet mit REGTOX v. 7.0.5 Software [41]. Ebenso wurden die  $\text{NOEC}$  und die  $\text{LOEC}$  (siehe Kapitel 2.1.2) mit TOXSTAT v. 3.4 Software [42] berechnet.



## 2.2 *In vivo*-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut

### 2.2.1 Glanzwurm-Fortpflanzungstest mit *Lumbriculus variegatus*

#### Testorganismus

Dieser Fortpflanzungstest wurde mit Glanzwürmern (*Lumbriculus variegatus*) durchgeführt. Die Tiere kommen in Europa und Nordamerika in Süßwasser-Ökosystemen vor [43], werden 4-6 cm lang und haben einen Durchmesser von bis zu 1.5 mm [44]. *L. variegatus* ernährt sich von Algen und am Gewässerboden abgelagerten Partikeln, wie sich abbauendem Pflanzenmaterial, Bakterien und Pilzen. Die Vermehrung erfolgt fast ausschliesslich über Teilung/Fragmentierung [45]. Die Würmer aus einer Laborkultur der ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim, Deutschland) waren 2 Wochen vor Teststart synchronisiert worden.

#### Medien

##### Testmedien

Als Testmedien wurden unverdünnte Abwässer aus verschiedenen Abwasserbehandlungsstufen der ARA Neugut verwendet (siehe Kapitel 2.1.1 und Abb. 1), die kontinuierlich aus dem Abwasserstrom entnommen und je Abwasserbehandlungsstufe in ein Vorratsgefäß befördert wurden. Aus diesem Vorratsgefäß wurden die Testmedien anschliessend über Membranplatten (Porengrösse: 0.4 µm, MBR Type 510, Kubota, Japan) gefiltert, mittels einer Schlauchquetschpumpe (Ismatec SA VARIO, Schweiz, und Heidolph Pumpdrive 5001, Schweiz) zu Verteilerstücken und von dort aus mit weiteren Schlauchquetschpumpen (Ismatec BVP und IPS, Schweiz) in die Testgefässe gepumpt.

##### Kontrollmedium

Zusätzlich zur Exposition der Testorganismen gegenüber den Abwässern wurden Testorganismen gegenüber rekonstituiertem (= künstlich zusammengesetztem) Wasser nach [46] exponiert. Für die Herstellung von rekonstituiertem Wasser wurden 200 L deionisiertes Wasser in einen Behälter vorgelegt und anschliessend die folgenden Salze zugegeben: 58.8 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 24.65 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 12.95 g  $\text{NaHCO}_3$ , 1.15 g KCl. Das rekonstituierte Wasser wurde danach für ca. 1 h gemischt. Anschliessend wurden pH, Leitfähigkeit, Sauerstoffsättigung und Wasserhärte gemessen. Bei Übereinstimmung der Werte mit dem Sollbereich (Tab. 3) wurde das Wasser in den Vorratsbehälter überführt und für den Test verwendet.

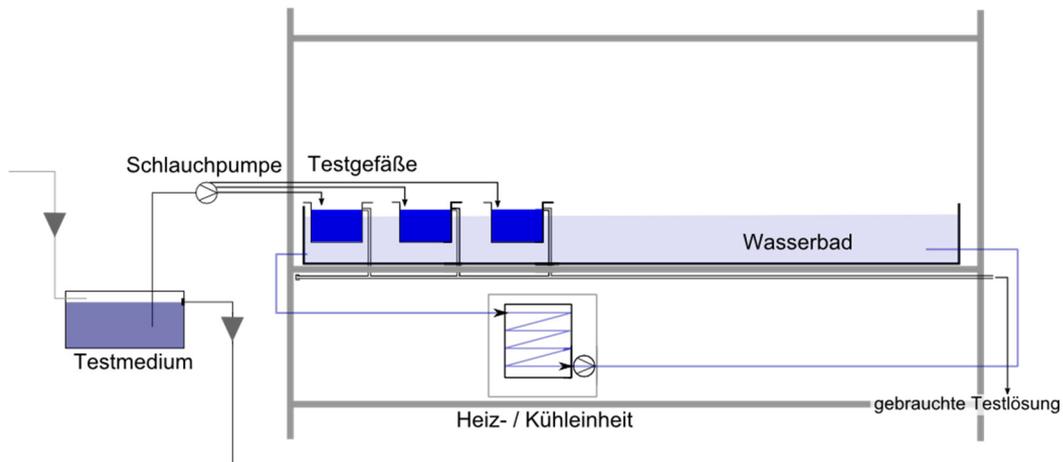
**Tab. 3: Sollbereich der physikalisch-chemischen Parameter für rekonstituiertes Wasser.**

Bei der Herstellung von rekonstituiertem Wasser lagen die gemessenen Werte immer im Sollbereich.

Parameter	Sollbereich
pH	7.5 – 8.0
Leitfähigkeit	550 – 650 µS/cm
Sauerstoffsättigung	> 80%
Wasserhärte	178 – 267 mg/L $\text{CaCO}_3$

#### Exposition der Testorganismen

Der Glanzwurm-Fortpflanzungstest wurde von der Firma ECT in Zusammenarbeit mit dem Oekotoxzentrum im Durchfluss durchgeführt. Die Testmedien und das Kontrollmedium wurden aus den Vorratsgefässen mit einer nominalen Fließrate von 10 mL/min kontinuierlich in die Testgefässe (250 mL Glasgefässe mit Überlauf) gefördert. Jedes Testgefäss war mit einem Überlauf ausgestattet durch den die Test- und Kontrollmedien ablaufen konnten, überschüssiges Wasser floss in die ARA zurück. Der Testaufbau ist in Abb. 3 beschrieben. Je Behandlungsstufe und für die (Negativ-)Kontrolle wurden 6 Replikate getestet (siehe Abb. 4).



**Abb. 3: Schema des Durchflusssystems.**

Die Testmedien flossen von der jeweiligen Probenahmestelle in der Abwasserbehandlung in das Vorratsgefäß (links) und wurden mit einer Schlauchpumpe in die Testgefäße gefördert. Überschüssiges Wasser konnte durch Überläufe aus den Testgefäßen abfließen. Die Testgefäße standen in einem Wasserbad, das mittels einer Heiz- und Kühleinheit auf die Solltemperatur eingestellt wurde.



**Abb. 4: Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern.**

Für die Kontrolle und jede Abwasserbehandlung wurden jeweils 6 Replikate mit 10 Glanzwürmern eingesetzt. Jedes Testgefäß wurde über eine Schlauchquetschpumpe mit Testwasser versorgt, mittels einer Aquarienluftpumpe belüftet und über ein Wasserbad temperiert.

### Testbeginn

Einen Tag vor Testbeginn wurden die Testgefäße 3 cm hoch mit Quarzsand (ca. 80 mL) und mit Wasser der jeweiligen Behandlungsstufe gefüllt und in das auf  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  temperierte Wasserbad gestellt. Anschliessend wurden die Testgefäße an das Durchflusssystem angeschlossen und der Durchfluss gestartet. Bei Testbeginn wurden 10 Würmer in jedes Testgefäß gegeben.



## Exposition

Die Exposition erfolgte unter den in Tab. 4 angegebenen Bedingungen. Physikalisch-chemische Parameter wie Sauerstoffkonzentration, pH und Ammoniumkonzentration wurden 3x pro Woche, die Leitfähigkeit bei Testbeginn und Testende gemessen.

**Tab. 4: Glanzwurm-Fortpflanzungstest: Expositionsbedingungen.**

Testdauer:	28 Tage (5. März - 2. April 2015)
Testorganismen je Replikat:	10
Testansätze	48 Testansätze <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7 Abwässer mit je 6 Replikaten</li> <li>• Kontrolle mit 6 Replikaten</li> </ul>
Exposition:	Durchfluss, 10 Testvolumen pro Tag
Testgefäße:	Glassgefäße, 250 mL
Belüftung:	Ja
Fütterung:	TetraMin (vor Testbeginn Quarzsand beigemischt)
Photoperiode:	12 h / 12 h hell/dunkel
Temperatur:	Solltemperatur: 20 ± 2°C

## Testende

Nach Testende wurde jedes Testgefäß gesiebt und die Würmer pro Testgefäß gezählt und auf Aluminiumfolie gesammelt. Anschliessend wurde das Frischgewicht pro Replikat bestimmt, die Würmer bei 100°C für 12 h getrocknet und das Trockengewicht gemessen. Nach einer weiteren Trocknung für 12 h bei 550°C wurden die Würmer erneut gewogen und das aschefreie Trockengewicht berechnet.

## Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistikprogramm GraphPad Prism. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten für Anzahl und Biomasse der Würmer aus Nachklärbecken bzw. Ozonung jeweils mit den Ergebnissen aus den nachfolgenden Behandlungen verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test).

## 2.2.2 Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen

### Testorganismus

Der *Fish Early Life Stage Toxicity* (FELST)-Test wurde mit Eiern und Larven von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) durchgeführt. Diese Fische wurden aus Nordamerika nach Europa eingeführt und werden seitdem vor allem als Speisefisch gehältert [47]. Sie sind ovipar (eierlegend), die Fortpflanzung findet zwischen Oktober und April statt. Die Larven schlüpfen ca. 3 Wochen nach der Befruchtung der Eier und die aktive Aufnahme von exogener (äusserer) Nahrung beginnt ca. 20 Tage nach Schlupf [48].

### Medien

#### Testmedien

Als Testmedien wurden, wie beim Glanzwurm-Fortpflanzungstest, unverdünnte Abwässer aus verschiedenen Abwasserbehandlungsstufen der ARA Neugut verwendet (siehe Kapitel 2.2.1 und Abb. 1).

#### Kontrollmedium

Als Kontrollmedium wurde rekonstituiertes Wasser nach [46] verwendet (siehe Tab. 3).



## Exposition der Testorganismen

Der Test mit frühen Lebensstadien der Regenbogenforelle wurde von der Firma ECT (ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim, Deutschland) in Zusammenarbeit mit dem Oekotoxzentrum im Durchfluss durchgeführt. Von dem jeweiligen Probenahmepunkt aus dem Abwasserstrom wurden die Testmedien kontinuierlich in Vorratsgefässe gefördert (siehe Kapitel 2.2.1, Abb. 3). Die nominale Fliessrate der Testmedien in die Hälterungsgefässe lag zu Beginn des Tests bei ca. 11 mL/min (Tag 0-31), und wurde dann auf 16 mL/min (Tag 32-48) bis zu 22 mL/min (Tag 49-96) gesteigert. Die Vorratsgefässe waren mit einem Überlauf ausgestattet, überschüssiges Wasser floss zurück in die ARA.

## Testbeginn

Einen Tag vor Testbeginn wurden die Testgefässe in das Wasserbad gestellt, die Temperierung des Wasserbades wurde eingeschaltet und das Durchflusssystem wurde gestartet. Am Tag des Testbeginns wurden unbefruchtete Eier von 2 Weibchen und Samen von 3 Männchen von einem Fischzüchter (Nadler, Rohr, Schweiz) bezogen, die Temperatur der Eier war bei Ankunft ca. 8°C. Die Beweglichkeit der Spermien wurde mikroskopisch untersucht und als geeignet für die Verwendung im Test bewertet. Anschliessend wurden Eier und Samen in einer Schale 3 min manuell gemischt. Dabei stand die Schale im Wasserbad, die Temperatur lag zwischen 9.1 und 9.6°C. Danach wurden die Eier für 10 min bei 9.6 - 9.9°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Exposition begonnen. Dazu wurden jeweils 10 Eier in jedes Testgefäss eingesetzt. Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis sich in jedem Testgefäss 60 Eier befanden. Vier Tage nach Expositionsbeginn wurden Eier, die während der Befruchtung oder dem Transport beschädigt wurden, entfernt. Im Anschluss wurde die Anzahl der Eier je Testgefäss auf 30 reduziert.

## Exposition

Die Exposition erfolgte unter den in Tab. 5 angegebenen Bedingungen. Die Temperatur wurde in den Testgefässen täglich gemessen. Die physikalisch-chemischen Parameter Sauerstoffkonzentration, pH, Leitfähigkeit und Ammoniumkonzentration wurden einmal pro Woche gemessen.

**Tab. 5: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Expositionsbedingungen.**

Testdauer:	96 Tage (22. Januar - 28. April 2015)	
Testorganismen je Replik:	30	
Testansätze	28 Testansätze <ul style="list-style-type: none"><li>• 8 Abwässer mit je 3 Replikaten</li><li>• Kontrolle mit 4 Replikaten</li></ul>	
Exposition:	Durchfluss,	
	0 - 31 d nach Expositionsbeginn:	2 Gefässvolumen je Tag
	32 - 48 d nach Expositionsbeginn:	3 Gefässvolumen je Tag
	49 d - Testende:	4 Gefässvolumen je Tag
Testgefässe:	Edelstahlgefässe, 8 L	
Belüftung:	ca. 4 Luftblasen/Sekunde	
Fütterung:	Nach Schlupf: 3 mal täglich <i>ad libitum</i> mit Forellenaufzuchtfutter	
Photoperiode:	Vor Schlupf:	24 h Dunkelheit
	Nach Schlupf:	16 h / 8 h hell/dunkel
Temperatur:	Solltemperatur vor Schlupf:	10 ± 2°C
	Solltemperatur nach Schlupf:	12 ± 2°C

## Testende

Als empfohlenes Testende wird in der OECD-Richtlinie [24] der Zeitpunkt genannt, bei dem die Regenbogenforellen der Kontrollen 2 Wochen Nahrung aufnehmen. Dies ist bei diesem Test der Tag 64. Der FELST auf der ARA Neugut wurde jedoch bis zu 96 Tagen weitergeführt, da für zusätzliche Untersuchungen (Histopathologie und Genexpression) eine grössere Menge an Biomasse benötigt wurden.



Nach Testende wurden alle Fische mit MS-222 (3-Aminobenzoessäure-Ethylester-Methanesulfonat) getötet und kurz mit einem Gewebetuch getrocknet. Danach wurde das Gewicht der trockengetupften Fische bestimmt. Zur Längenvermessung wurden die Fische eines Replikats zusammen mit einem Millimetermass fotografiert. Hierbei wurden Gesamtlänge (von Kopfspitze bis Schwanzspitze) und Standardlänge (von Kopfspitze bis zum hinteren Ende des Körpers) bestimmt.

Im Anschluss an das Wiegen wurden die Fische sezziert und einzelne Organe (Leber, Kieme und Niere) ebenso wie Gewebe für die Untersuchung der Genexpression, von oxidativem Stress und dem Gewebezustand (Histopathologie) präpariert. Die Ergebnisse der Analyse von oxidativem Stress (FOX Assay) und der Histopathologie sind in der Masterarbeit von Christina Thiemann detailliert beschrieben [49]. Die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen werden ausführlich im Rahmen des Projektes „Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: Biomonitoring mit Forellen“ von Stephan Fischer diskutiert werden. Im vorliegenden Bericht werden die Ergebnisse der Histopathologie, der Analyse von oxidativem Stress sowie die ersten Ergebnisse der Genexpression zusammengefasst und in die Diskussion miteinbezogen.

### **Datenauswertung**

Die Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel und den Statistikprogrammen GraphPad Prism (FELST und Genexpression) und JMP 11.1.1 (SAS Institute Inc., USA) (Histopathologie).

*Fish Early Life Stage Toxicity Test:* Die Ergebnisse aus dem Nachklärbecken bzw. der Ozonung wurden jeweils mit den Ergebnissen aus den nachfolgenden Behandlungen verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test).

*Histopathologie:* Der Gewebezustand im Nachklärbecken bzw. der Ozonung wurde jeweils mit dem Gewebezustand in den nachfolgenden Behandlungen verglichen. Des Weiteren wurde der Gewebezustand der unbelasteten Kontrolle mit allen Behandlungen verglichen (Tukey-Kramer-HSD-Test). Um einen möglichen Einfluss von abiotischen Parametern auf die Ergebnisse zu evaluieren wurde eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) angewendet.

*Genexpression:* Die Genexpression in Lebergeweben der Regenbogenforellen aus dem Nachklärbecken bzw. der Ozonung wurde mit derjenigen in den nachfolgenden Behandlungen verglichen. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich zwischen der Genexpression in der Kontrolle und den verschiedenen Behandlungen (ANOVA mit Dunnett's-Test plus Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test unabhängig von der ANOVA).



### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 *In vitro*- und *in vivo*-Biotests im Labor

##### 3.1.1 Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstest mit menschlichen Zelllinien

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den p53-CALUX® sind in Tab. 6 aufgelistet.

**Tab. 6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstest.**  
Die Induktion von Gentoxizität wird im Vergleich zur Kontrolle beurteilt. Proben die eine Induktion von mehr als 1.5 zur Kontrolle bewirken, werden als positiv eingestuft.

Wirkmechanismus	Test	Referenz-substanz	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze (3.3 x Nachweisgrenze)
Gentoxische Wirkung	p53-CALUX®-S9	Actinomycin D	0.02-0.05 µg/L	0.07-0.17 µg/L
	p53-CALUX®+S9	Cyclophosphamid	1100-2750 µg/L	3600-9100 µg/L

In keiner der untersuchten Abwasserproben konnte mit dem Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstest eine gentoxische Wirkung nachgewiesen werden. Ein Beispiel für eine Induktionskurve des p53-CALUX mit der jeweiligen Referenzsubstanz sowie mit Proben aus der ersten Messkampagne ist beispielhaft in Abb. 27 in Anhang 2 abgebildet.

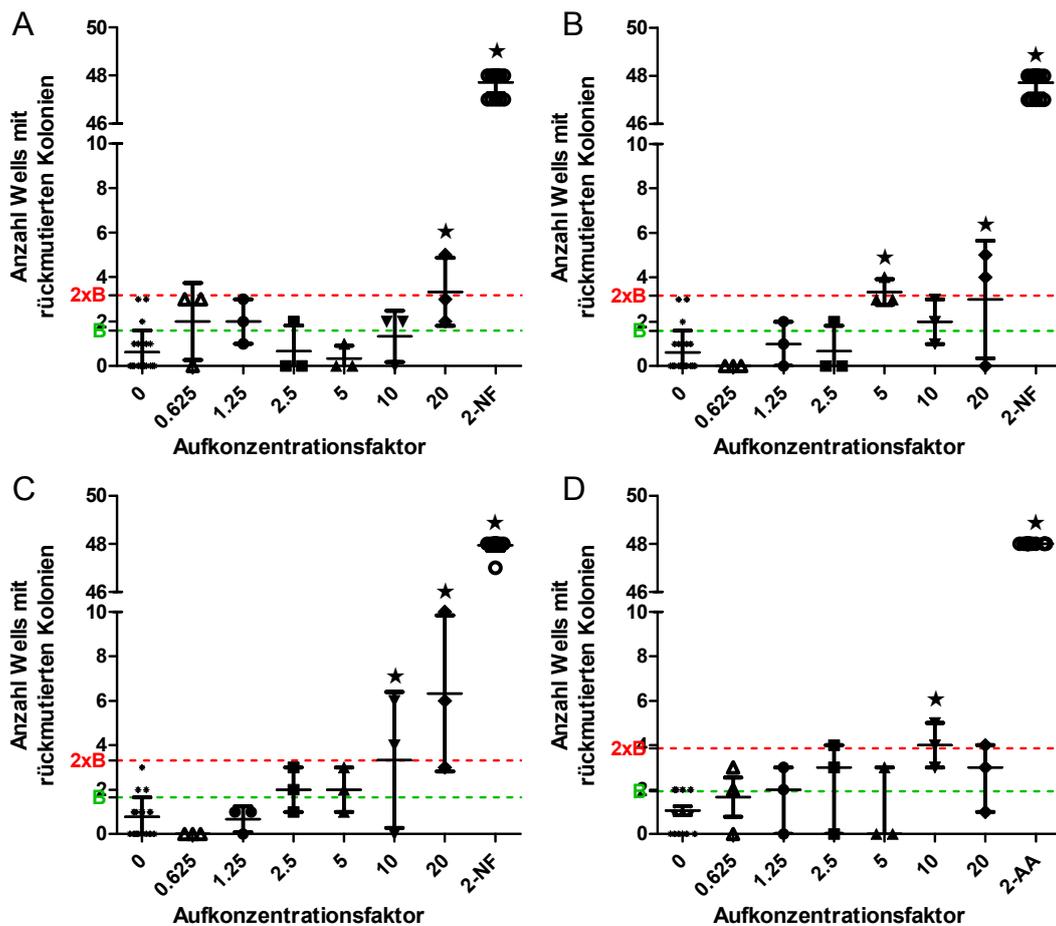
##### 3.1.2 Ames-Test mit Bakterien

Im Ames-Test wurde in 1-fach konzentrierten Abwasserproben keine Mutagenität nachgewiesen. Bei 20fach aufkonzentrierten Abwasserproben trat vereinzelt eine mutagene oder mögliche mutagene Wirkung auf:

Beim Bakterienstamm TA98 zeigte die Probe nach Ozonung in der ersten Messkampagne (2.-3.2.2015) (ohne metabolische Aktivierung durch den S9-Mix) eine mehr als 2fache Induktion bei der 20fach konzentrierten Abwasserprobe (Abb. 5A). Aufgrund einer fehlenden Dosis-Wirkungsbeziehung wird die Probe nur als möglicherweise mutagen eingestuft (Klassifizierung siehe Kapitel 2.1.5).

Auch die Proben nach dem Sandfilter aus der ersten Messkampagne (ohne S9-Mix, Abb. 5B) und der dritten Messkampagne (14.-15.4.15) (mit S9-Mix, Abb. 5D) zeigten jeweils in der 5 und 20fachen bzw. in der 10fachen Anreicherung eine mehr als 2fache Induktion an. Aufgrund der fehlenden Dosis-Wirkungsbeziehung werden diese beiden Proben ebenfalls als möglicherweise mutagen klassifiziert.

Als eindeutig mutagen wird die Probe nach dem Sandfilter in der dritten Messkampagne (ohne S9-Mix, Abb. 5C) eingeschätzt, da neben der mehr als 2fachen Induktion bei 20- und 10 facher Anreicherung eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung auftrat.

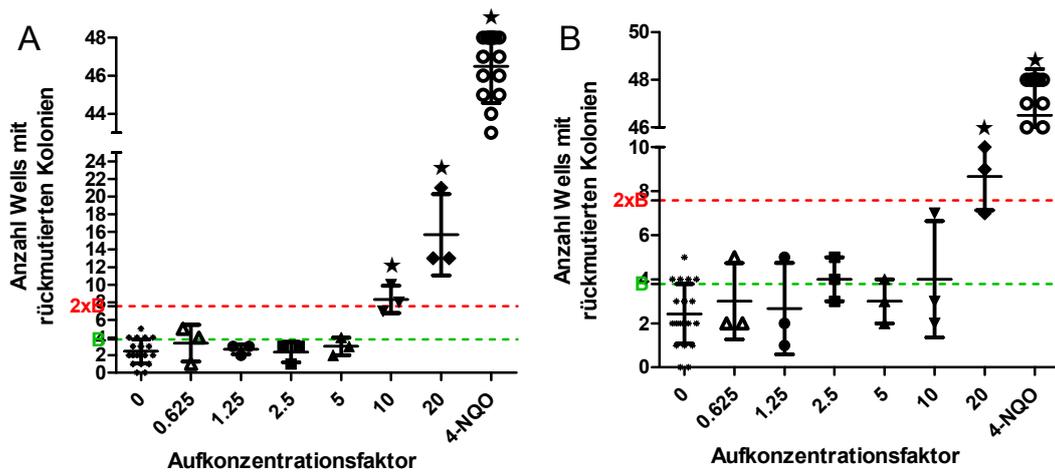


**Abb. 5: Ames-Test mit Bakterienstamm TA98: Zahl von Vertiefungen mit Rückmutanten bei verschiedenen Konzentrationen der Proben (A) „Ozonung 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix, (B) „Sandfilter 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix, (C) „Sandfilter 3. Messkampagne“ ohne S9-Mix und (D) „Sandfilter 3. Messkampagne“ mit S9-Mix**

Einzelwerte und Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). A und B Kontrolle  $n = 21$ , C und D Kontrolle  $n = 18$ ,  $n = 3$  Replikate pro Anreicherungsfaktor,  $n = 18$  Replikate für Positivkontrollen (2-NF = 2-Nitrofluoren, 2-AA = 2-Aminoanthracen). Grün: Basislinie (MW der Negativkontrolle + SD), Rot: Effektlinie (2x Basislinie).  $\star$ : signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Basislinie in Grün) (ANOVA mit Dunnett's-Test).

Beim Ames-Test mit dem Bakterienstamm TA100 zeigte die Probe nach Ozonung in der ersten Messkampagne (ohne S9-Mix, Abb. 6A) bei der 10 und 20fachen Anreicherung eine mehr als 2fache Induktion sowie eine Dosis-Wirkungsbeziehung. Dadurch wird diese Probe als eindeutig mutagen eingestuft.

Die Probe nach dem Sandfilter in der ersten Messkampagne (ohne S9-Mix, Abb. 6B) zeigte nur in der 20fachen Anreicherung eine mehr als 2fache Induktion. Durch das Fehlen einer Dosis-Wirkungsbeziehung wird diese Probe als möglicherweise mutagen klassifiziert.



**Abb. 6: Ames-Test mit Bakterienstamm TA100: Zahl von Vertiefungen mit Rückmutanten bei verschiedenen Konzentrationen der Proben (A) „Ozonung 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix und (B) „Sandfilter 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix**

Einzelwerte und Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).  $n = 3$  Replikate pro Anreicherungsfaktor,  $n = 21$  Replikate für Negativ- (0) und  $n = 18$  Replikate für Positivkontrollen (4-NQO = 4-Nitroquinolin-N-Oxid). Grün: Basislinie (MW der Negativkontrolle + SD), Rot: Effektlinie (2x Basislinie).  $\star$ : signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (Basislinie in Grün) (ANOVA mit Dunnett's-Test).

Tab. 7 fasst in einer Übersicht zusammen in welchen Reinigungsstufen bei 20facher Anreicherung Mutagenität auftrat. Tab. 21 bis Tab. 24 im Anhang 3 geben einen Überblick über die Ergebnisse des Ames-Tests mit allen vier Varianten.

**Tab. 7: Übersicht des Auftretens von Mutagenität bei den verschiedenen Reinigungsstufen nach 20facher Anreicherung im Ames-Test.**

Die Ergebnisse der beiden Bakterienstämme TA 98 und TA 100 sind sowohl mit und ohne S9-Mix zusammengefasst und in folgenden Kategorien dargestellt: keine Mutagenität, mögliche Mutagenität und Mutagenität. OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

Probenahmedatum	OZ	SF	FB	WB	GAK2	GAK3
02.-03.02.2015	keine Mutagenität	mögliche Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität
09.-10.03.2015	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität
14.-15.04.2015	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität	keine Mutagenität

**Vergleich mit früheren Studien:** Auf der ARA Lausanne konnten in nativen Abwasserproben der verschiedenen Reinigungsstufen keine mutagenen Effekte mit dem Ames-Test nachgewiesen werden [15]. Auf der ARA Basel wurde mit dem Ames-Test in aufkonzentrierten Abwasserproben nach der Ozonung vereinzelt eine erhöhte mutagene Wirkung gemessen [50]. Dies trat bei 2 von 12 Proben mit ozoniertem Abwasser auf. Nach Ozonung + Wirbelbett waren die Effekte jeweils nicht mehr messbar. Bei Untersuchungen im Rahmen des VSA-Projektes zur Entwicklung eines Ozontestverfahrens [51] trat vor allem bei problematischen ARA mit einem hohen Anteil an Abwasser aus Industrie und Deponien in aufkonzentrierten Proben eine hohe Mutagenität im Ames-Test auf. Diese war um ein Vielfaches höher als die in dieser Studie gemessene Mutagenität.



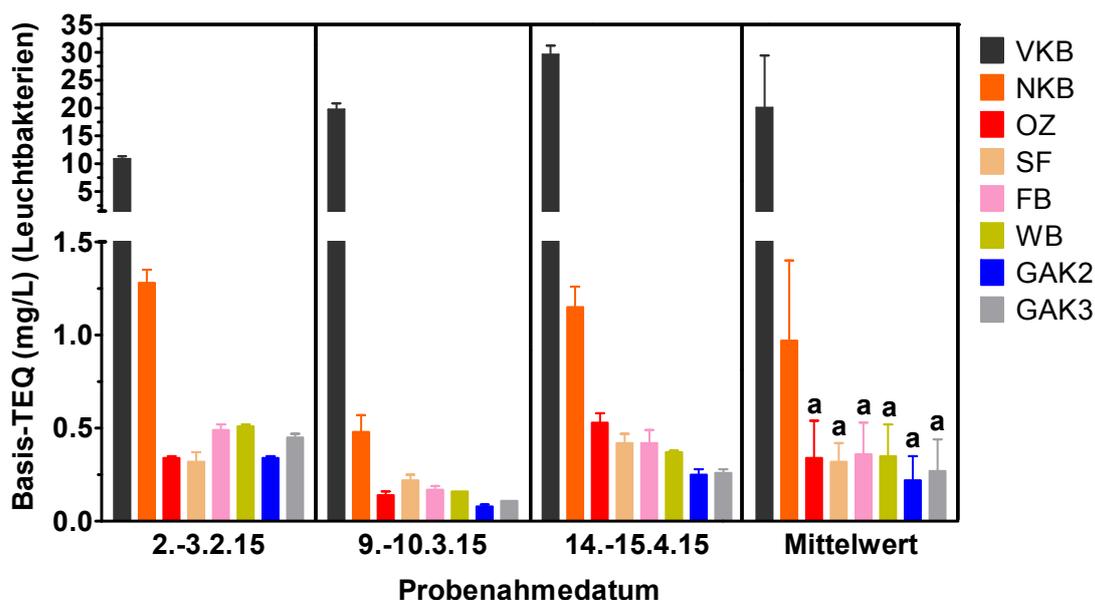
### 3.1.3 Leuchtbakterientest

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den Leuchtbakterientest sind in Tab. 8 aufgelistet.

**Tab. 8: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den Leuchtbakterientest.**

Wirkmechanismus	Test	Probenaufbereitung	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze (3.3 x Nachweisgrenze)
Nicht-spezifische Toxizität	Leucht-bakterientest	mit Anreicherung (25-167fach)	0.03 - 0.22 mg/L Basis-TEQ	0.11 - 0.73 mg/L Basis-TEQ
		ohne Anreicherung	5.6 mg/L Basis-TEQ	18 mg/L Basis-TEQ

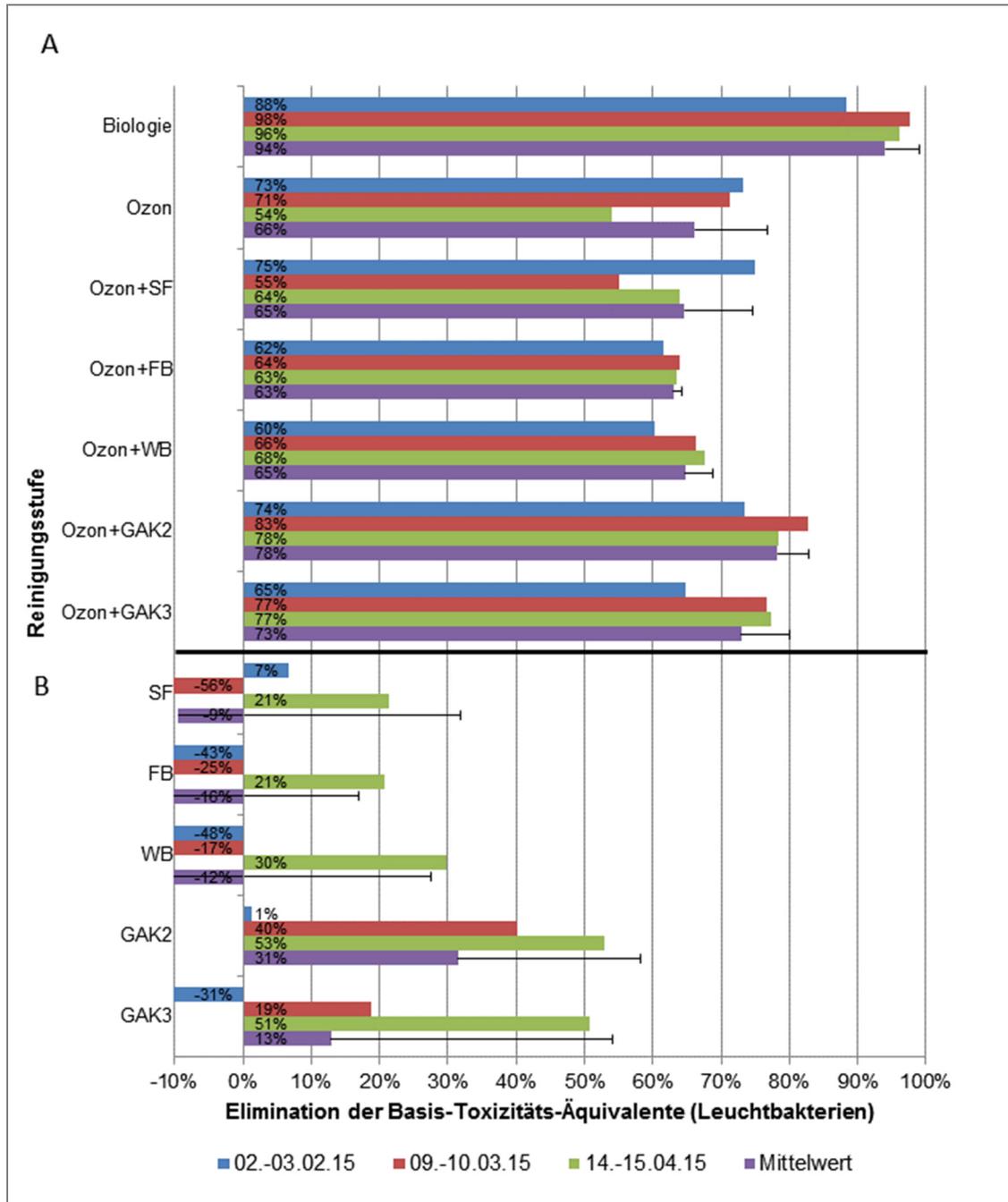
Die Proben aus dem Vorklärbecken bewirkten im Leuchtbakterientest im Mittel eine Toxizität von  $20 \pm 9.4$  mg Basis-TEQ/L (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Durch die Nachklärung wurde die nicht spezifische Bakterientoxizität deutlich verringert, um  $94 \pm 5\%$  auf  $1 \pm 0.4$  mg Basis-TEQ/L. Die verbleibende Toxizität wurde durch die Ozonung um weitere  $66 \pm 11\%$  auf  $0.3 \pm 0.24$  mg Basis-TEQ/L reduziert. Abb. 7 zeigt die Basis-TEQ-Konzentrationen für die einzelnen Messkampagnen und im Mittel. Über alle 3 Messkampagnen gemittelt gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Ozonung und den verschiedenen Nachbehandlungen. In den Proben nach Sandfilter, Festbett und Wirbelbett variierte die nicht-spezifische Toxizität zwischen den 3 Messkampagnen stark.



**Abb. 7: Leuchtbakterientest: Hemmung der Biolumineszenz (in mg Basis-Toxizitäts-Äquivalenten (mg Basis-TEQ/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen.**

Werte der einzelnen Messkampagnen (Mittelwerte der 3 technischen Replikate  $\pm$  Standardabweichung) und Mittelwert über alle 3 Messkampagnen ( $\pm$  Standardabweichung). Da der Fokus im Projekt auf den Nachbehandlungen lag, wurden diese jeweils zur Ozonung verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Proben an). VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

Abb. 8 gibt einen Überblick über die Elimination der Leuchtbakterientoxizität über die verschiedenen Reinigungsstufen. Weitere Details zu den Ergebnissen finden sich in Tab. 25 im Anhang 3.



**Abb. 8: Leuchtbakterientest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf allgemein toxische Stoffe (Basis-Toxizitäts-Äquivalente, Basis-TEQ).**

Werte der einzelnen Messkampagnen und Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung über 3 Messkampagnen. Eliminationseffizienz (%) =  $(1 - (\text{TEQ nach Reinigungsstufe} / \text{TEQ vor Reinigungsstufe})) \cdot 100$ . SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierten Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



**Vergleich mit früheren Studien:** Auf der ARA Wüeri in Regensdorf (Schweiz) wurden im Zulauf  $5.9 \pm 2.8$  mg Basis-TEQ/L gemessen, im Ablauf betragen die Werte noch  $0.3 \pm 0.3$  mg Basis-TEQ/L [36]. Im Ablauf einer australischen Kläranlage wurden 2.3 mg Basis-TEQ/L gemessen [52]. Auf der ARA Lausanne konnten toxische Effekte mit dem Leuchtbakterientest nur nach der biologischen Reinigungsstufe nachgewiesen werden. Hier wurde nach OZ, SF, OZ + SF und OZ + Pulveraktivkohle keine nicht-spezifische Toxizität mehr nachgewiesen [15].

### 3.1.4 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Photosystem II-hemmende Wirkung im kombinierten Algentest sind in Tab. 9 aufgelistet.

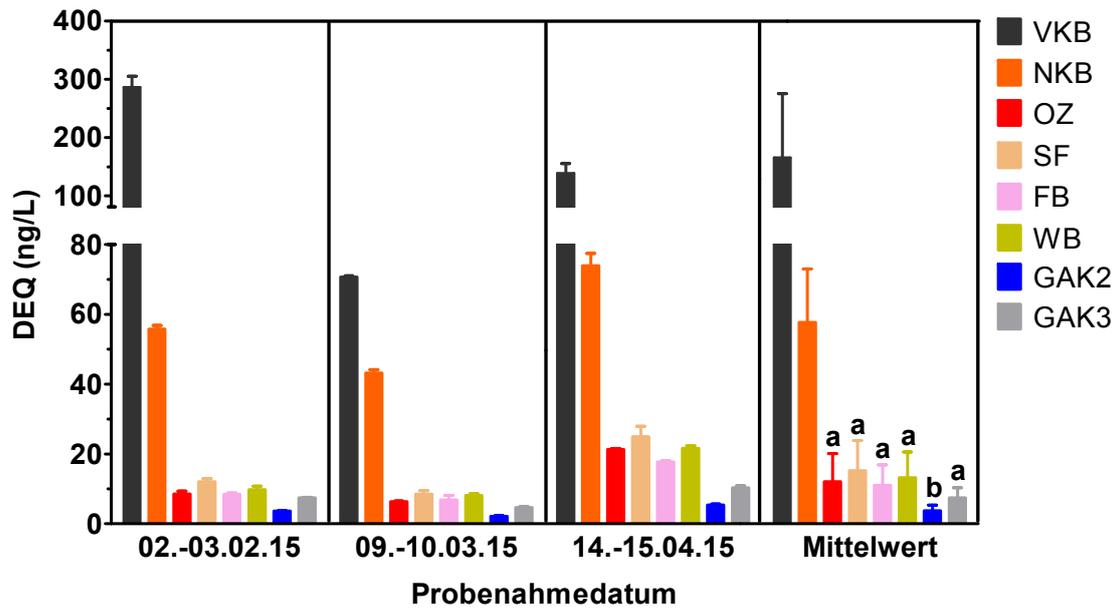
**Tab. 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Photosystem II-Hemmung im kombinierten Algentest.**

Wirkmechanismus	Test	Probenaufbereitung	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze (3.3 x Nachweisgrenze)
PS II-Inhibition	Kombinierter Algentest	mit Anreicherung (100-200fach)	1.5 - 2 ng/L DEQ/L	5 - 7 ng/L DEQ
		ohne Anreicherung	192 ng/L DEQ	650 ng/L DEQ

**Photosystem II-hemmende Wirkung:** Im ARA-Zulauf (VKB) wurde eine Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ) von  $165 \pm 110$  ng/L (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) gemessen. Nach der biologischen Reinigung (NKB) waren noch  $58 \pm 15$  ng DEQ/L vorhanden und somit  $55 \pm 22\%$  der Photosystem II-hemmenden Wirkung entfernt. Durch Ozonung wurde die nach der biologischen Reinigung verbleibende Photosystem II-hemmende Wirkung um weitere  $80 \pm 8\%$  auf  $12 \pm 8$  ng DEQ/L reduziert.

Nur eine Nachbehandlungsmethode bewirkte eine weitere Verringerung der Toxizität. GAK2 (unbeladen / neu) reduzierte diese signifikant um weitere  $66 \pm 8\%$  (auf  $3.7 \pm 1.7$  ng DEQ/L). Allerdings war die Hemmung der Photosynthese in dieser Behandlung sehr gering (5%-13%), daher ist eine Quantifizierung der DEQ-Werte mit hoher Unsicherheit behaftet, da sie auf stark extrapolierten Werten beruht. GAK3 (beladen) bewirkte ebenfalls eine weitere, statistisch jedoch nicht signifikante, Verringerung der DEQ-Werte. Sandfilter, Festbett und Wirbelbett zeigten keine Wirkung.

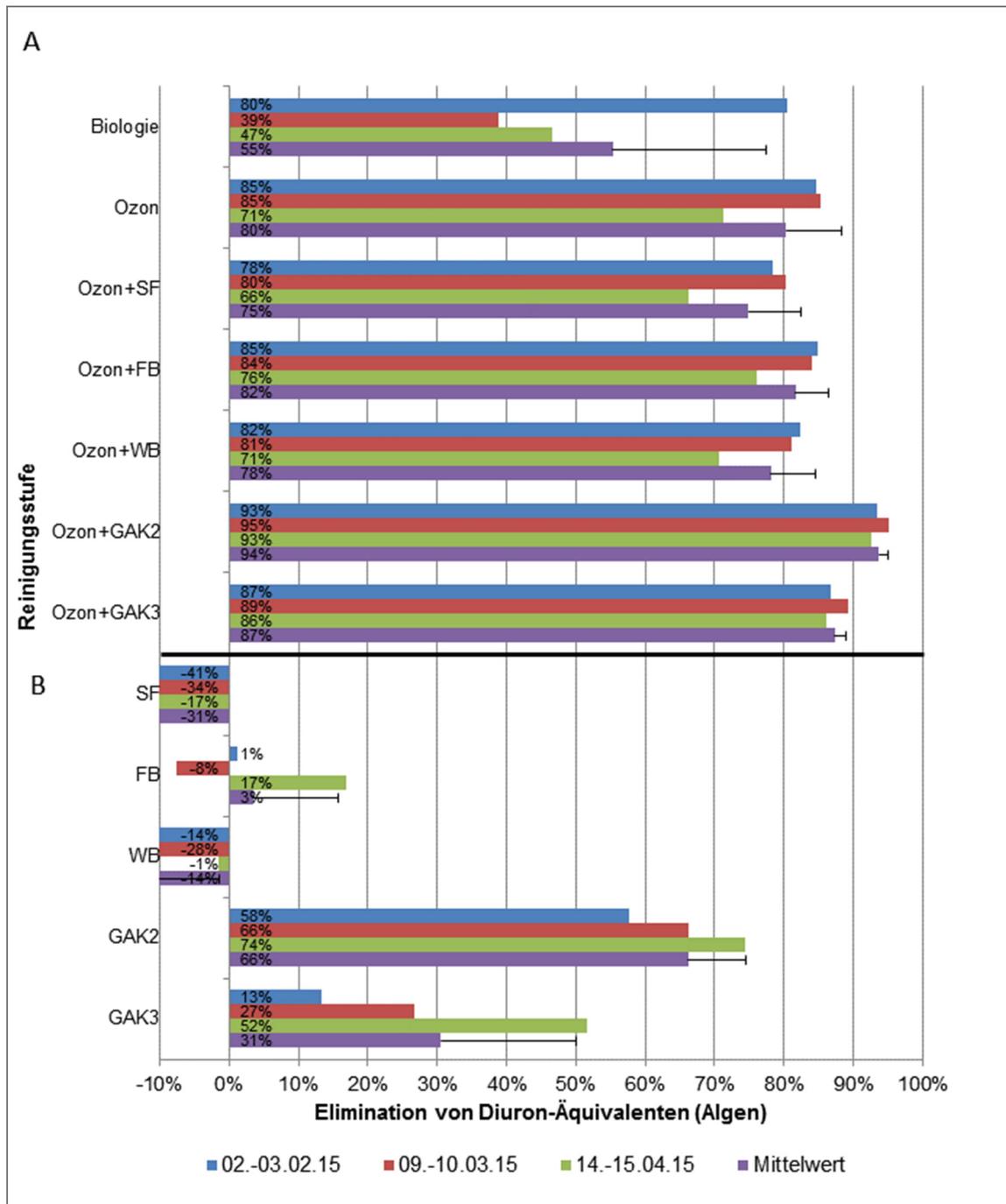
Abb. 9 zeigt die DEQ-Konzentrationen für die einzelnen Messkampagnen und im Mittel.



**Abb. 9: Kombierter Algentest: Photosystem II-hemmende Wirkung (in ng Diuron-Äquivalenten (DEQ)/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen.**

Werte der einzelnen Messkampagnen (Mittelwerte der 3 technischen Replikate  $\pm$  Standardabweichung) und Mittelwert über alle 3 Messkampagnen ( $\pm$  Standardabweichung). Da der Fokus im Projekt auf den Nachbehandlungen lag, wurden diese jeweils zur Ozonung verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Proben an). VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

Abb. 10 gibt einen Überblick über die Elimination von Photosystem II-hemmenden Stoffen durch die verschiedenen Reinigungsstufen. Details zu den Ergebnissen der Photosystem II-Hemmung im kombinierten Algentest gibt Tab. 26 im Anhang 3.



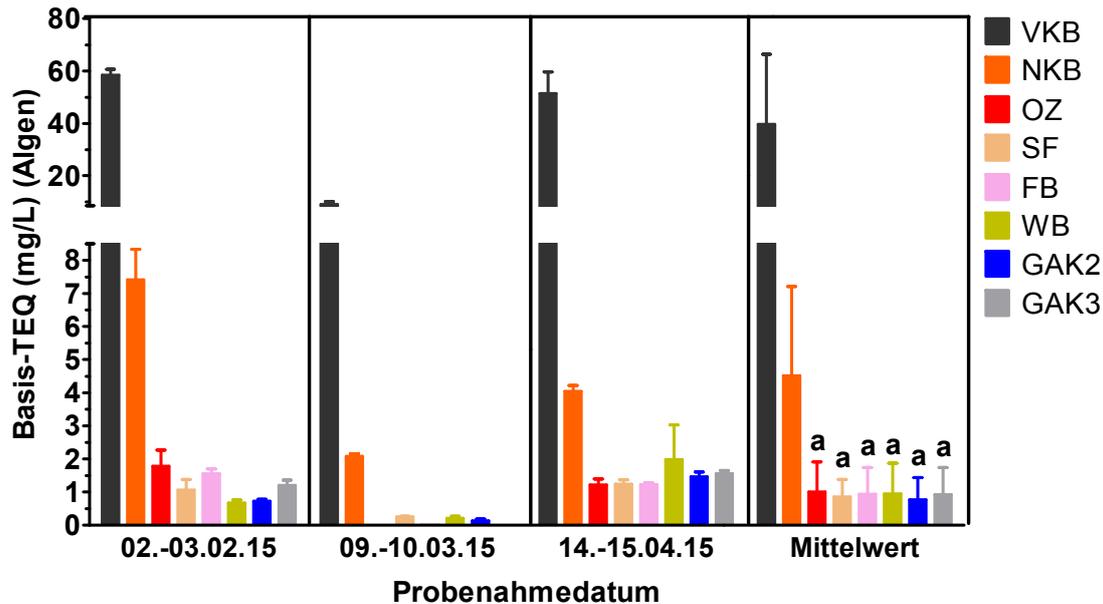
**Abb. 10: Kombierter Algentest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf photosynthesehemmende Stoffe (Diuron-Äquivalente, DEQ).**

Werte der einzelnen Messkampagnen und Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung über 3 Messkampagnen. Eliminationseffizienz (%) =  $(1 - (\text{DEQ nach Reinigungsstufe} / \text{DEQ vor Reinigungsstufe})) \cdot 100$ . VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



Die Gesamtelimination in der ARA lag für alle vier Nachbehandlungen zwischen 89 und 97%, wobei hier die Nachbehandlung mit GAK2 am besten abschnitt (97%).

**Wachstumshemmung:** Das Wachstum der Algen war im Abwasser aus dem ARA-Zulauf stark gehemmt mit einer mittleren Basis-TEQ von  $40 \pm 27$  mg/L. Durch die biologische Reinigung wurde diese Hemmung bereits deutlich reduziert, um  $85 \pm 8\%$  auf  $4.5 \pm 2.7$  mg Basis-TEQ/L. Die Ozonung verringerte die verbleibende Basistoxizität um weitere  $73 \pm 4\%$  (auf  $1.0 \pm 0.9$  mg Basis-TEQ/L) (siehe Abb. 11). Vor allem in der zweiten Messkampagne variierte die Hemmung des Wachstums in den einzelnen Replikaten der erweiterten Reinigungsstufen stark. Daher konnten hier Basis-TEQ-Werte nicht zuverlässig quantifiziert werden.



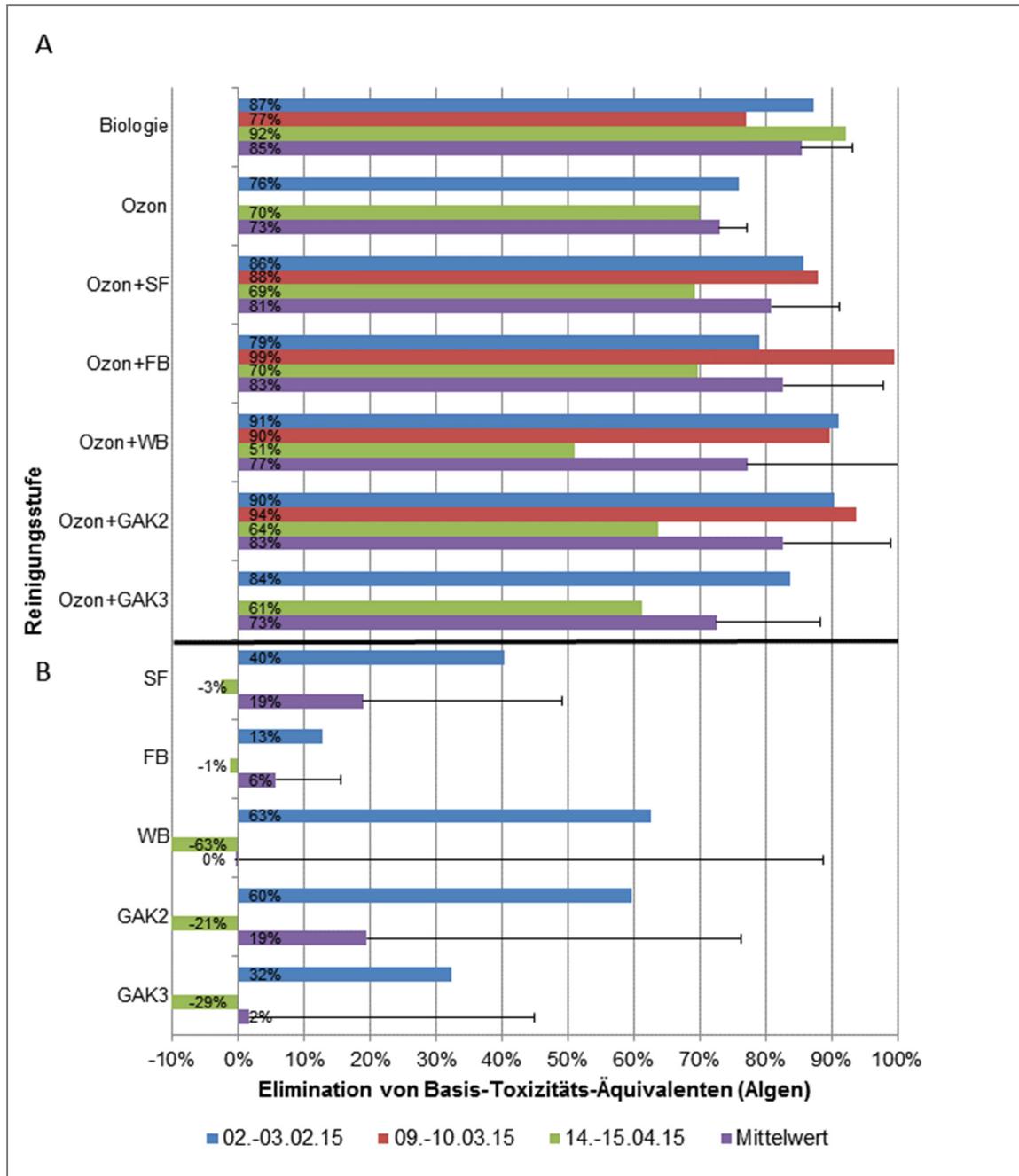
**Abb. 11: Kombiniertes Algentest: Wachstumshemmung (in mg Basis-Toxizitäts-Äquivalenten (Basis-TEQ)/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen.**

Werte der einzelnen Messkampagnen (Mittelwerte der 3 technischen Replikate  $\pm$  Standardabweichung) und Mittelwert über alle 3 Messkampagnen ( $\pm$  Standardabweichung). Da der Fokus im Projekt auf den Nachbehandlungen lag, wurden diese jeweils zur Ozonung verglichen (ANOVA mit Dunnett's-Test, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Proben an). VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK. Wenn in der Graphik kein Balken eingezeichnet ist, lag der Messwert unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Zwischen den Nachbehandlungen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Extrapolierte Basis-TEQ-Werte der Nachbehandlung lagen zwischen  $<LOD$  und  $2.0$  mg/L.



Abb. 12 gibt einen Überblick über die Elimination von wachstumshemmenden Stoffen über die verschiedenen Reinigungsstufen. Details zu den Ergebnissen finden sich in Tab. 27 im Anhang 3.



**Abb. 12: Kombierter Algentest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf wachstumshemmende Stoffe (Basis-Toxizitäts-Äquivalente, Basis-TEQ).**

Werte der einzelnen Messkampagnen und Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung über alle 3 Messkampagnen. Eliminationseffizienz (%) =  $(1 - (\text{Basis-TEQ nach Reinigungsstufe} / \text{Basis-TEQ vor Reinigungsstufe})) \cdot 100$ . In der Messkampagne vom 9.-10.3.15 konnte im Abwasser nach Ozonung kein Basis-TEQ-Wert ermittelt werden, ebenso wie bei Ozon + GAK3, daher ist bei dieser Messkampagne für die betroffenen Reinigungsstufen keine Eliminationseffizienz angegeben. VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



Die Gesamtelimination der algenwachstumshemmenden Stoffe in der ARA lag im Mittel zwischen 97 und 98% und damit etwas höher als für Photosystem II-hemmende Stoffe. Insgesamt gab es keine Unterschiede bei der Gesamtelimination zwischen verschiedenen Nachbehandlungen. Weitere Details zu den Ergebnissen des kombinierten Algentests finden sich in Tab. 26 und Tab. 27 im Anhang 3.

#### **Vergleich mit früheren Studien:**

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Effekte im kombinierten Algentest durch die Ozonung signifikant verringert werden können. Bei Abwässern bei denen die O<sub>3</sub>- bzw. OH-Radikal-Exposition vom Normbereich abwich, konnte eine verringerte Elimination dieser Stoffgruppe gemessen werden [51].

*PS II-Hemmung:* Insgesamt sind die Resultate gut vergleichbar mit Ergebnissen aus früheren Studien: Auch auf den ARA Regensdorf und Lausanne konnte die Ozonung in biologisch gereinigtem Abwasser zusätzlich 79 bzw. 82% der Photosystem II-hemmenden Stoffe entfernen. Die mittlere Gesamtelimination auf der ARA Lausanne lag mit 88% (Biologie + Ozonung) [13, 15] in einem ähnlichen Bereich wie auf der ARA Neugut (OZ: 91%, OZ+SF: 89%, OZ+FB: 91%, OZ+WB: 90%, OZ+GAK2: 97%, OZ+GAK3: 94%).

Im Zulauf der ARA Basel wurde im Mittel ein DEQ von  $164 \pm 29$  ng/L gemessen, nach der biologischen Reinigung waren noch  $61 \pm 18$  ng DEQ/L vorhanden und somit  $61 \pm 18\%$  der Photosystem II-hemmenden Stoffe entfernt [53]. Durch Pulveraktivkohlebehandlung wurde die verbleibende PS II-hemmende Wirkung um weitere  $85 \pm 5\%$  reduziert auf  $8.7 \pm 1.5$  ng DEQ/L wodurch eine Gesamtelimination über alle Reinigungsstufen von 95% erreicht wurde. Die Ozonung verringerte die nach der biologischen Reinigung verbleibende PS II-hemmende Wirkung um weitere  $77 \pm 6\%$  auf  $13 \pm 0.8$  ngDEQ/L. Im Wirbelbett lag die Elimination zwischen -33% (d.h. einer Zunahme der Konzentration) und +45% (d.h. einer Abnahme der Konzentration). Im Mittel nahm die PS II-hemmende Wirkung leicht ab auf  $11 \pm 5.7$  ng DEQ/L. Die Gesamtelimination in der ARA Basel betrug 93%.

Auch im Rahmen der Studie zur Entwicklung eines Ozontestverfahrens [51] reduzierte Ozonung in Kombination mit Biodegradation die PS II-Hemmung in allen untersuchten Abwässern signifikant im Mittel um 88%.

*Wachstumshemmung:* In Bezug auf wachstumshemmende Stoffe variierte die zusätzliche Elimination in der Ozonung in Lausanne zwischen 67 und 95%. Somit wurden im Mittel insgesamt 95% (Biologie + Ozonung) entfernt [13, 15].

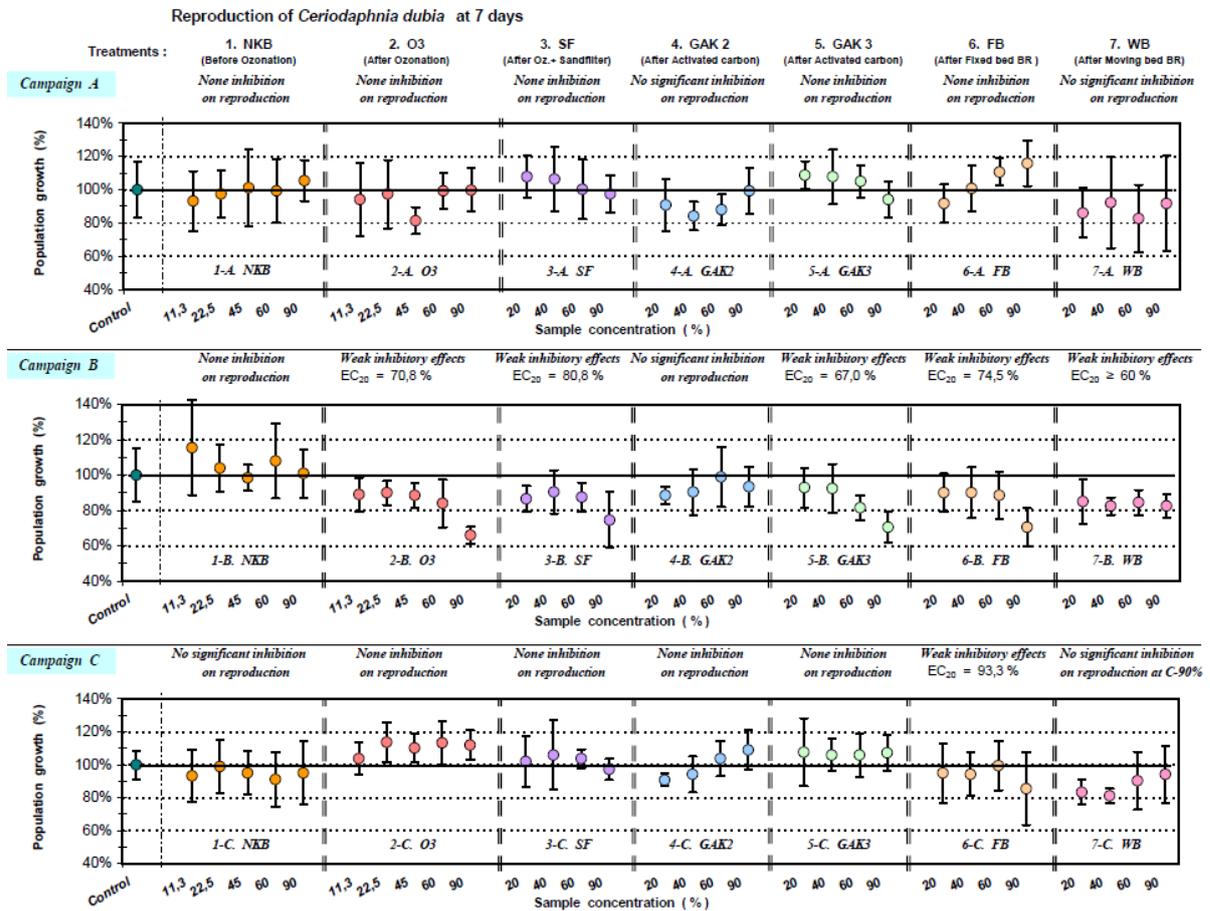
Das *Wachstum der Algen* war im Abwasser des Basler ARA-Zulaufs stark gehemmt mit einer mittleren Basis-TEQ von  $17 \pm 11$  mg/L. Durch die biologische Reinigung wurde diese Hemmung um  $73 \pm 18\%$  auf  $3.3 \pm 0.99$  mg Basis-TEQ/L reduziert. Durch die Behandlung mit Pulveraktivkohle wurde die verbleibende Basistoxizität um weitere 81% verringert (auf  $0.68 \pm 0.50$  mg Basis-TEQ/L) und so eine Gesamtelimination in der ARA um 96% erreicht. Die Ozonung konnte die nach der biologischen Reinigung noch vorhandene Basistoxizität um weitere 86% verringern auf im Mittel  $0.44 \pm 0.17$  mg Basis-TEQ/L. Im Wirbelbett wurde die verbleibende Resttoxizität kaum weiter verringert ( $0.42 \pm 0.22$  mg/Basis-TEQ/L), je nach Messkampagne lag die Elimination bei -63% (d.h. einer Erhöhung der Konzentration) bis +58% (d.h. einer Verringerung der Konzentration). Die Gesamtelimination in der ARA betrug 97%.

In den untersuchten Abwässern aus der Studie zum Ozontestverfahren [51] wurde die Wachstumshemmung durch die Ozonung um 75-100 % (Mittel: 86%) verringert.



### 3.1.5 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen

Die untersuchten Abwässer wirkten sich nicht negativ auf das Überleben der adulten Wasserflöhe aus. Jedoch war in der zweiten Messkampagne die Fortpflanzungsfähigkeit (Anzahl der Nachkommen) der Wasserflöhe nach mehreren Reinigungsstufen leicht beeinträchtigt (Abb. 13).



**Abb. 13: Fortpflanzungstest mit *Ceriodaphnia dubia*: Populationswachstum nach 7 Tagen Exposition gegenüber Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen (dargestellt in % relativ zur Kontrolle).**

Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 12 Replikate à 1 Wasserfloh pro Testansatz. Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, O<sub>3</sub>: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, FB: Festbett, WB: Wirbelbett.

Unter Berücksichtigung einer bis zu 20%igen Variabilität in der Fortpflanzung der Kontrollen (Sergio Santiago, persönliche Mitteilung), wurde ein zusätzliches *cut-off*-Kriterium bei 80% Fortpflanzungshemmung festgelegt. Dadurch lag nur in der zweiten Messkampagne im Abwasser nach Ozonung, Sandfilter, Festbett und GAK3 die Fortpflanzung in der Probe mit dem höchsten Abwasseranteil (90%) unterhalb dieses *cut-off*-Kriteriums (Tab. 10). Das entspricht einem schwachen reproduktionstoxischen Effekt.



**Tab. 10: Fortpflanzungstest mit *Ceriodaphnia dubia*: Reproduktionshemmende Effekte der verschiedenen Abwässer relativ zur Kontrolle.**

grün kein Effekt, orange schwacher reproduktionshemmender Effekt, Kontrolle = künstlich zusammengesetztes Referenzmedium. NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

	Probenahmedatum	Kontrolle	NKB	OZ	SF	FB	WB	GAK2	GAK3
Replikate (n)		24	12	12	12	12	12	12	12
Toxizität	02.-03.02.15	-							
	09.-10.03.15	-							
	14.-15.04.15	-							

Alle weiteren Abwasserproben zeigten keine Fortpflanzungshemmung. Tab. 28 im Anhang 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des Fortpflanzungstests mit *C. dubia*.

**Vergleich mit früheren Studien:** In früheren Studien wurden keine einheitlichen Effekte von ozonierten Abwasserproben auf die Nachkommenzahl bei Wasserflöhen nachgewiesen.

Bei einer ersten Studie auf der ARA Basel konnte in der Behandlung mit Ozon sowie Ozonung in Kombination mit einem Wirbelbett in 1 von 3 Messkampagnen eine Beeinträchtigung der Fortpflanzung der Wasserflöhe nachgewiesen werden [54]. In der ersten Messkampagne bewirkte das Abwasser aus Ozonung und Wirbelbett bei einer Konzentration von 60% eine signifikant verringerte Anzahl an Nachkommen im Vergleich zur Kontrolle, was einer schwachen Toxizität entspricht. In der dritten Messkampagne verursachte das Abwasser aus Ozonung und aus Ozonung und Wirbelbett bereits bei einer Abwasserkonzentration von 23% eine deutlich verringerte Nachkommenzahl.

Im Folgeprojekt auf der gleichen ARA wurde in 2 von 3 Messkampagnen eine leicht erhöhte Toxizität des Abwassers nach der biologischen Reinigung detektiert sowie in einer Messkampagne im Abwasser nach dem Aktivkohlefilter [53]. Das biologisch gereinigte Abwasser bewirkte bei einem Abwasseranteil von 90% in der ersten und in der zweiten Messkampagne eine 60%- bzw. 80%ige Verringerung der Nachkommenzahl im Vergleich zur Kontrolle. In der ersten Messkampagne zeigte auch das Abwasser aus der Pulveraktivkohlestufe einen leichten reproduktionshemmenden Effekt (80%ige Verringerung der Nachkommenzahl) bei einem Abwasseranteil von 90%.

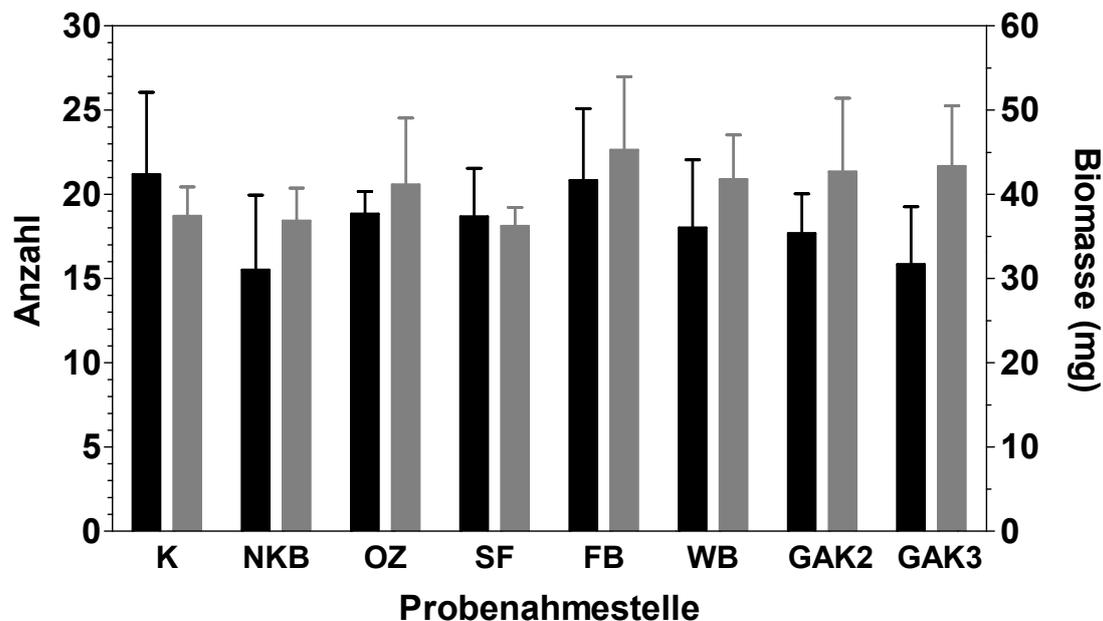
In den Arbeiten zum Ozontestverfahren [51] konnte bei den untersuchten Abwässern im Ablauf der biologischen Reinigung zum Teil eine erhöhte chronische Toxizität auf Wasserflöhe gemessen werden, die durch eine Behandlung mit Ozon + Biodegradation oft verringert wurde. Eine Toxizitätszunahme oder nur leichte Verringerung deuteten hier auf problematische Abwässer mit spezieller Belastung hin (z.B. Effekte durch Schwermetalle).



## 3.2 *In vivo*-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut

### 3.2.1 Glanzwurm-Fortpflanzungstest

Im Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Ozonung und den verschiedenen Nachbehandlungen auf, weder in der Anzahl noch in der Biomasse der Würmer, ebenso keine Unterschiede zur Kontrolle (d.h. einem künstlich aus deionisiertem Wasser hergestellten Kontrollmedium, siehe auch 2.2.1). Abb. 14 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.



**Abb. 14: Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern: Anzahl (in schwarz) und Biomasse (in grau) der Würmer in der Kontrolle und im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $n = 6$  Replikate für die verschiedenen Abwässer  $\times$  10 Würmer pro Testansatz. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben (ANOVA mit Dunnett's-Test). Da der Fokus im Projekt auf den Nachbehandlungen lag, wurden diese jeweils zur Ozonung verglichen. K: Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

**Vergleich mit früheren Studien:** Die Ergebnisse des Glanzwurmtests unterscheiden sich von früheren Studien auf anderen ARAs. In der ARA Lausanne war die Biomasse nach Ozonung und Pulveraktivkohle signifikant verringert [15]. In Lausanne konnte eine Tendenz zur Abnahme der Glanzwurm-Reproduktion nach dem Sandfilter und der Pulveraktivkohlestufe beobachtet werden, aber dies war mit Bonferroni-Holm Anpassung [55] nicht signifikant. In der ARA Regensdorf [13] wurde ein hemmender Effekt der Ozonung festgestellt, der jedoch durch den Sandfilter wieder eliminiert wurde. Die Hemmung nach der Ozonung kann ein Hinweis auf die Bildung labiler Reaktionsprodukte der Ozonung sein und weist auf die Notwendigkeit eines Sandfilters oder einer vergleichbaren Stufe als zusätzliche Barriere zwischen Ozonungsreaktor und ARA-Auslauf hin.



### 3.2.2 Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen

#### Validität des Tests

Die in Tab. 11 angegebenen Validitätskriterien der OECD-Richtlinie 210 (OECD 1992) wurden während der von der OECD empfohlenen Testdauer (bis 64 Tage nach Schlupf) erfüllt.

**Tab. 11: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Validitätskriterien der OECD 210 [24] während 64 Tagen.**

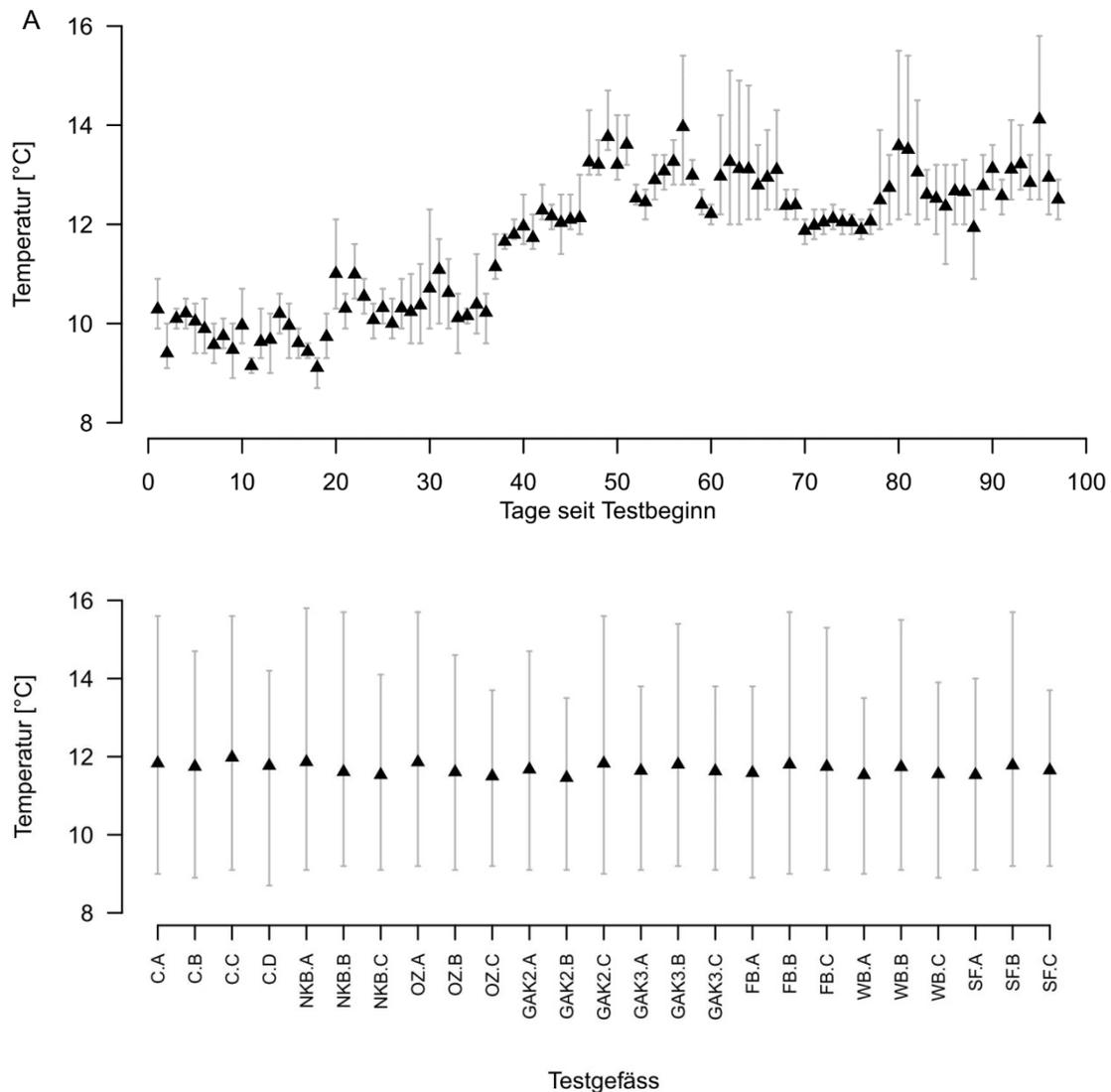
Die während des Tests ermittelten Werte sind in der zweiten Spalte angegeben.

Validitätskriterium	Im Test ermittelt
Schlupf in Kontrollen > 66% befruchtete Eier	100%
Überleben in Kontrollen nach Schlupf > 70% geschlüpfte Fische	95%
Sauerstoffsättigung > 60%	63-98%

Der FELST mit Regenbogenforellen wurde auf der ARA Neugut bis zu 96 Tagen (nach Schlupf) weitergeführt, da für die Biomarker-Untersuchungen (Histopathologie und Genexpression) eine grössere Menge an Biomasse benötigt wurde. In diesem Zeitraum, von Tag 65 bis 96, traten vermehrt Unterschreitungen des Validitätskriteriums Sauerstoffsättigung auf (Abb. 17 und Tab. 12). Deshalb wurde entschieden, alle möglichen Endpunkte wie z.B. Überleben im FELST bereits nach 64 Tagen, also nach Ende der von der OECD empfohlenen Testdauer, zu evaluieren. Bei der verlängerten Expositionsdauer von 96 Tagen ist nicht auszuschliessen, dass die geringeren Sauerstoffkonzentrationen einen Einfluss auf die Überlebensrate der Regenbogenforellen hatten. Zusätzlich können die geringen Sauerstoffkonzentrationen in der verlängerten Testdauer auch die Ergebnisse der Biomarker-Untersuchungen beeinflusst haben. Ein möglicher Einfluss der niedrigen Sauerstoffsättigung wird im Kapitel 3.2.3 diskutiert. Anhang 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der physikalisch-chemischen Parameter.

#### Physikalisch-chemische Parameter während der gesamten Expositionsdauer

Während der Exposition der Fische wurde in den Testgefässen täglich die Temperatur gemessen (siehe Abb. 15A). Die Werte streuten zeitweise stark und waren kurzfristig auch über den Vorgaben der OECD-Richtlinie [24]. In Abb. 15B wird deutlich, dass die mittleren Temperaturen in den unterschiedlichen Testgefässen dennoch sehr ähnlich waren und die Abweichungen in allen Testgefässen auftraten. Dadurch wird die Möglichkeit eines Einflusses der Temperatur auf die biologischen Ergebnisse der Studie als gering eingeschätzt.



**Abb. 15: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Gemessene Temperaturen in den Testgefäßen über die Testdauer dargestellt (A) je Tag und (B) je Testgefäß.**

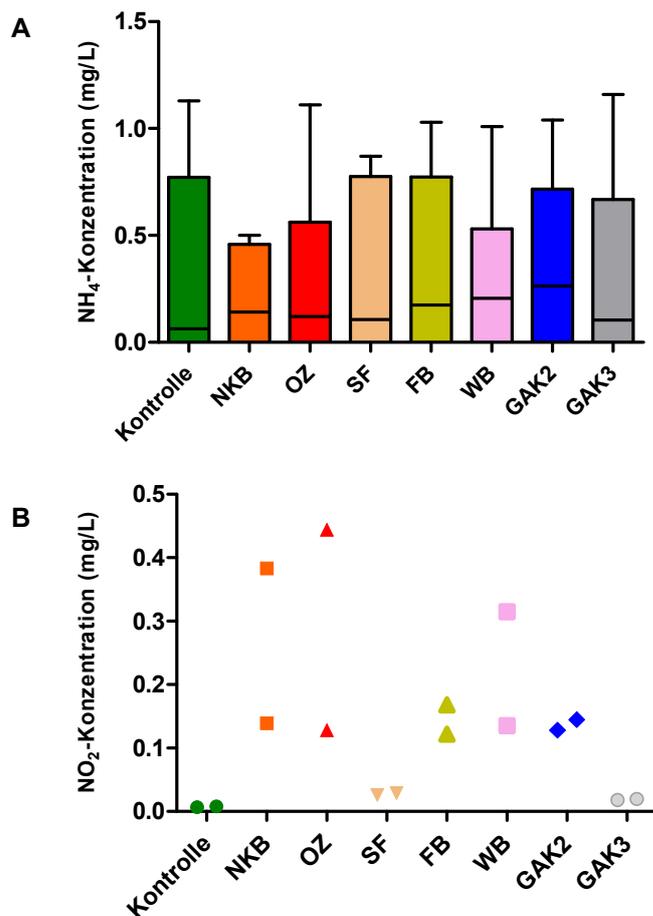
Mittelwerte  $\pm$  Extremwerte. Ab dem 32. Tag nach Beginn der Exposition wurde die Solltemperatur innerhalb von 5 Tagen stufenweise von  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  auf  $12 \pm 2^\circ\text{C}$  erhöht (vgl. Vorgaben der OECD 210, 1992). Kontrolle / C = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, SF: Sandfilter.

Zusätzlich wurden die Parameter pH, Sauerstoff-Konzentration, Leitfähigkeit und Gesamthärte gemessen (Anhang 5). Für das künstlich aus deionisiertem Wasser hergestellte Kontrollmedium unterscheiden sich diese Werte häufig von den in den unterschiedlich behandelten Abwässern gemessenen Werten. Dennoch waren die Parameter in einem Bereich, der für die Testorganismen üblicherweise keine Stressbedingungen darstellt.

Bei der wöchentlichen Messung des in den Test- und Kontrollmedien gelösten Ammoniums ( $\text{NH}_4$ ) (siehe auch Abb. 16) wurden ab Tag 56 gelegentlich, aber ab Tag 84 ständig Werte  $> 0.25 \text{ mg/L}$  gemessen. Es ist ein Effekt des mit Ammonium im chemischen Gleichgewicht stehenden Fischtoxins Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) möglich. Die gemessenen Werte von maximal  $1.16 \text{ mg NH}_4\text{-N}$  (bei  $12^\circ\text{C}$ ) im Test entsprechen etwa  $0.003$  bis  $0.025 \text{ mg NH}_3\text{-N}$  bei pH 7-8. Bei Regenbogenforellen bewirk-

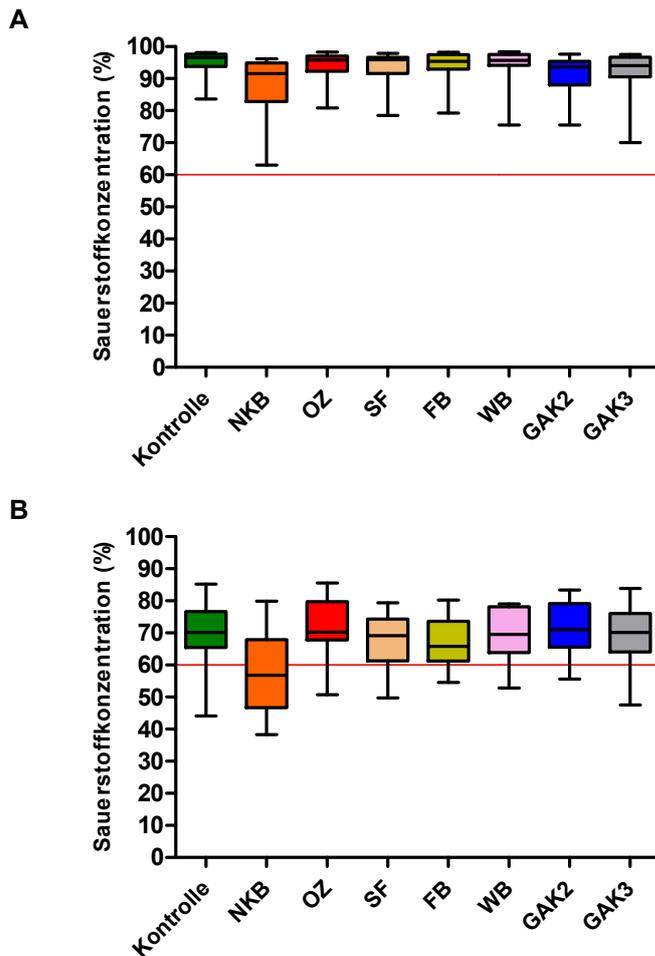


ten Ammoniak-Werte grösser 0.04 mg/L histopathologische Effekte nach einer Langzeitexposition über 5 Jahre [56]. Der  $EC_{20}$  für Auswirkungen auf das Wachstum von frühen Lebensstadien von Regenbogenforellen nach 90 Tagen lag bei 7.72 mg/L  $NH_3-N$  [57]. Basierend auf allen verfügbaren Ökotoxizitätsdaten für Süsswasserorganismen empfiehlt die US EPA für Ammonium ein akutes Qualitätskriterium von 7.6 mg  $NH_4-N/L$  und ein chronisches Qualitätskriterium von 1.3 mg  $NH_4-N/L$  (bei pH 8 und 12°C) [58]. Basierend auf diesen Daten sind direkte Effekte der periodisch erhöhten Ammonium-Konzentrationen auf das Überleben und die Entwicklung der Fische unwahrscheinlich. Als Ursache für die erhöhten Ammonium-Konzentrationen werden der mit der Zeit erhöhte Futterbedarf und die somit grösser werdende Ausscheidungsrate der Fische betrachtet. Die erhöhten Werte traten aber in allen Behandlungen gleichermassen auf. Dadurch wird dieser Faktor bei der vorliegenden Fragestellung, dem Vergleich verschiedener Nachbehandlungen, ausgeglichen.



**Abb. 16: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Während des Tests (Tag 0-96) in den Testgefässen gemessene physikalisch-chemische Parameter (A) Ammoniumkonzentration und (B) Nitritkonzentration.**

A: Box Plot: Der horizontale Strich zeigt den Median an, das Rechteck stellt die Verteilung der mittleren 50% der Daten dar. Die Linie zeichnet die Maximalwerte an. Kontrolle  $n = 20$ , NKB  $n = 21$ , OZ  $n = 18$ , SF  $n = 24$ , FB  $n = 21$ , WB  $n = 18$ , GAK2  $n = 21$ , GAK3  $n = 21$ . B: zeigt die gemessenen Datenpunkte an ( $n = 2$ ). Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



**Abb. 17: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Während des Tests gemessene Sauerstoffsättigung (A) Tag 0 - 64 und (B) Tag 65 - 96.**

Beim Box Plot zeigt der horizontale Strich den Median an, das Rechteck stellt die Verteilung der mittleren 50% der Daten dar. Die Linie im Boxplot zeichnet die Maximalwerte ab. Die rote Linie zeigt das Validitätskriterium für Sauerstoff (60%) an. Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

Die Werte der in den Testgefäßen gemessenen Sauerstoffsättigungen liegen bis zum Tag 64 deutlich über dem Validitätskriterium von 60% (Abb. 17A).

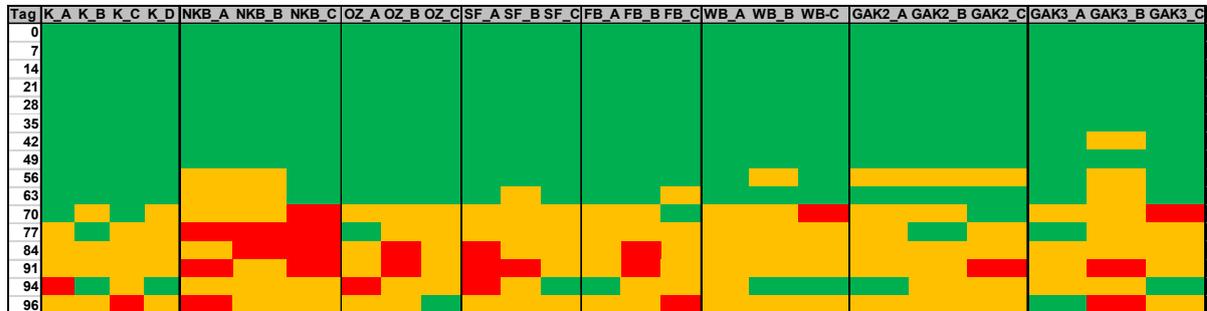
Während der verlängerten Exposition bis zum Tag 96 war der Sauerstoffgehalt allgemein niedriger und lag teilweise auch unter 60% (Abb. 17B). Bei Betrachtung der Messwerte jedes einzelnen Testgefäßes über die Expositionsdauer (Tab. 12) wird deutlich, dass die Sauerstoffsättigung ab dem 63. Tag in allen Testgefäßen abnahm. Als Ursachen werden der erhöhte Futterbedarf, die damit zusammenhängende vermehrte Ausscheidung der Fische sowie die höheren Temperaturen als Faktoren für ein stärkeres mikrobiologisches Wachstum vermutet.

Es kam in 23 Fällen zu Werten < 60%, in 9 Fällen zu Werten < 50% und einmal wurde weniger als 40% Sauerstoffsättigung gemessen (NKB B, Tag 91). Zusätzlich traten an Tag 94 durch einen Ausfall der Belüftung kurzfristig stark verringerte Sauerstoffgehalte auf (bis unter 20%). Nach Behebung des Problems und der anschließender Sauerstoffmessung, stiegen die Sauerstoffwerte rasch wieder an. Vermutlich ist dieser kurze Sauerstoffmangel an Tag 94 die Ursache für die Mortalität, welche an Tag 94 und 95 (3 Fische im NKB Replik A) beobachtet wurde. Ein möglicher Einfluss der niedrigen Sauerstoffsättigung wird im Kapitel 3.2.3 diskutiert.



**Tab. 12: Farbliche Darstellung der gemessenen Sauerstoffsättigung (%) in den Testgefäßen während der Exposition der Fische. Grüne Felder zeigen Werte  $\geq 80\%$ , gelbe Felder  $< 80\%$  und  $\geq 60\%$  und rote Felder  $< 60\%$ .**

Erste Zeile: Behandlungen (K = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK) und Replikate (A, B, C, D), erste Reihe: Versuchsdauer in Tagen.



### Ergebnisse des *Fish Early Life Stage Toxicity*-Tests mit Regenbogenforellen nach 64 Tagen

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus der Exposition der frühen Lebensstadien der Regenbogenforelle gegenüber Abwässern aus verschiedenen Reinigungsstufen dargestellt. Tab. 13 fasst die Ergebnisse für die einzelnen biologischen Endpunkte zusammen. Weitere Details zu der Gesamtüberlebensrate, Überleben der Embryonen, Schlupf, Überleben nach Schlupf, Aufschwimmen sowie Frischgewicht und Länge der Larven sind in Tab. 30 im Anhang 3 und in Anhang 5 aufgeführt.

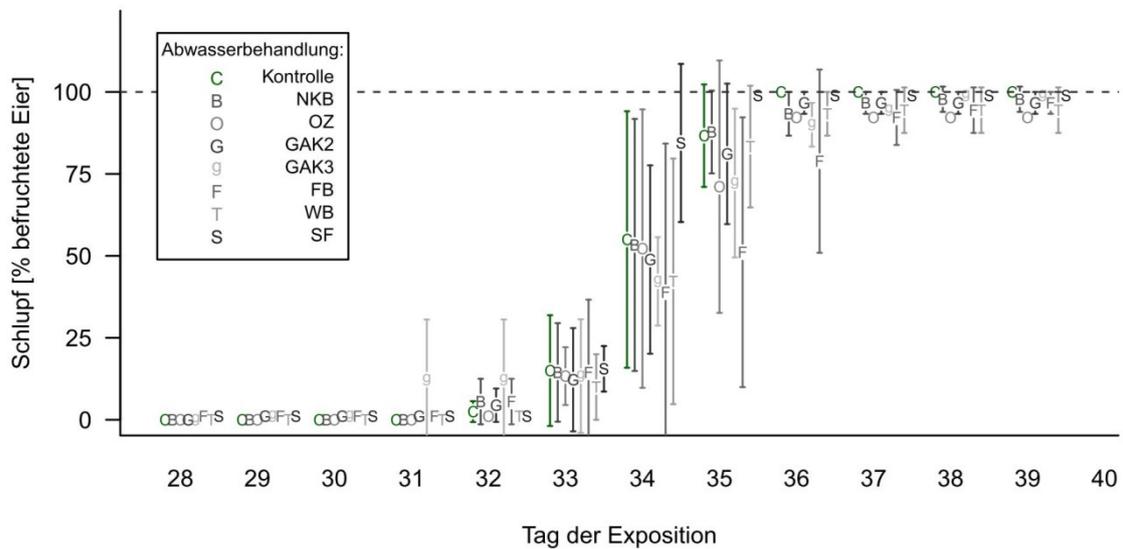
**Tab. 13: *Fish Early Life Stage Toxicity*-Test mit Regenbogenforellen: Zusammenfassung der untersuchten biologischen Endpunkte.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  für die verschiedenen Reinigungsstufen,  $n = 4$  für die Kontrolle (= künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium), NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

	Kontrolle	NKB	OZ	SF	FB	WB	GAK2	GAK3
Replikate (n)	4	3	3	3	3	3	3	3
Eier je Replikat bei Testbeginn (n)	60	60	60	60	60	60	60	60
Eier je Replikat nach Reduzierung (n)	30	30	30	30	30	30	30	30
Schlupf (% befruchtete Eier)	100.0 $\pm$ 0.0	97.8 $\pm$ 3.8	91.1 $\pm$ 1.6	98.9 $\pm$ 1.6	94.6 $\pm$ 5.7	94.4 $\pm$ 5.7	96.7 $\pm$ 3.3	96.7 $\pm$ 2.7
Überleben nach Schlupf (64 Tage) (% geschlüpfte Fische)	97.5 $\pm$ 1.7	95.5 $\pm$ 1.9	92.6 $\pm$ 9.8	97.8 $\pm$ 1.9	92.8 $\pm$ 6.3	90.8 $\pm$ 2.2	96.6 $\pm$ 3.4	92.1 $\pm$ 7.0
Überleben nach Schlupf (96 Tage) (% geschlüpfte Fische)	95.0 $\pm$ 3.3	82.6 $\pm$ 5.1	92.6 $\pm$ 9.8	97.8 $\pm$ 1.9	89.6 $\pm$ 3.6	87.2 $\pm$ 1.1	95.4 $\pm$ 5.3	91.1 $\pm$ 7.1

#### Schlupf

Der Schlupf der Fische begann 28 Tage nach Beginn der Exposition und war innerhalb von 11 Tagen abgeschlossen (Abb. 18). In der Kontrolle war der Schlupferfolg mit  $100 \pm 0\%$  am höchsten (vgl. Tab. 13) und in der Ozonung mit  $92 \pm 2\%$  am niedrigsten. **Allerdings liegen weder zwischen den untersuchten Abwasserbehandlungen noch im Vergleich mit der Kontrolle statistisch signifikante Unterschiede vor.**

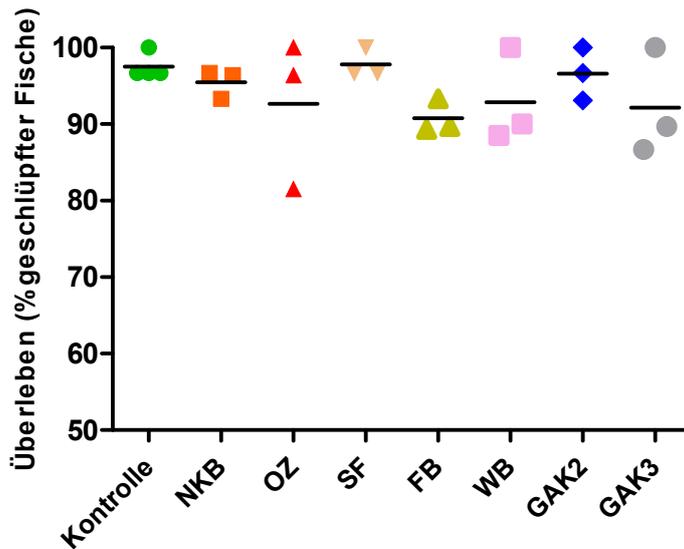


**Abb. 18: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Schlupf der Fische über den relevanten Zeitraum (28-40 Tage) nach Expositionsbeginn.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  für die verschiedenen Reinigungsstufen,  $n = 4$  für die Kontrolle. Über den Zeitraum des Schlupfs wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Abwässern festgestellt (ANOVA, Tukey-Test, beidseitig,  $p = 0.05$ ). Kontrolle / C = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, SF: Sandfilter.

### Überleben

Nach 64 Tagen, am Ende der von der OECD vorgeschlagenen Testdauer, war die Überlebensrate in der Kontrolle und dem Sandfilter am höchsten (Abb. 19). Im Abwasser des Nachklärbeckens, der Ozonung, dem Wirbelbett und dem Festbett war die Überlebensrate im Mittel etwas niedriger. **Am Tag 64 traten weder zwischen den untersuchten Abwasserbehandlungen noch im Vergleich mit der Kontrolle statistisch signifikante Unterschiede bei den Endpunkten „gesamte Überlebensrate“, „Überlebensrate vor Schlupf“ und „Überlebensrate nach Schlupf“ auf.**



**Abb. 19: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Überleben der Fische nach Schlupf am Tag 64.**

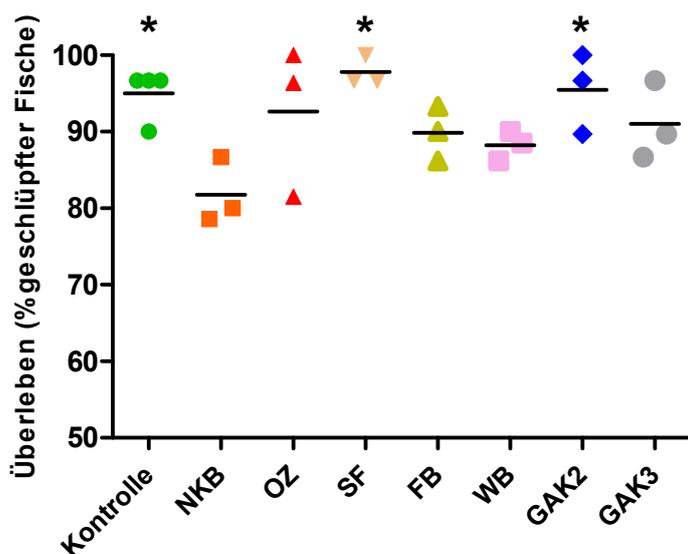
Farbige Punkte stellen die einzelnen Replikate dar ( $n = 3$  für die verschiedenen Reinigungsstufen,  $n = 4$  für die Kontrolle), der schwarze Strich zeigt den Mittelwert. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen (ANOVA, Dunnett's-Test, einseitig grösser,  $p = 0.05$ ). Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, WB: Wirbelbett, FB: Festbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

### Ergebnisse des Fish Early Life Stage Toxicity-Tests mit Regenbogenforellen im verlängerten Expositionszeitraum von 96 Tagen

Nach 96 Tagen führte das Abwasser aus der biologischen Reinigung (NKB) im Mittel zu der niedrigsten Anzahl überlebender Fische (Abb. 20, Tab. 13). Im Vergleich zum NKB war das Überleben der Fische nach Schlupf in der Kontrolle, im Sandfilter und im GAK2 mit neuer Aktivkohle signifikant erhöht. Beim Vergleich der Nachbehandlungen mit der Ozonung konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate nach Schlupf nachgewiesen werden.

Beim Replikat A des GAK3 wurde am Tag 79 ein einzelner Fisch beim Putzen der Becken verletzt und verstarb. Durch einen einmaligen Ausfall der Belüftung im Replikat C des Wirbelbettes am Tag 82 starben auf einmal 7 Fische. Diese Vorfälle werden als nicht natürliche Todesursache angesehen. Deshalb werden diese unnatürlichen Todesfälle nicht in Abb. 20 angezeigt und auch nicht bei der statistischen Auswertung integriert.

Nach dem Belüftungsausfall an Tag 94 verstarben im Replikat A des Nachklärbeckens am Tag 94 und 95 insgesamt 3 Fische. Da durch den Stromausfall alle Behandlungen betroffen waren, wurden diese Mortalitäten in der Graphik und Statistik belassen.



**Abb. 20: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Überleben der Fische nach Schlupf am Tag 96.**

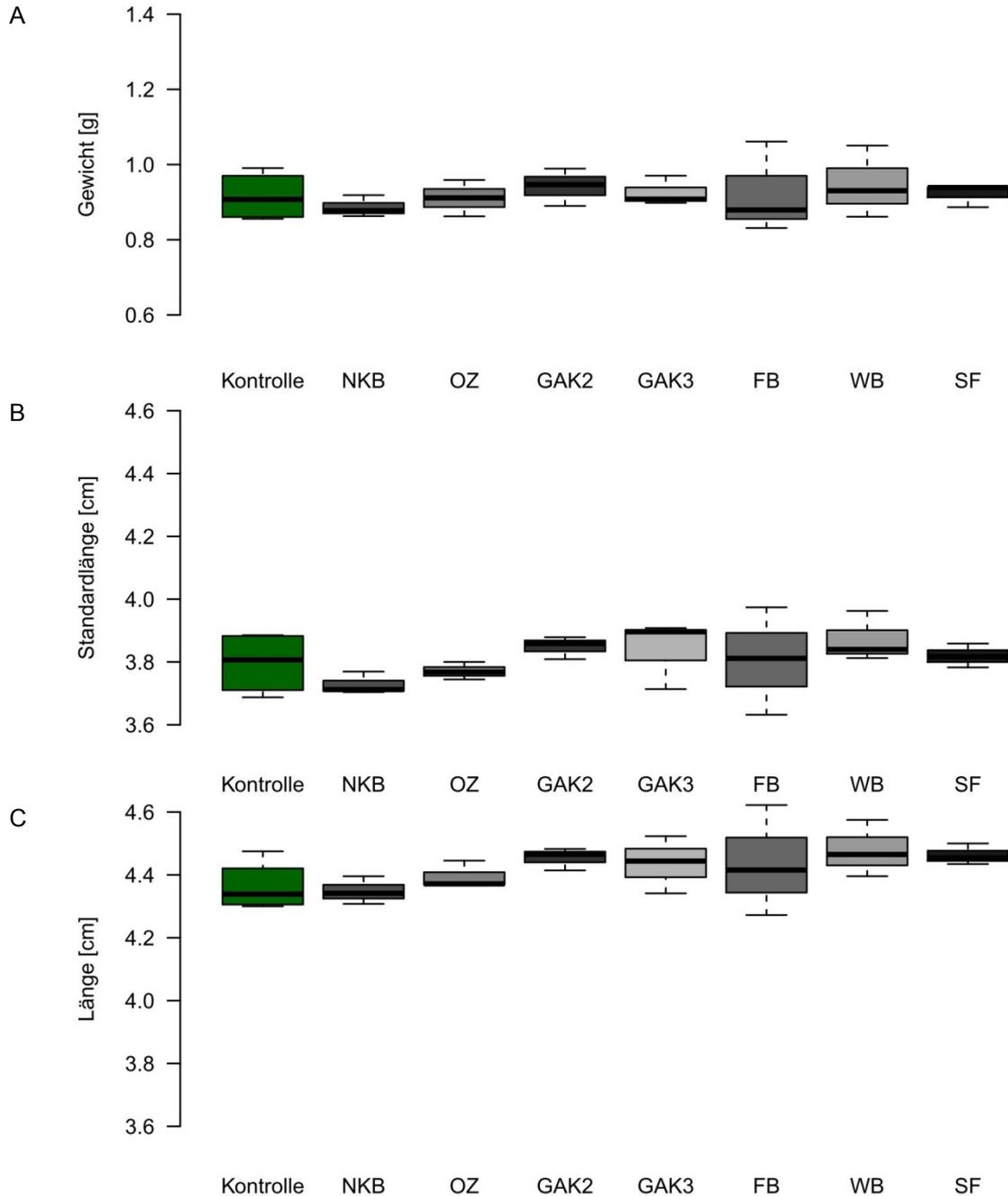
Farbige Punkte stellen die einzelnen Replikate dar ( $n = 3$  für die verschiedenen Reinigungsstufen,  $n = 4$  für die Kontrolle), der schwarze Strich zeigt den Mittelwert. \*: signifikanter Unterschied zur biologischen Reinigung NKB (ANOVA, Dunnett's-Test, einseitig grösser,  $p = 0.05$ ). Kein signifikanter Unterschied zu ozonbehandeltem Abwasser (ANOVA, Dunnett's-Test, einseitig grösser,  $p = 0.05$ ). Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, WB: Wirbelbett, FB: Festbett, GAK2: unbeladene granulierten Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

Während der Exposition zwischen 64 und 96 Tagen wurden in verschiedenen Testmedien geringe Sauerstoffsättigungen  $< 60\%$  gemessen (Tab. 12). Besonders im Nachklärbecken, mit der niedrigsten Überlebensrate, wurden wiederholt Sauerstoffsättigungen unter  $60\%$ , einem Validitätskriterium der OECD 210, nachgewiesen.

Salmonide Fische bevorzugen frisches, sauerstoffreiches Wasser und Sauerstoffkonzentrationen  $> 5 \text{ mg/L}$  (entspricht einer Sättigung von ca.  $47\%$  bei der Solltemperatur von  $12^\circ\text{C}$  in den Testgefässen). Geringere Sauerstoffkonzentrationen können subletale und letale Effekte bewirken [59-61]. Daher kann ein Einfluss der Sauerstoffsättigung auf das Überleben sowie die Biomarkerantworten der Regenbogenforellen im verlängerten Expositionszeitraum nicht ausgeschlossen werden (siehe auch Kapitel 3.2.3).

#### Gewicht und Länge der Fische nach Testende

Nach Testende wurden Länge und Gewicht der Fische gemessen (Abb. 21). Die Exposition der frühen Lebensstadien gegenüber den unterschiedlich behandelten Abwässern hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Länge oder das Gewicht.



**Abb. 21: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: (A) Gewicht, (B) Standardlänge und (C) Gesamtlänge der Fische nach Testende.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  für die verschiedenen Reinigungsstufen,  $n = 4$  für die Kontrolle. Keine Unterschiede zur biologischen Reinigung (NKB) und zu ozonbehandeltem Abwasser (OZ) (ANOVA, Dunnett's-Test, einseitig grösser (NKB) bzw. beidseitig (OZ),  $p = 0.05$ ). Kontrolle = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, GAK2: unbeladene granulierten Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, SF: Sandfilter.



### *Zusammenfassung und Vergleich mit anderen Studien*

Die Entwicklung von frühen Lebensstadien von Regenbogenforellen im Durchfluss auf der Kläranlage zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen an. Einzig die subletalen Endpunkte bei den Regenbogenforellen – d.h. (i) die Histopathologie und (ii) die Genexpression – die in angegliederten Projekten bearbeitet wurden, gaben Hinweise auf Unterschiede durch die Nachbehandlungen (siehe nachfolgendes Kapitel).

In früheren Studien zeigte die Ozonung gegenüber biologisch gereinigtem Abwasser keine oder eine positive Wirkung auf verschiedene biologische Endpunkte. Auf den ARA Regensdorf (Schweiz) wurde allerdings durch die Ozonung eine Verzögerung der Entwicklung und ein verringertes Gewicht der Fischlarven beobachtet [62]. In Lausanne hingegen trat keine erhöhte Ökotoxizität durch die Ozonung im Vergleich zu biologisch gereinigtem Abwasser auf. Die Behandlung des Abwasser mit Pulveraktivkohle wirkte sich in dieser Studie positiv auf alle beobachteten Endpunkte aus [15].

Auf der ARA Basel zeigten die untersuchten Entwicklungsparameter wie Länge und Gewicht bei den Regenbogenforellen eine Verringerung von negativen Auswirkungen des biologisch gereinigten Abwassers durch die erweiterten Reinigungsstufen wie Aktivkohle und Ozonung an [54].

### **3.2.3 Weiterführende Untersuchungen mit Regenbogenforellen – Histopathologie und Genexpression**

Den Forellen wurden nach Testende die Organe und Gewebe entnommen, um die Genexpression verschiedener Biomarker, den oxidativen Stress im Fox Assay sowie den histopathologischen Zustand zu bestimmen.

Grundsätzlich müssen die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit Vorsicht interpretiert werden, da ein Einfluss der abiotischen Parameter (v.a. die kurzzeitig sehr niedrige Sauerstoffsättigung kurz vor Versuchsende, siehe Abschnitt 3.2.2) nicht auszuschliessen ist. Beispielsweise konnten Larmoyeux und Piper [58] bei Sauerstoffkonzentrationen unter 5 mg/L und einem Ammoniumgehalt über 0.5 mg/L eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes von Forellen nach 4 Monaten Belastung nachweisen. Dies äusserte sich in einer Reduktion der Wachstumsrate und in Schäden der Kiemenstruktur. Zusätzlich traten teilweise histopathologische Schäden an Leber und Niere auf. Allerdings trat nach mehrwöchiger Exposition eine Anpassung an diese Bedingungen auf.

Der mögliche Einfluss verschiedener abiotischer Parameter auf den Gewebezustand der Regenbogenforellen wurde statistisch überprüft (ANCOVA / Kovarianzanalyse). Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Behandlungen und der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt festgestellt. Für die Genexpression wurden all jene Gene aus dem Analyseprogramm entfernt, die durch verringerte Sauerstoffkonzentrationen beeinflusst werden könnten.

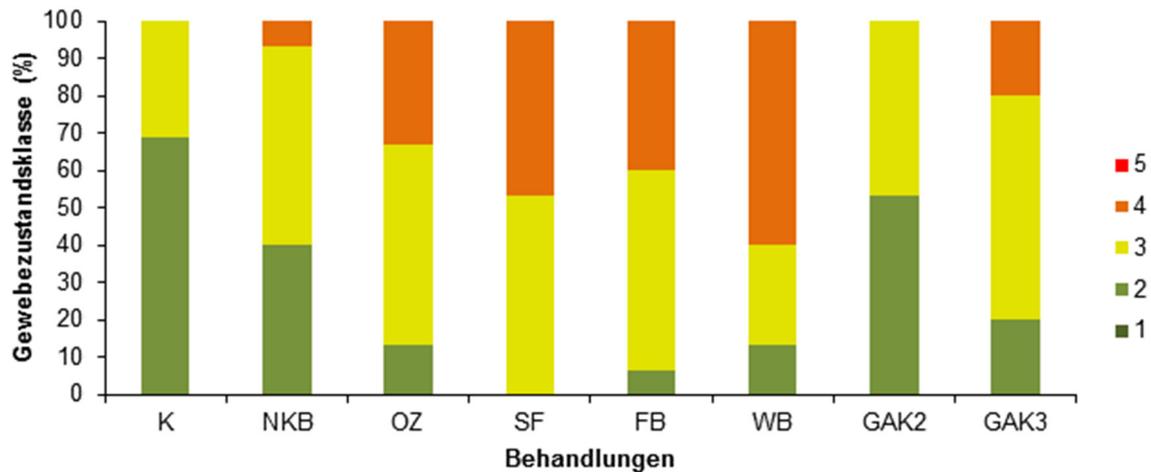
Bei der Analyse von *oxidativem Stress mit dem Fox Assay* [63, 64] konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Nachbehandlungsverfahren nachgewiesen werden [49].

#### *Histopathologie*

Bei der semi-quantitativen Auswertung der Histopathologie zeigte die Kontrolle den besten Zustand des Gewebes an. Der Gewebezustand der Forellen, welche dem mit GAK2 behandelten Abwasser ausgesetzt waren, lag auf einem ähnlichen Niveau wie derjenige der Kontrolltiere. Die Leber war histopathologisch nach OZ, SF, FB, WB und GAK3 in einem signifikant ( $p < 0.05$ ) schlechteren Zustand als in den Kontrollen, ebenso unterschied sich der Gewebezustand der Fische im NKB signifikant vom dem im SF und im WB ( $p = 0.01$ ), jedoch nicht vom Gewebezustand in OZ, FB, GAK2 und GAK3 [49]. Nach Behandlung des Abwassers mit dem GAK-Filter 2 war der Gewebezustand im Vergleich zur Ozonung signifikant verbessert ( $p = 0.03$ ). Das bedeutet, dass die histopathologischen Auswirkungen, die durch das Abwasser nach NKB und Ozonung verursacht wurden, mit dem GAK2 wieder eliminiert werden konnten. Zwischen der Ozonung und den anderen nachgeschalteten Abwasserbehandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Dadurch können keine Vergleiche über deren Effizienz zur



Elimination von histopathologischen Effekten angestellt werden. [49]. In Abb. 22 (verändert nach [49]) wird der Anteil der jeweiligen Gewebezustandsklassen angegeben.



**Abb. 22: Semi-quantitative Auswertung der histopathologischen Leberveränderungen bei Regenbogenforellen.**

Gewebezustandsklassen: 1 = Kontroll-Status, 2 = Zwischenstadium, 3 = Reaktionsstadium, 4 = Zwischenstadium, 5 = Stadium der Zerstörung. Gewebezustandsklasse 1 und 5 kamen bei diesem Versuch nicht vor. K = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

### Genexpression

Die Regulation eines ausgewählten Sets an Biomarker-Genen (Tab. 14) wurde ebenfalls an den Regenbogenforellen aus dem *Fish Early Life Stage Toxicity*-Test (Kapitel 3.2.2) untersucht. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes „Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: Biomonitoring mit Forellen“ durchgeführt. Die Ergebnisse werden hier zusammenfassend vorgestellt

Da der Fokus der Untersuchungen auf den möglichen Auswirkungen von reaktiven Abbauprodukten infolge von Ozonung lag, wurden Gene gewählt, deren Produkte in der Zelle bei oxidativem Stress und für die Biotransformation (d.h. einer Umwandlung von Fremdstoffen im Organismus durch Enzyme) vermehrt produziert werden. Zusätzlich wurden aber auch Gene untersucht, welche an der allgemeinen Stressantwort, der Immunregulierung, der hormonellen Wirkung und an der Reaktion auf Schwermetallbelastung beteiligt sind. Diese Analysen beruhen auf der Regulierung von mRNA-Transkripten als biologischem Endpunkt. Die Induktion der einzelnen Biomarker-Gene wird in Relation zu einem „Housekeeping“-Gen quantifiziert, dessen Expression durch die Belastung nicht reguliert wird und das dadurch unabhängig vom Zustand der Zellen ist.



Tab. 14: Liste der ausgewählten Biomarker-Gene, und die dazugehörige zelluläre Funktion.

Zelluläre Antwort	Markergen
Allgemeine Stressantwort	ABCB1 ( <i>ABC-Transporter B1, P-Glycoprotein, MDR1</i> )
	Abcc2 ( <i>ABC-Transporter C2, MRP2</i> )
Zellzyklus	p53 ( <i>Tumor-Unterdrücker / tumor suppressor -Gen</i> )
Biotransformation	CYP1A ( <i>Cytochrom P450 1A</i> )
	CYP3A ( <i>Cytochrom P450 3A</i> )
	GST ( <i>Glutathion-S-Transferase</i> )
	UDP-Glucuronosyltransferase
	Methyltransferase
Immunregulation und Abwehr von Krankheitserregern	TNFa ( <i>Tumor-Nekrose-Faktor / tumor necrosis factor alpha</i> )
	IL-1beta ( <i>Interleukin-1beta</i> )
Hormonelle Wirkung	VTG ( <i>Vitellogenin</i> )
Metallstress	MTb ( <i>Metallothionein B</i> )
Oxidativer Stress	NrF2 ( <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> )
	GR ( <i>Glutathion-Reduktase</i> )
	PGC-1alpha ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
	CAT ( <i>Catalase</i> )
	SOD ( <i>Superoxid-Dismutase</i> )
Stoffwechsel	PEPCK ( <i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase</i> )

**Oxidativer Stress:** Alle untersuchten Biomarker, welche mit oxidativem Stress zusammenhängen, zeigten eine signifikante Erhöhung der Geninduktion im Nachklärbecken (Abb. 23). Die Fische in diesen Behandlungen waren auch von dem Belüftungsausfall 48 h vor Probenahme am stärksten beeinträchtigt (i.e. erhöhte Sterblichkeit). Nach Ozonung waren nur noch 3 von 7 Biomarkern signifikant induziert (NrF2, SOD und PCG), was darauf hindeutet, dass keine zusätzlichen reaktiven Ozonungsprodukte entstanden sind. Beim Vergleich der Nachbehandlungen konnten in den meisten Fällen keine Unterschiede zur Ozonung festgestellt werden (CAT, GR, GPx, PGC). Lediglich bei einem der untersuchten Markergene (NrF2) lag die Geninduktion nach der Behandlung mit dem GAK2 und dem FB signifikant tiefer als direkt nach der Ozonung. Beim Markergen SOD war lediglich beim GAK2 eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Ozonung aufgetreten. Es muss aber angemerkt werden, dass die Geninduktion zwischen den Replikaten teilweise stark variierte.



Oxidativer Stress

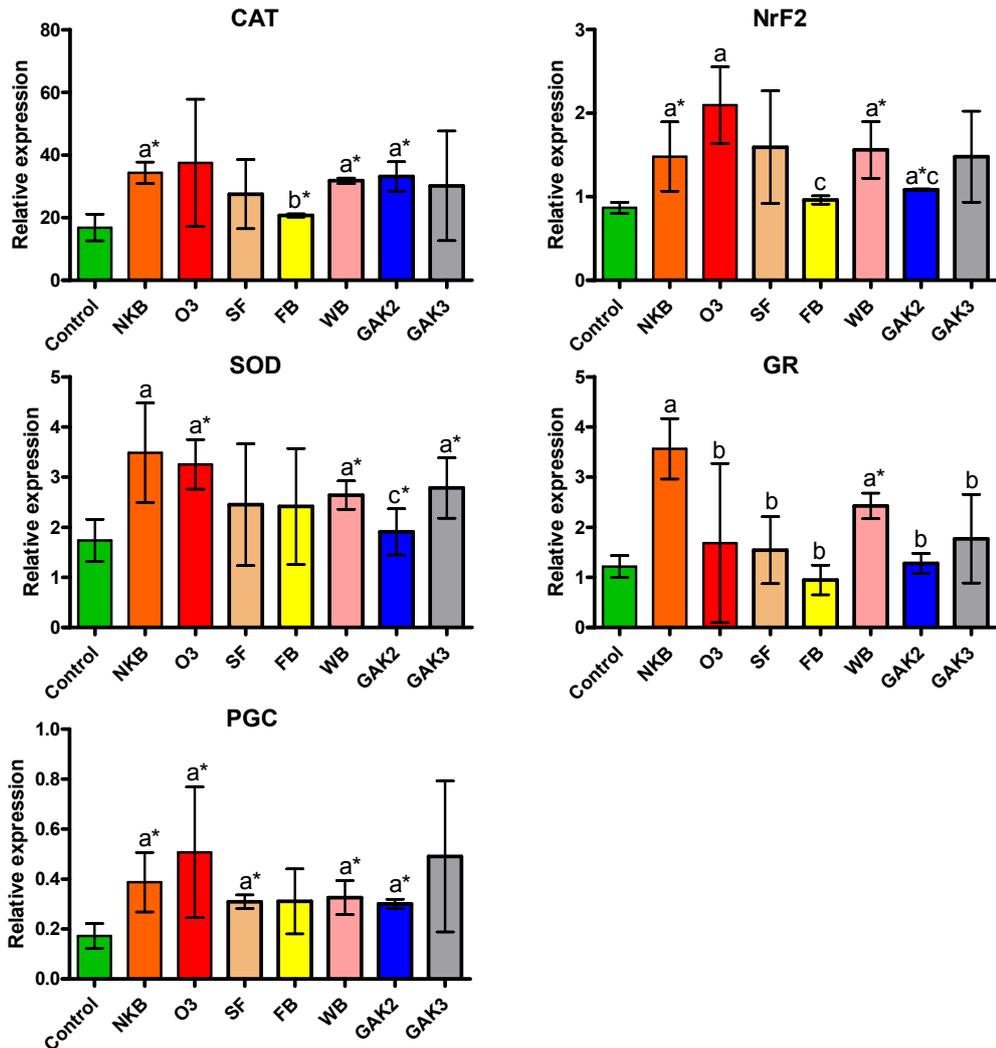


Abb. 23: Ergebnisse der Biomarker für oxidativen Stress in Lebergewebe von Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.

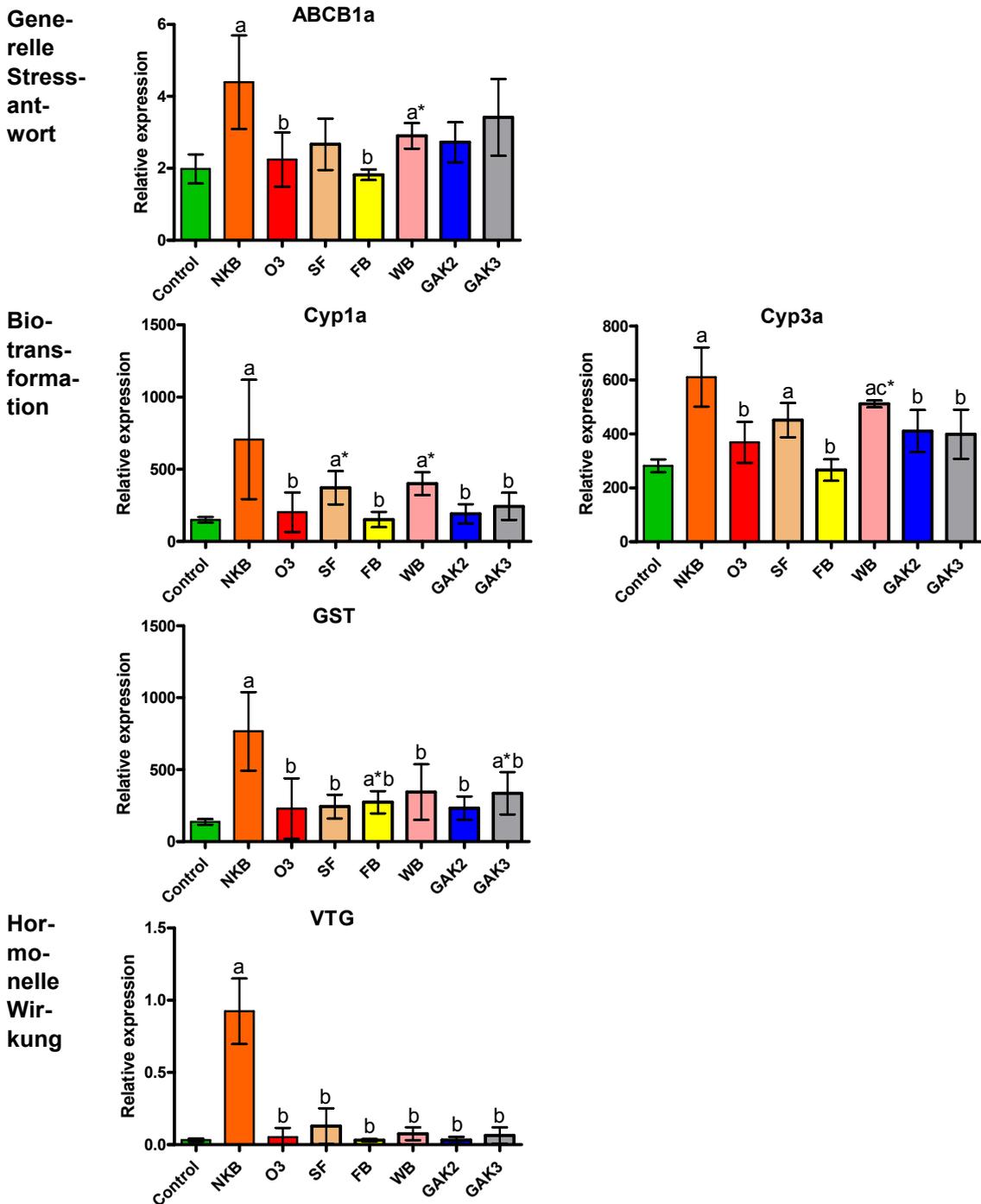
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $n$  Kontrolle = 4,  $n$  Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA-Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b: signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c: signifikanter Unterschied zur Ozonung (Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde noch eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit \* markiert. Die jeweiligen Buchstaben zeigen welche Gruppen verglichen wurden). NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

**Allgemeine Stressantwort:** Bei der Untersuchung der Biomarker, die in Verbindung mit einer allgemeinen Stressantwort stehen, konnte bei ABCB1a eine signifikante Abnahme der Geninduktion nach Ozonung im Vergleich zum NKB festgestellt werden (Abb. 24). Es gab keinen Unterschied zwischen Ozonung und den Nachbehandlungen.

**Biotransformation:** Bei Biomarkern, welche mit Biotransformation zusammenhängen, waren nach dem NKB sämtliche getesteten Gene (Cyp1a, Cyp3a und GST) signifikant erhöht. In der Ozonung reduzierte sich die Induktion für diese Biomarker signifikant, was die Elimination von Mikroverunreinigungen in der Ozonung bestätigt. Bei den Nachbehandlungen konnten mit einer Ausnahme (CYP3a) keine Unterschiede im Vergleich zur Ozonung nachgewiesen werden. Nur nach der Behandlung im Wirbelbett, war CYP3a signifikant erhöht. Dies ist vermutlich methodisch bedingt. Nach dem NKB war der Biomarker für östrogene Wirkung (Expression des Vitellogenin-



Gens (VTG)) erhöht. Nach Ozonung und allen Nachbehandlungen reduzierte sich die Vitelogenin-Induktion signifikant.



**Abb. 24: Ergebnisse der Biomarker für generelle Stressantwort, Biotransformation und hormonelle Wirkung in Lebergewebe von Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.**

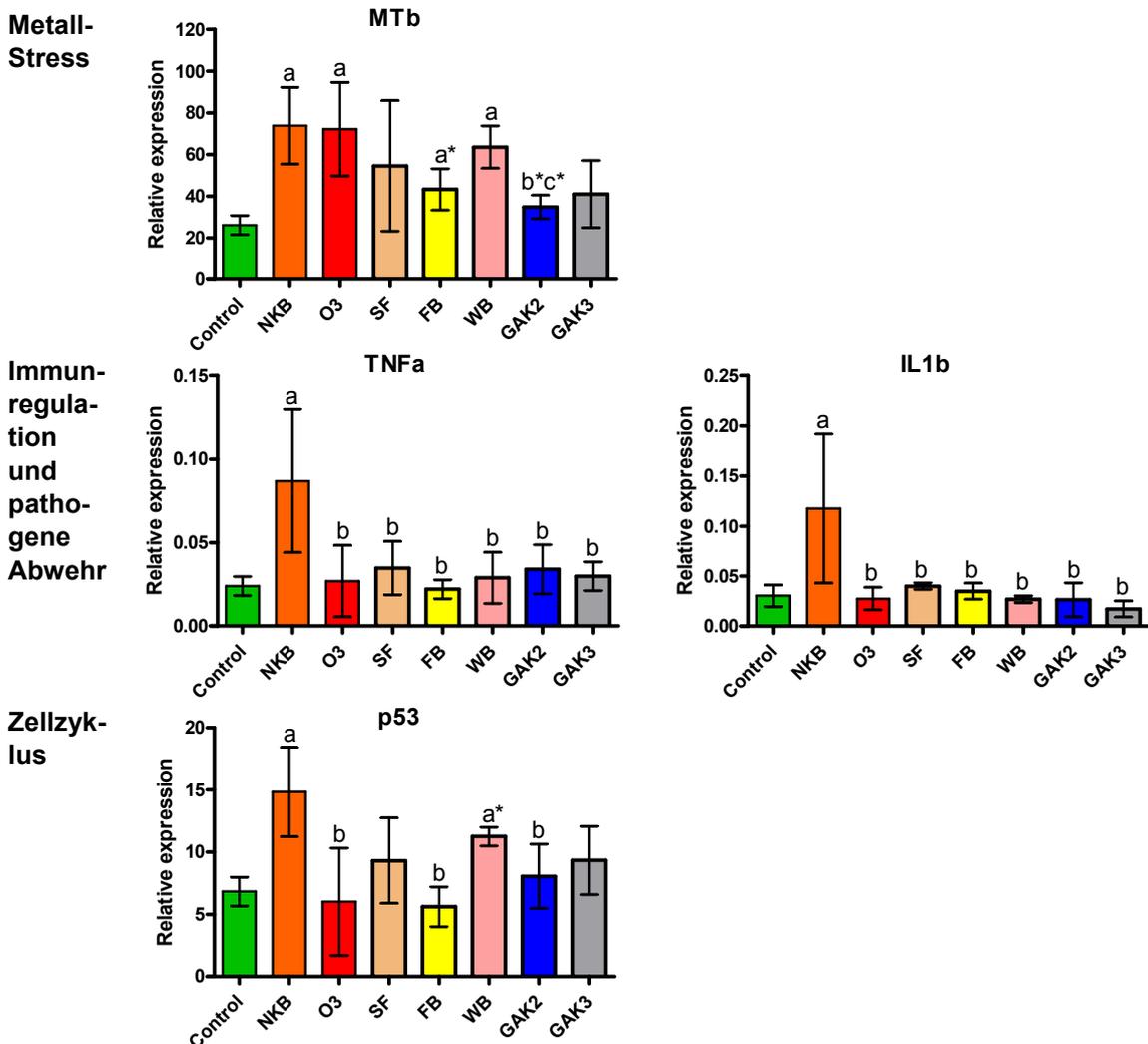
Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $n$  Kontrolle = 4,  $n$  Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b: signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c: signifikanter Unterschied zur Ozonung (Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde noch eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit \* markiert. Die jeweiligen Buchstaben zeigen welche Gruppen verglichen wurden). NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



**Schwermetallstress:** Beim Metallothionein b (MTb), einem Biomarker für Schwermetallstress, unterschieden sich die Induktion im NKB und in der Ozonung nicht voneinander (Abb. 25), da Ozon Schwermetalle nicht aus dem Wasser entfernt. Die Expression von MTb wurde insbesondere durch die Behandlung mit dem GAK-Filter 2 signifikant reduziert. Das kann damit erklärt werden, dass Schwermetalle gut an die neue Aktivkohle binden und somit aus der Wasserphase entfernt werden (z.B. [65]).

**Immunregulation:** Die beiden Biomarker für Immunregulation (TNFa) und pathogene Abwehr (Abwehr von Krankheitserregern; IL1b) zeigten eine deutliche Induktion nach dem NKB und eine signifikante Reduktion durch die Ozonung. Diese Biomarker wurden durch die untersuchten Nachbehandlungsverfahren nicht weiter beeinflusst.

**Zellzyklus:** P53 als Zellzyklus-Biomarker zeigte eine signifikante Reduktion durch die Ozonung im Vergleich zum NKB. Bei den Nachbehandlungen trat kein Unterschied zur Ozonung auf. Vergleicht man die Induktion in den Nachbehandlungen allerdings mit derjenigen im biologisch gereinigten Abwasser, haben der GAK-Filter 2 sowie das FB am besten abgeschnitten.

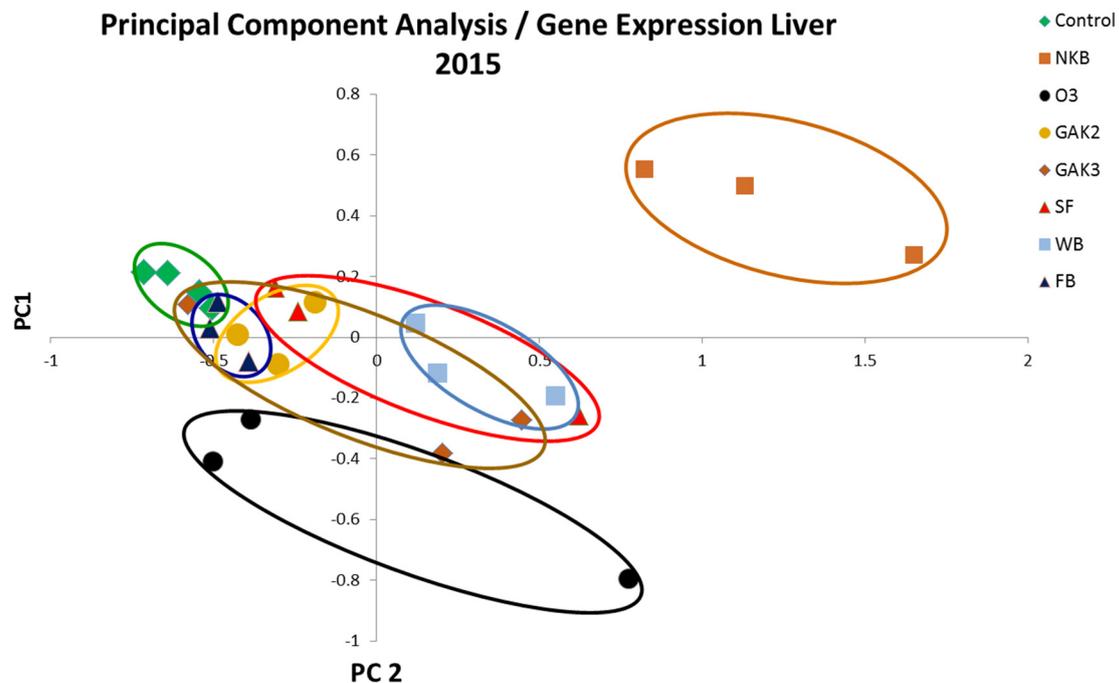




**Abb. 25: Ergebnisse der Biomarker für verschiedene zelluläre Reaktionen wie Metall-Stress, Immunregulation und pathogene Abwehr und Zellzyklus in Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.**

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n$  Kontrolle = 4,  $n$  Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b: signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c: signifikanter Unterschied zur Ozonung (Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt, unabhängig von der ANOVA wurde noch eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit \* markiert. Die jeweiligen Buchstaben zeigen welche Gruppen verglichen wurden). NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

In der Hauptkomponenten („Principal Component“) -Analyse (Abb. 26) wird das Verhalten aller getesteten Biomarker der verschiedenen Reinigungsstufen integriert und durch die Lage und Distanz zueinander ausgedrückt. Je ähnlicher die Genexpressionsmuster, desto näher aneinander liegen die Proben in der Matrix. Das Nachklärbecken ist am weitesten von der Kontrolle entfernt, auch die Ozonung liegt deutlich abseits, aber näher an der Kontrolle. Bei den unterschiedlichen Nachbehandlungen liegen der GAK-Filter mit neuer Aktivkohle (GAK2) und das Festbett am nächsten zur Kontrolle. Für GAK2 deckt sich dies mit den Ergebnissen der anderen Biotests.



**Abb. 26: Hauptkomponenten-Analyse aller getesteten Biomarker in Lebergewebe der Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.**

$n$  Kontrolle = 4,  $n$  Behandlung = 3. Umso näher die Daten liegen umso ähnlicher verhalten sich die Biomarker in den Behandlungen. NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



### **Zusammenfassung**

*Histopathologie:* Insgesamt war der Gewebezustand der Leber nach OZ, SF, FB, WB und GAK3 signifikant schlechter als bei der Kontrollgruppe (Regenbogenforellen, die gegenüber künstlich zusammengesetztem Kontrollwasser ausgesetzt waren). Der Gewebezustand der Fische im NKB unterschied sich signifikant vom dem im SF und im WB, jedoch nicht vom Gewebezustand in OZ, FB, GAK2 und GAK3. Der GAK-Filter 2 mit neuer Aktivkohle bewirkte eine Verbesserung des Gewebezustands der Leber. Zwischen der Ozonung und den anderen nachgeschalteten Reinigungsstufen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Dadurch können keine Vergleiche über deren Effizienz zur Elimination von histopathologischen Effekten angestellt werden.

*Genexpression:* Die Untersuchungen haben ergeben, dass die Mehrheit der untersuchten Biomarker signifikant erhöht (induziert) war, wenn die Forellen dem biologisch gereinigten Abwasser (NKB) ausgesetzt wurden. Diese negativen Reaktionen – insbesondere die Biotransformation, die hormonelle Wirkung, die Immunregulation sowie der Zellzyklus – wurden durch die Behandlung mit Ozon signifikant verringert. Die verschiedenen Nachbehandlungen erzielten zwar eine weitere Veränderung der Biomarkermuster (u.a. auch eine teilweise Verbesserung), allerdings unterschieden sich diese weniger deutlich voneinander als der Ablauf NKB und die Ozonung. Es hat sich gezeigt, dass die Genexpressionsmuster der Regenbogenforellen, die dem durch GAK2 und Festbett behandelten Abwasser ausgesetzt wurden, dem Genexpressionsmuster der Kontrolltiere am ähnlichsten waren, und sich deutlich von der Ozonung unterschieden. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Muster der Biomarker im NKB, gefolgt von der Ozonung, deutlich von dem Biomarker-Muster in der unbelasteten Kontrolle unterschieden.

Ob und wie stark diese Ergebnisse durch die geringen Sauerstoffkonzentrationen gegen Testende beeinflusst worden sind, kann anhand der vorhandenen Daten teilweise ermittelt werden. Beispielsweise ergab eine statistische Auswertung keinen Einfluss von Sauerstoffmangel und Temperatur auf die Gewebeveränderungen. Auch wurden diejenigen Gene aus der Genexpressionsanalyse entfernt, die durch Sauerstoffmangel beeinflusst werden konnten. Dennoch kann ein Einfluss auf die Testergebnisse nicht 100%ig ausgeschlossen werden.



## 4 Erfolgskontrolle der erweiterten Abwasserbehandlungsmethoden

Im Folgenden werden die Biotests verglichen und die Veränderung der Toxizität über die verschiedenen Reinigungsstufen betrachtet. Der Vergleich der Biotests wurde analog zum Projekt "Strategie Micropoll" durchgeführt [15]. Zunächst wird hierfür die Berechnung eines sogenannten *Change Index* zum Vergleich der Biotests beschrieben.

### 4.1 Change Index

Um die Effizienz der verschiedenen Reinigungsstufen zu evaluieren, wurden die Ergebnisse der Biotests mit Hilfe eines sogenannten *Change Index* (CI) verglichen. Dieser Index wurde von Ratte und Ratte [66] entwickelt, um verschiedene Biotests mit Rohabwasserproben oder aufkonzentrierten Proben besser vergleichen zu können. Der CI beschreibt die relative Veränderung in der Toxizität nach einzelnen Reinigungsstufen. So können die Ergebnisse von Tests mit und ohne Probenanreicherung und somit auch von *in vitro*- und *in vivo*-Biotests direkt miteinander verglichen werden.

Der CI wird analog zur Eliminationseffizienz folgendermassen berechnet:

$$\text{(Gleichung 1) CI} = \frac{\text{ECx- oder NOEC oder LOEC-Werte nach Reinigungsstufe}}{\text{ECx- oder NOEC oder LOEC-Werte vor Reinigungsstufe}}$$

$$\text{(Gleichung 2) CI}_{BEQ} = \left( \frac{\text{BEQ nach Reinigungsstufe}}{\text{BEQ vor Reinigungsstufe}} \right)^{-1}$$

Gleichung 1 wird für EC<sub>x</sub>- und NOEC- / LOEC-Werte verwendet. Hier gilt: Je höher der jeweilige EC<sub>x</sub>- oder NOEC- / LOEC-Wert ist, desto stärker nimmt die Toxizität der Probe ab (und der CI zu). Je höher der CI, desto stärker die Verringerung der Toxizität durch die Reinigungsstufe.

Gleichung 2 wird für bioanalytische Äquivalenz-Konzentrationen (BEQ) verwendet. Die BEQ ist die Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe. Für BEQs gilt: Je höher die BEQ ist, desto wirksamer / toxischer ist die Substanz oder Umweltprobe. Mit abnehmender Wirkung nimmt somit auch die BEQ ab. Je höher CI<sub>BEQ</sub>, desto stärker die Reduktion der Toxizität durch die Reinigungsstufe.

Zusammenfassend zeigen die CIs für die Toxizitätsparameter EC<sub>x</sub> und BEQ und für signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle:

Change Index CI > 1 abnehmende Toxizität

Change Index CI ~1 gleichbleibende Toxizität (Bereich: 0.75 < CI < 1.25)

Change Index CI < 1 zunehmende Toxizität

Eine Abweichung von gleich oder mehr als 25% vom CI = 1, z.B. CI ≥ 1.25 oder CI ≤ 0.75, wurde jeweils als signifikante Verringerung oder Erhöhung der Toxizität durch eine bestimmte Behandlungsstufe gewertet. Dieses relative hohe Toleranzniveau wurde gewählt, um die Variabilität der Biotests bei der Beurteilung zu berücksichtigen.



Um die Ergebnisse der Biotests zu vergleichen, wurden die folgenden CIs berechnet:

CI <sub>NKB/NKB</sub>	Auswirkung biologische Behandlung
CI <sub>OZ/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung
CI <sub>SF/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung + Sandfilter
CI <sub>FB/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung + Festbett
CI <sub>WB/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung + Wirbelbett
CI <sub>GAK2/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung + GAK2
CI <sub>GAK3/NKB</sub>	Auswirkung Ozonung + GAK3

Zusätzlich wurden die 5 Nachbehandlungen separat beurteilt:

CI <sub>SF/OZ</sub>	Auswirkung Sandfilter
CI <sub>FB/OZ</sub>	Auswirkung Festbett
CI <sub>WB/OZ</sub>	Auswirkung Wirbelbett
CI <sub>GAK2/OZ</sub>	Auswirkung GAK2
CI <sub>GAK3/OZ</sub>	Auswirkung GAK3

Für die beiden *in vivo*-Biotests, die im Durchfluss auf der Kläranlage durchgeführt wurden (mit Glanzwürmern und Regenbogenforellen) konnten keine Toxizitätsparameter berechnet werden, da die Wasserproben nicht als Verdünnungsreihen getestet wurden. Für diese Tests wurden zum einen die Daten (z.B. Anzahl geschlüpfter Fische) statistisch mit einer Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett's-Test (Graph Pad Prism) verglichen. Zusätzlich wurde der CI berechnet, bei dem ein Toleranzniveau von 25% überschritten werden musste, um als Abweichung zu gelten.

Nachfolgend werden die Indikatorwerte der verschiedenen Biotests mit Hilfe des CI verglichen.



## 4.2 Vergleich der Biotestergebnisse

Die folgenden Tabellen (Tab. 15, Tab. 16, Tab. 17 und Tab. 18) geben einen Überblick über die Biotestergebnisse, dargestellt mit Hilfe des CI, um die Veränderung der Effekte nach jedem Abwasserbehandlungsschritt aufzuzeigen. Detaillierte Ergebnisse für jeden Toxizitätsparameter, die Change Indices und die Eliminationseffizienzen können im Anhang gefunden werden (Tab. 21 bis Tab. 30).

### 4.2.1 *In vitro*- und *in vivo*-Biotests im Labor

Tab. 15 zeigt die Gesamtveränderungen über verschiedene Reinigungsstufen (inklusive kombinierter Reinigungsstufen) in *in vitro* und *in vivo*-Biotests im Labor basierend auf Change Indices (CI).

**Tab. 15: Change Indices (CI) für *in vitro*- und *in vivo*-Biotests der kombinierten Reinigungsstufen.**

Ein roter Hintergrund bedeutet  $CI \leq 0.75$  = zunehmende Wirkung, ein grauer Hintergrund bedeutet  $CI \sim 1$  = gleichbleibende Effekte und ein grüner Hintergrund bedeutet  $CI \geq 1.25$  = abnehmende Effekte in 2 oder 3 Messkampagnen. Ausgestrichene Felder bedeuten, dass keine Proben aus dem Vorklärbecken bzw. dem Nachklärbecken gemessen wurden und daher die Wirkung der biologischen Behandlung nicht untersucht werden konnte.

Biotest	Effektparameter	Auswirkung Biologische Behandlung (CI <sub>NKB/VKB</sub> )	Auswirkung Ozonung (CI <sub>OZ/NKB</sub> )	Auswirkung Ozonung + SF (CI <sub>SF/NKB</sub> )	Auswirkung Ozonung + Festbett (CI <sub>FB/NKB</sub> )	Auswirkung Ozonung + Wirbelbett (CI <sub>WB/NKB</sub> )	Auswirkung Ozonung + GAK2 (CI <sub>GAK2/NKB</sub> )	Auswirkung Ozonung + GAK3 (CI <sub>GAK3/NKB</sub> )
<b>Ames-Test</b>	Mutagenität (Anzahl rückmutierter Bakterien-Kolonien) (20fach aufkonzentrierte Proben)	TA100-9						
		TA100+S9						
		TA89-S9						
		TA98+S9						
<b>Leuchtbakterien-test</b>	Lumineszenzhemmung (Basistoxizitäts-Äquivalente, mg/L)	21	2.9	3.1	2.7	2.8	4.3	3.5
<b>Grünalgen</b>	Hemmung der Photosynthese (Diuron-Äquivalente, ng/L)	2.9	4.8	3.8	5.2	4.4	15	7.7
	Wachstumshemmung (Basistoxizitäts-Äquivalente, mg/L)	8.8	4.5	5.3	4.9	4.7	5.9	4.9
<b>Wasserflöhe</b>	Nachkommenzahl (EC <sub>20</sub> )		0.9	0.9	0.8	0.9	1	1.2

Tab. 16 zeigt die Veränderungen der einzelnen Nachbehandlungen in *in vitro* und *in vivo*-Biotests im Labor basierend auf Change Indices (CI).



**Tab. 16: Change Indices (CI) für in vitro- und in vivo-Biotests der Nachbehandlungen.**

Ein roter Hintergrund bedeutet  $CI \leq 0.75$  = zunehmende Wirkung, ein grauer Hintergrund bedeutet  $CI \sim 1$  = gleichbleibende Effekte und ein grüner Hintergrund bedeutet  $CI \geq 1.25$  = abnehmende Effekte in 2 oder 3 Messkampagnen. Var. und # bezeichnen variierende Ergebnisse zwischen verschiedenen Messkampagnen (in grau). \* bezeichnet Ergebnisse die nicht numerisch belegt werden können, da sie unterhalb der Mutagenitätsgrenze liegen.

Biotest	Effektparameter	Auswirkung Sandfilter ( $CI_{SF/OZ}$ )	Auswirkung Festbett ( $CI_{FB/OZ}$ )	Auswirkung Wirbelbett ( $CI_{WB/OZ}$ )	Auswirkung GAK2 ( $CI_{GAK2/OZ}$ )	Auswirkung GAK3 ( $CI_{GAK3/OZ}$ )
<b>Ames-Test</b>	Mutagenität TA100-9	*	*	*	*	*
	(Anzahl rückmutierter Bakterien-Kolonien, TA100+S9)	*	*	*	*	*
	20fach aufkonzentrierte Proben) TA89-S9	var.#	*	*	*	*
	TA98+S9	*	*	*	*	*
<b>Leuchtbakterien-test</b>	Lumineszenzhemmung (Basistoxizitäts-Äquivalente, mg/L)	1.1 <sup>#</sup>	0.9 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.2
<b>Kombinierter Algentest</b>	Hemmung der Photosynthese (Diuron-Äquivalente, ng/L)	0.8	1.1	0.9	3.2	1.6 <sup>a</sup>
	Wachstumshemmung (Basistoxizitäts-Äquivalente, mg/L)	1.2 <sup>#</sup>	1.1	1.1 <sup>#</sup>	1.3 <sup>#</sup>	1.1 <sup>#</sup>
<b>Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen</b>	Nachkommenzahl ( $EC_{20}$ )	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0

<sup>a</sup> Im Change Index wird eine Verbesserung errechnet, bei der statistischen Auswertung mit ANOVA konnte aber aufgrund der hohen Variabilität der Daten keine Signifikanz ermittelt werden.



Die biologische Behandlung bewirkte in allen 3 Messkampagnen eine Abnahme der Toxizität des Abwassers in den Tests mit Leuchtbakterien und mit Algen. Die darauffolgende Behandlung mit Ozon reduzierte die Toxizität weiter. Die Nachbehandlungen verringerten die Auswirkung des Abwassers zusätzlich. Im Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen veränderte sich die Nachkommenzahl im Mittel in keiner der verschiedenen Reinigungsstufen, was sich in einem CI um 1 widerspiegelt.

In den 1fach konzentrierten Abwasserproben konnte keine Mutagenität nachgewiesen werden. Nach 20facher Anreicherung wurde vereinzelt in der ersten Messkampagne nach Ozonung Mutagenität (Bakterienstamm TA100-S9) und mögliche Mutagenität (Bakterienstamm TA98-S9) gefunden. Im nachgeschalteten Sandfilter gab es Hinweise auf eine verbleibende mögliche Mutagenität bei den Bakterienstämmen TA100-S9 bzw. TA98-S9. In allen weiteren Nachbehandlungen der ersten Messkampagne wurde keine Mutagenität mehr detektiert, daher muss eine Elimination des mutagenen Potentials in diesen Nachbehandlungen stattgefunden haben. In den weiteren Messkampagnen trat keine Mutagenität nach der Ozonung und den anderen Nachbehandlungen auf. Da in 2 oder 3 der Messkampagnen kein Effekt nachgewiesen wurde, wird in Tab. 16 kein CI angegeben.

Nach dem Sandfilter trat einzig in der dritten Messkampagne Mutagenität (Bakterienstamm TA98-S9) und mögliche Mutagenität (Bakterienstamm TA98+S9) auf. Da weder in der Ozonung, noch in den anderen Nachbehandlungen Mutagenität nachgewiesen werden konnte, ist dieser Effekt auf den Sandfilter beschränkt. Dieser Befund ist ungewöhnlich und kann mit den vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Im Gegensatz dazu war in der ersten Messkampagne eine geringfügige Verringerung des mutagenen Potentials durch den Sandfilter aufgetreten. Dadurch sind in Tab. 16 für TA 98-S9 variable Ergebnisse im CI dargestellt.

Insgesamt zeigten sich geringfügige Unterschiede in den Nachbehandlungen:

Der **Sandfilter** erbrachte keine zusätzliche Verringerung der ökotoxikologischen Effekte. Bei der Hemmung der Photosynthese im kombinierten Algentest und beim Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen blieben die Effekte auf dem gleichen Niveau. Im Leuchtbakterientest, beim Endpunkt Wachstum im kombinierten Algentest und beim Ames-Mutagenitätstest (TA98-S9) variierten die Ergebnisse je nach Messkampagne.

Das **Festbett** zeigte in den Tests mit Algen und Wasserflöhen keine effektbasierte Veränderung an. Der Leuchtbakterientest ergab variable Ergebnisse innerhalb der 3 Messkampagnen.

Die Abwasserbehandlung im **Wirbelbett** zeigte bei 2 Biotests (Photosystem II-hemmende Wirkung im kombinierten Algentest und Fortpflanzung bei den Wasserflöhen) keine Veränderung in den Auswirkungen des Abwassers. Die Ergebnisse variierten im Leuchtbakterientest und beim Endpunkt Wachstum im kombinierten Algentest abhängig von der Messkampagne.

Der **unbeladene Aktivkohlefilter (GAK2)** zeigte mit dem CI eine Verbesserung in der Auswirkung des Abwassers in 2 Biotests an (Leuchtbakterientest und Photosynthese-Hemmung im kombinierten Algentest). Beim Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen zeigten sich keine Veränderungen. Beim Endpunkt Wachstum im kombinierten Algentest ergaben sich variable Ergebnisse abhängig von der Messkampagne. Der GAK-Filter 2 hat bei mehreren Biotests die verschiedene Ernährungsebenen abdecken eine Verbesserung gebracht. Daher wird dieser Filter als effizienteste Nachbehandlung eingestuft.

Der **beladene Aktivkohlefilter (GAK3)** zeigte mit dem CI eine Verbesserung der Photosynthese-Hemmung im kombinierten Algentest an. Zwei Biotests zeigten keine Veränderung (Leuchtbakterientest und Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen) und einer variable Ergebnisse (Endpunkt Wachstum im kombinierten Algentest) zwischen einzelnen Messkampagnen an. Damit gehörte der beladene Aktivkohlefilter zu den effizienteren Nachbehandlungen.

Grundsätzlich muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass die Nachbehandlungen mit granulierter Aktivkohle zusätzlich zum biologischen Abbau von Stoffen auch Stoffe durch Adsorption an die Kohle entfernen. Dies erklärt die weitere Verringerung von Algen- und Leuchtbakterientoxizität in diesen Behandlungen. Unterschiede in der Entfernung von labilen Reaktionsprodukten aus der Ozonung (die Hauptaufgabe der Nachbehandlungen) traten zwischen den Verfahren mit rein biologischem Abbau (SF, FB, WB) und biologischem Abbau in Kombination mit Adsorption (GAK2, GAK3) nicht auf.



#### 4.2.2 *In vivo*-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut

Tab. 17 zeigt die Gesamtveränderungen über verschiedene Reinigungsstufen (inklusive kombinierter Reinigungsstufen) in *in vivo*-Biotests basierend auf Change Indices (CIs).

**Tab. 17: Change Indices (CI) der kombinierten Reinigungsstufen für *in vivo*-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut.**

Ein roter Hintergrund bedeutet  $CI \leq 0.75$  = zunehmende Wirkung, ein grauer Hintergrund bedeutet  $CI \sim 1$  = gleichbleibende Effekte und ein grüner Hintergrund bedeutet  $CI \geq 1.25$  = abnehmende Effekte. Ausgestrichene Felder bedeuten, dass keine Proben aus dem Vorklärbecken gemessen wurden und daher die Wirkung der biologischen Behandlung nicht untersucht werden konnte.

Testorganismus	Effektparameter	Auswirkung Biologische Behandlung ( $CI_{NKB/VKB}$ )	Auswirkung Ozonung ( $CI_{OZ/NKB}$ )	Auswirkung Ozonung + SF ( $CI_{SF/NKB}$ )	Auswirkung Ozonung + Festbett ( $CI_{FB/NKB}$ )	Auswirkung Ozonung + Wirbelbett ( $CI_{WB/NKB}$ )	Auswirkung Ozonung + GAK2 ( $CI_{GAK2/NKB}$ )	Auswirkung Ozonung + GAK3 ( $CI_{GAK3/NKB}$ )	
Glanzwurm	Anzahl Würmer		1.2	1.2	1.3	1.2	1.1	1.0	
	Biomasse Würmer		1.1	1.0	1.2	1.1	1.2	0.9	
Regenbogen- forelle	Gesamtüberlebens- rate 64 d		0.9	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0	
	Überleben der Embryonen		0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Schlupf		0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Überleben nach Schlupf 64 d		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Aufschwimmen		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Frischgewicht der Larven bei Testende		1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0
	Standard-Länge der Larven bei Testende		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Gesamt-Länge der Larven bei Testende		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0



Tab. 18 zeigt die Veränderungen der einzelnen Nachbehandlungen in *in vivo*-Biotests basierend auf Change Indices (CIs).

**Tab. 18: Change Indices (CI) der Nachbehandlungen für *in vivo*-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut.**

Ein roter Hintergrund bedeutet  $CI \leq 0.75$  = zunehmende Wirkung, ein grauer Hintergrund bedeutet  $CI \sim 1$  = gleichbleibende Effekte und ein grüner Hintergrund bedeutet  $CI \geq 1.25$  = abnehmende Effekte

Testorganismus	Effektparameter	Auswirkung Sandfilter ( $CI_{SF/OZ}$ )	Auswirkung Festbett ( $CI_{FB/OZ}$ )	Auswirkung Wirbelbett ( $CI_{WB/OZ}$ )	Auswirkung GAK2 ( $CI_{GAK2/OZ}$ )	Auswirkung GAK3 ( $CI_{GAK3/OZ}$ )
<b>Glanzwurm</b>	Anzahl Würmer	1.0	1.1	1.0	0.9	0.8
	Biomasse Würmer	0.9	1.1	1.0	1.0	1.1
<b>Regenbogenforelle</b>	Gesamtüberlebensrate 64 d	1.2	1.0	1.0	1.1	1.1
	Überleben der Embryonen	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2
	Schlupf	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1
	Überleben nach Schlupf 64 d	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
	Aufschwimmen	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
	Frischgewicht der Larven bei Testende	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Standard-Länge der Larven bei Testende	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Gesamt-Länge der Larven bei Testende	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Beim **Glanzwurm-Test** konnten kaum Veränderungen in der Anzahl und der Biomasse bei den verschiedenen Nachbehandlungsverfahren festgestellt werden. Einzig bei der Ozonung in Kombination mit dem Festbett wurde eine Erhöhung der Anzahl der Glanzwürmer gemessen. Im **Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen** konnten nach 64 Tagen bei allen 8 untersuchten Endpunkten keine Effekte festgestellt werden. Aus diesem Grund kann anhand dieser beiden *in vivo*-Biotests (im Durchfluss) keine Aussage über die Effizienz der Nachbehandlungsverfahren gemacht werden.



## 5 Schlussfolgerungen

Im Projekt ReTREAT konnte gezeigt werden, dass in der ARA Neugut durch die Ozonung keine oder kaum problematische Reaktionsprodukte gebildet wurden („Auffälligkeiten“), und die Toxizität des Abwassers direkt nach der Ozonung sehr gering war.

In Bezug auf Auffälligkeiten nach der Ozonung konnte mit dem Ames-Test bei 1-facher Probenkonzentration in keiner der Abwasserproben Mutagenität nachgewiesen werden. Nach 20-facher Anreicherung wurde in der ersten der drei durchgeführten Messkampagnen (2.-3.2.2015) direkt nach der Ozonung Mutagenität nachgewiesen. Dieser Effekt konnte durch die Nachbehandlungsverfahren entweder reduziert (Sandfilter) oder eliminiert werden (GAK2, GAK3, Festbett, Wirbelbett). Die Nachbehandlungsverfahren waren somit effizient in der Elimination von nach der Ozonung auftretenden Auffälligkeiten. Da lediglich bei einer Messkampagne ein mutagenes Potential unmittelbar nach der Ozonung auftrat, ist ein abschliessender Vergleich der verschiedenen Nachbehandlungsverfahren nicht möglich. In den beiden anderen Messkampagnen konnte mit einer Ausnahme keine Mutagenität detektiert werden: Diese trat bei einer Probe nach Behandlung im Sandfilter (20-fach aufkonzentriert, dritte Messkampagne) auf. Dieses einmalige, aber klare Signal für Mutagenität im Sandfilter ist unerwartet und kann mit den verfügbaren analytischen Daten nicht erklärt werden.

Mit den folgenden Biotests konnte die Leistungsfähigkeit der Ozonung bei der Entfernung von Mikroverunreinigungen gut beurteilt werden: Leuchtbakterientest, kombinierter Algentest und Genexpressionsuntersuchungen mit Regenbogenforellen des *Fish Early Life Stage Toxicity*-Tests. Durch die Behandlung des biologisch gereinigten Abwassers mit Ozon konnten die gemessenen ökotoxikologischen Effekte signifikant verringert werden. Lediglich die histopathologischen Untersuchungen zeigten eine Verschlechterung des Gewebezustands der Leber nach der Ozonung im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle (jedoch auch nach SF, WB, FB und GAK3) und nicht im Vergleich zum NKB. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gegen Testende geringeren Sauerstoffkonzentrationen die Testergebnisse des Fischtests beeinflusst haben.

Insgesamt ist auf Grund der geringen Toxizität des Abwassers nach der Ozonung ein direkter Vergleich der untersuchten Nachbehandlungsverfahren mit den angewandten Methoden nicht abschliessend möglich. Es konnten, wenn überhaupt, nur geringfügige Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Nachbehandlungen detektiert werden. Zwischen den Nachbehandlungen mit rein biologischer Aktivität (Sandfilter (SF), Wirbelbett (WB) und Festbett (FB)) wurden keine Unterschiede detektiert. Bei den Filtern mit biologischer Aktivität und zusätzlicher Elimination der Spurenstoffe über Adsorption an Aktivkohle zeigten der Leuchtbakterientest und der kombinierte Algentest eine geringfügige Verbesserung nach den Behandlungen mit granulierter Aktivkohle (GAK2 und GAK3) an. Dabei verringerte der GAK-Filter mit neuer Aktivkohle (GAK2) (GAK2) die Toxizität in beiden Biotests, die beladene granulierte Aktivkohle (GAK3) aber nur im kombinierten Algentest. Auch die histopathologische Untersuchung zeigte eine Elimination von Toxizität durch GAK2. Die Genexpression der Fische nach GAK2 und dem Festbett war den Fischen in der Kontrolle am ähnlichsten.

Die Ergebnisse aller Biotests zusammenfassend erbrachten die Nachbehandlungen Sandfilter, Wirbelbett und Festbett keine zusätzliche Verbesserung der Wasserqualität des bereits nach der Ozonung wenig toxischen Abwassers. Die Nachbehandlung durch den GAK-Filter mit neuer Aktivkohle (GAK2) bewirkte aufgrund der zusätzlichen Entfernung von Mikroverunreinigungen die grösste Verbesserung. Auch der beladene Aktivkohlefilter (GAK 3) verbesserte geringfügig die Effekte.



## 6 Referenzen

1. Lee, Y. and U. Von Gunten, *Advances in predicting organic contaminant abatement during ozonation of municipal wastewater effluent: Reaction kinetics, transformation products, and changes of biological effects*. Environmental Science: Water Research and Technology, 2016. **2**(3): p. 421-442.
2. Böhler, M., et al., *Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung - ReTREAT, Abschlussbericht für das Bundesamt für Umwelt (BAFU) im Rahmen eines Projektes der Technologieförderung*. 2017, Eawag: Dübendorf.
3. Hummel, D., et al., *Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry*. Environmental Science and Technology, 2006. **40**(23): p. 7321-7328.
4. Musloff, A., et al., *Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters*. Environmental Pollution, 2009. **157**(11): p. 3069-3077.
5. Ternes, T., J. Kormos, and M. Schulz, *Occurrence and fate of pharmaceuticals in the environment*. Toxicology Letters, 2009. **189**, Supplement(0): p. S33.
6. Vogelsang, C., et al., *Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway*. Water Research, 2006. **40**(19): p. 3559-3570.
7. Wick, A., et al., *Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment*. Water Research, 2009. **43**(4): p. 1060-1074.
8. Schwarzenbach, R.P., et al., *The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1072-1077.
9. Ermawati, R., et al., *Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007. **103**(1): p. 27-31.
10. Wert, E.C., et al., *Formation of oxidation byproducts from ozonation of wastewater*. Water Research, 2007. **41**(7): p. 1481-1490.
11. Kienle, C., et al., *Ökotoxikologische Biotests - Anwendung von Biotests zur Evaluation der Wirkung und Elimination von Mikroverunreinigungen*. . Aqua & Gas, 2015. **718**: p. 18-26.
12. Fent, K., *Ökotoxikologie, Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*. 4 ed. 2013, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 377.
13. Abegglen, C., et al., *Ozonung von gereinigtem Abwasser Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf*. 2009, Eawag, Dübendorf. p. 80.
14. Kienle, C., et al., *Evaluation der Ökotoxizität von Kläranlagenabwasser der ARA Basel mit Biotests vor und nach der Anwendung erweiterter Abwasserbehandlungsmethoden*. . 2013, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
15. Kienle, C., R. Kase, and I. Werner, *Evaluation of bioassays and wastewater quality - In vitro and in vivo bioassays for the performance review in the project "Strategy Micropoll"*. 2011, Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
16. Margot, J., et al., *Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon?* Science of the Total Environment, 2013. **461-462**: p. 480-98.
17. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)*. ISO 11350. 2012.
18. Umbuzeiro, G.D.A., et al., *Comparison of the Salmonella/microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2010. **51**(1): p. 31-38.
19. Van der Linden, S.C., et al., *Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress*. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2014. **760**: p. 23-32.
20. Escher, B.I., et al., *Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples*. J Environ Monit, 2008. **10**(5): p. 612-621.



21. Tchounwou, P.B., et al., *Toxicity tests to assess pollutants removal during wastewater treatment and the quality of receiving waters in Argentina*. Environmental Toxicology, 2001. **16**(3): p. 217-224.
22. Magdeburg, A., D. Stalter, and J. Oehlmann, *Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species*. Chemosphere, 2012. **88**(8): p. 1008-14.
23. Stalter, D., A. Magdeburg, and J. Oehlmann, *Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an in vivo test battery*. Water Research, 2010. **44**(8): p. 2610-2620.
24. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. 1992.
25. Hoang, T.C., J.R. Tomasso, and S.J. Klaine, *Influence of water quality and age on nickel toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*)*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004. **23**(1): p. 86-92.
26. Ecotox Centre, *Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays*. 2014. p. 20.
27. Escher, B.I., P.A. Neale, and F.D.L. Leusch, *Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values*. Water Res, 2015. **81**: p. 137-148.
28. Van der Linden, S.C., et al., *Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays*. Environmental Science and Technology, 2008. **42**(15): p. 5814-5820.
29. Gee, P., D.M. Maron, and B.N. Ames, *Detection and classification of mutagens: A set of base-specific Salmonella tester strains*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(24): p. 11606-11610.
30. Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamasaki, *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. Mutat Res, 1975. **31**(6): p. 347-64.
31. Flückiger, S., *Short test report: Ames MPF 98/100 Mutagenicity Assay using Salmonella typhimurium TA98 and TA100*. Study Number: EA00615-1. 2015.
32. Fent, K., *Ökotoxikologie, Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*. 2007, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 338.
33. Richter, M., et al., *Standard Operation Procedure (SOP): Bacterial Bioluminescence Inhibition Test, Determination of the inhibition of light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test, Microtox) by concentrated water samples in 96-Well Microtiter plate*. 2008, Eawag Aquatic Research.
34. Madigan, M., et al., *Brock Biology of Microorganisms (13th Edition)*. 2010: Benjamin Cummings.
35. Escher, B.I., et al., *Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples*. Journal of Environmental Monitoring, 2008. **10**(5): p. 612-621.
36. Escher, B.I., et al., *Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery*. Journal of Environmental Monitoring, 2008. **10**(5): p. 622-631.
37. Schreiber, U., et al., *Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(11): p. 2554-2563.
38. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia. ISO 20665:2008*. 2008.
39. AFNOR, *AFNOR NF T 90-376, Water quality—determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia in 7 days. Population growth inhibition test, A.F.d. Normalisation*, Editor. 2000: Saint Denis.
40. Elendt, B.P. and W.R. Bias, *Trace nutrient deficiency in Daphnia magna cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of D. magna*. Water Research, 1990. **24**(9): p. 1157-1167.
41. Vindimian, E., *REGTOX v. 7.0.5 software*. 2008: Paris, France.
42. West Inc. and D.D. Gulley, *TOXSTAT, version 3.4*, W.E. Technology, Editor. 1994: Cheyenne, WY.



43. Brinkhurst, R.O. and B.G. Jamieson, *Aquatic Oligochaeta of the world*. 1971, Edinburgh, UK: Oliver and Boyd.
44. Drewes, C.D. and C.R. Fournier, *Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganization of escape reflexes in regenerating body fragments*. Dev Biol, 1990. **138**(1): p. 94-103.
45. Christensen, B., *Asexual propagation and reproductive strategies in aquatic Oligochaeta*. Hydrobiologia, 1984. **115**(1): p. 91-95.
46. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 203: Fish, Acute Toxicity Test*. 1992.
47. Vilcinskis, A., *Fische: Mitteleuropäische Süßwasserarten und Meeresfische der Nord- und Ostsee*. 2000: BLV.
48. Pavlov, D. and A. Osinov, *Main Features of Early Ontogeny in Salmonids (Salmoniformes) and Other Representatives of the Protacanthopterygii in Relation to the Phylogeny*. Journal of Ichthyology, 2004. **44**(4): p. 267-283.
49. Thiemann, C., *Advanced wastewater treatment and fish: Investigations of effects in rainbow trout early life stages including histopathological alterations and oxidative stress*, in *Fachbereich Geowissenschaften und Biologie*. 2015, Universität Tübingen.
50. Fux, C., et al., *Weitergehende Abwasserbehandlung durch Zugabe von Pulveraktivkohle und Ozonung auf der ARA Basel*. 2014.
51. Schindler Wildhaber, Y., et al., *Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone*. Water Res, 2015. **75**(0): p. 324-335.
52. Macova, M., et al., *Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration*. Water Res, 2010. **44**(2): p. 477-92.
53. Kienle, C., et al., *Evaluation der Ökotoxizität von Kläranlagenabwasser der ARA Basel mit Biotests vor und nach der Anwendung erweiterter Abwasserbehandlungsmethoden*. 2013, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
54. Kienle, C., et al., *Evaluation der Ökotoxizität von Kläranlagenabwasser der ARA Basel mit Biotests vor und nach der Anwendung erweiterter Abwasserbehandlungsmethoden - Folgeprojekt*. 2013, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
55. Abdi, H., *Holm's sequential Bonferroni procedure*. Encyclopedia of research design, 2010. **1**.
56. Thurston, R.V., et al., *Chronic Toxicity of Ammonia to Rainbow-Trout*. Transactions of the American Fisheries Society, 1984. **113**(1): p. 56-73.
57. Brinkman, S.F., et al., *Chronic Toxicity of Ammonia to Early Life Stage Rainbow Trout*. Transactions of the American Fisheries Society, 2009. **138**(2): p. 433-440.
58. U.S. Environmental Protection Agency, *Final Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria For Ammonia--Freshwater 2013*. 2013, U.S. Environmental Protection Agency.
59. Soderberg, R.W., J.B. Flynn, and H. Schmittou, *Effects of ammonia on growth and survival of rainbow trout in intensive static-water culture*. Transactions of the American Fisheries Society, 1983. **112**(3): p. 448-451.
60. Matthews, K. and N. Berg, *Rainbow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California stream pools*. Journal of Fish Biology, 1997. **50**(1): p. 50-67.
61. Rubin, J.F., *Survival and emergence pattern of sea trout fry in substrata of different compositions*. Journal of Fish Biology, 1998. **53**(1): p. 84-92.
62. Stalter, D., et al., *Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout*. Water Research, 2010. **44**(2): p. 439-448.
63. Hermes-Lima, M., W.G. Willmore, and K.B. Storey, *Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylol orange complex formation*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **19**(3): p. 271-280.
64. Monserrat, J.M., et al., *Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylol orange complex formation*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003. **45**(2): p. 177-183.



65. Cotman, M. and A.Ž. Gotvajn, *Comparison of different physico-chemical methods for the removal of toxicants from landfill leachate*. Journal of Hazardous Materials, 2010. **178**(1-3): p. 298-305.
66. Ratte, M. and H.T. Ratte, *Beurteilung des Effektes von Abwasserbehandlung mittels Ozonung anhand von Toxizitätsparametern aus in vitro- und in vivo-Biotests. Daten aus Projekt „MicroPoll“ (Ozonung von gereinigtem Abwasser), Pilotversuch Regensdorf, Teil: „Effektbasierte Testsysteme mit Aufkonzentrierung“ und „Standardisierte Testverfahren“*. 2009.



## 7 Glossar

ARA	Abwasserreinigungsanlage
CI	<i>Change Index</i>
O <sub>3</sub>	Ozon
BEQ	Bioanalytische Äquivalenzkonzentration
DEQ	Diuron-Äquivalenz-Konzentration
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i> , gelöster organischer Kohlenstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>x</sub>	Wirksame Konzentration ( <i>Effective Concentration</i> ) (oder % der Abwasserprobe) bei welcher x% der Testorganismen einen definierten Effekt zeigen bzw. ein x%-iger Effekt erreicht wird, wobei der Maximaleffekt der Kontrolle bzw. des Standards 100% entspricht.
FB	Festbett
GAK2	unbeladener granulierter Aktivkohlefilter
GAK3	beladener granulierter Aktivkohlefilter
ISO	<i>International Organisation for Standardisation</i>
LC	Letale Konzentration
LOEC	<i>Lowest observed effect concentration</i>
MK	Messkampagne
NOEC	<i>No observed effect concentration</i>
NKB	Nachklärbecken
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PAK	Pulveraktivkohle
PE	Polyethylen
PS II	Photosystem II
RLU	<i>relative light units</i>
S9	Zusatz aus Rattenleberenzymen
SF	Sandfilter
TEQ	Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentration
TA98	<i>Salmonella typhimurium</i> Stamm mit Austausch von DNA Paaren
TA100	<i>Salmonella typhimurium</i> Stamm mit Verschiebung ( <i>Frameshift</i> ) des Lesemusters
VKB	Vorklärbecken
WB	Wirbelbett



## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick über die Pilotanlage auf der ARA Neugut und die verschiedenen Probenahmestellen. ....	3
Abb. 2: Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und EC <sub>50</sub> . ....	5
Abb. 3: Schema des Durchflusssystems. ....	12
Abb. 4: Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern. ....	12
Abb. 5: Ames-Test mit Bakterienstamm TA98: Zahl von Vertiefungen mit Rückmutanten bei verschiedenen Konzentrationen der Proben (A) „Ozonung 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix, (B) „Sandfilter 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix, (C) „Sandfilter 3. Messkampagne“ ohne S9-Mix und (D) „Sandfilter 3. Messkampagne“ mit S9-Mix. ....	17
Abb. 6: Ames-Test mit Bakterienstamm TA100: Zahl von Vertiefungen mit Rückmutanten bei verschiedenen Konzentrationen der Proben (A) „Ozonung 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix und (B) „Sandfilter 1. Messkampagne“ ohne S9-Mix. ....	18
Abb. 7: Leuchtbakterientest: Hemmung der Biolumineszenz (in mg Basis-Toxizitäts-Äquivalenten (mg Basis-TEQ/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen. ....	19
Abb. 8: Leuchtbakterientest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf allgemein toxische Stoffe (Basis-Toxizitäts-Äquivalente, Basis-TEQ). ....	20
Abb. 9: Kombiniertes Algentest: Photosystem II-hemmende Wirkung (in ng Diuron-Äquivalenten (DEQ)/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen. ....	22
Abb. 10: Kombiniertes Algentest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf photosynthesehemmende Stoffe (Diuron-Äquivalente, DEQ). ....	23
Abb. 11: Kombiniertes Algentest: Wachstumshemmung (in mg Basis-Toxizitäts-Äquivalenten (Basis-TEQ)/L) im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen. ....	24
Abb. 12: Kombiniertes Algentest: Eliminationseffizienz der Gesamtreinigungsstufe (A) – und Eliminationseffizienz der Nachbehandlungen nach Ozonung (B) bezogen auf wachstumshemmende Stoffe (Basis-Toxizitäts-Äquivalente, Basis-TEQ). ....	25
Abb. 13: Fortpflanzungstest mit Ceriodaphnia dubia: Populationswachstum nach 7 Tagen Exposition gegenüber Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen (dargestellt in % relativ zur Kontrolle). ....	27
Abb. 14: Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern: Anzahl (in schwarz) und Biomasse (in grau) der Würmer in der Kontrolle und im Abwasser der verschiedenen Reinigungsstufen. ....	29
Abb. 15: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Gemessene Temperaturen in den Testgefäßen über die Testdauer dargestellt (A) je Tag und (B) je Testgefäß. ....	31
Abb. 16: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Während des Tests (Tag 0-96) in den Testgefäßen gemessene physikalisch-chemische Parameter (A) Ammoniumkonzentration und (B) Nitritkonzentration. ....	32
Abb. 17: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Während des Tests gemessene Sauerstoffsättigung (A) Tag 0 - 64 und (B) Tag 65 - 96. ....	33
Abb. 18: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Schlupf der Fische über den relevanten Zeitraum (28-40 Tage) nach Expositionsbeginn. ....	35
Abb. 19: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Überleben der Fische nach Schlupf am Tag 64. ....	36
Abb. 20: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Überleben der Fische nach Schlupf am Tag 96. ....	37
Abb. 21: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: (A) Gewicht, (B) Standardlänge und (C) Gesamtlänge der Fische nach Testende. ....	38
Abb. 22: Semi-quantitative Auswertung der histopathologischen Leberveränderungen bei Regenbogenforellen. ....	40



Abb. 23: Ergebnisse der Biomarker für oxidativen Stress in Lebergewebe von Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.....	42
Abb. 24: Ergebnisse der Biomarker für generelle Stressantwort, Biotransformation und hormonelle Wirkung in Lebergewebe von Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.....	43
Abb. 25: Ergebnisse der Biomarker für verschiedene zelluläre Reaktionen wie Metall-Stress, Immunregulation und pathogene Abwehr und Zellzyklus in Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.....	45
Abb. 26: Hauptkomponenten-Analyse aller getesteten Biomarker in Lebergewebe der Regenbogenforellen auf der ARA Neugut.....	45
Abb. 27: Beispiel einer Induktionskurve des Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstests mit den jeweiligen positiven Referenzsubstanzen sowie die Proben aus Messkampagne 1.....	65



## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über im Projekt ReTREAT durchgeführte Biotests .....	6
Tab. 2: Definition der Mutagenität im Ames-Test.....	8
Tab. 3: Sollbereich der physikalisch-chemischen Parameter für rekonstituiertes Wasser. ....	11
Tab. 4: Glanzwurm-Fortpflanzungstest: Expositionsbedingungen.....	13
Tab. 5: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Expositionsbedingungen. 14	
Tab. 6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den Gentox (p53)-CALUX®- Rezeptorbindungstest. ....	16
Tab. 7: Übersicht des Auftretens von Mutagenität bei den verschiedenen Reinigungsstufen nach 20facher Anreicherung im Ames-Test.....	18
Tab. 8: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für den Leuchtbakterientest. ....	19
Tab. 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Photosystem II-Hemmung im kombinierten Algentest.....	21
Tab. 10: Fortpflanzungstest mit Ceriodaphnia dubia: Reproduktionshemmende Effekte der verschiedenen Abwässer relativ zur Kontrolle. ....	28
Tab. 11: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Validitätskriterien der OECD 210 [24] während 64 Tagen.....	30
Tab. 12: Farbliche Darstellung der gemessenen Sauerstoffsättigung (%) in den Testgefäßen während der Exposition der Fische. Grüne Felder zeigen Werte $\geq 80\%$ , gelbe Felder $< 80\%$ und $\geq 60\%$ und rote Felder $< 60\%$ . ....	34
Tab. 13: Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Zusammenfassung der untersuchten biologischen Endpunkte. ....	34
Tab. 14: Liste der ausgewählten Biomarker-Gene, und die dazugehörige zelluläre Funktion. ...	41
Tab. 15: Change Indices (CI) für in vitro- und in vivo-Biotests der kombinierten Reinigungsstufen.....	49
Tab. 16: Change Indices (CI) für in vitro- und in vivo-Biotests der Nachbehandlungen. ....	50
Tab. 17: Change Indices (CI) der kombinierten Reinigungsstufen für in vivo-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut. ....	52
Tab. 18: Change Indices (CI) der Nachbehandlungen für in vivo-Biotests im Durchfluss auf der ARA Neugut.....	53
Tab. 19: Anreicherungsfaktoren der Abwasserproben für die in vitro-Biotests im Labor.....	64
Tab. 20: Festphasenextraktion für Biotests (nach Escher et al., 2008b): Überblick über die Arbeitsschritte der für die biologische Analytik von allgemein toxischen, mutagenen und Photosystem II-hemmenden Substanzen verwendeten Probenaufbereitungsmethode.....	64
Tab. 21: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA100 ohne S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	66
Tab. 22: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA100 mit S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	66
Tab. 23: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA98 ohne S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	67
Tab. 24: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA98 mit S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index für die jeweiligen Reinigungsstufen. .....	67
Tab. 25: Leuchtbakterientest, allgemeine Toxizität: Basis-Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentration, Basis-TEQ (mg/L), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	68
Tab. 26: Raphidocelis subcapitata, Photosynthesehemmung nach 2h: Diuron-Äquivalenz- Konzentrationen, DEQ (ng/L, SD unterhalb), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	69
Tab. 27: Raphidocelis subcapitata, Wachstumshemmung nach 24h: Basis-Toxizitäts- Äquivalenz-Konzentrationen, Basis-TEQ (mg/L, SD unterhalb), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen. ....	70



Tab. 28: <i>Ceriodaphnia dubia</i> , Reproduktion nach 7 d: Effektive Konzentration von Abwasser bei der 20% der Organismen beeinträchtigt sind ( $EC_{20}$ , %) für die Nachkommenzahl und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	71
Tab. 29: <i>Lumbriculus variegatus</i> , Reproduktion nach 28 d: Mittelwert mit Standardabweichung (SD) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen bezogen auf die Anzahl (A) und die Biomasse (B) der Würmer .....	72
Tab. 30: <i>Oncorhynchus mykiss</i> , Überleben und Entwicklungsparameter: Mittelwert ( $\pm$ SD unterhalb) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.....	73
Tab. 31: Fortpflanzungstest mit <i>Ceriodaphnia dubia</i> : Zusammenfassung der untersuchten biologischen Endpunkte. ....	74



## Anhang 1 Hintergrundinformation zur Probenaufbereitung

### Probenaufbereitung für Biotests mit aufkonzentrierten Proben

**Tab. 19: Anreicherungs-faktoren der Abwasserproben für die *in vitro*-Biotests im Labor.**

<sup>1,2,3</sup>: 1., 2. und 3. Messkampagne. VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.

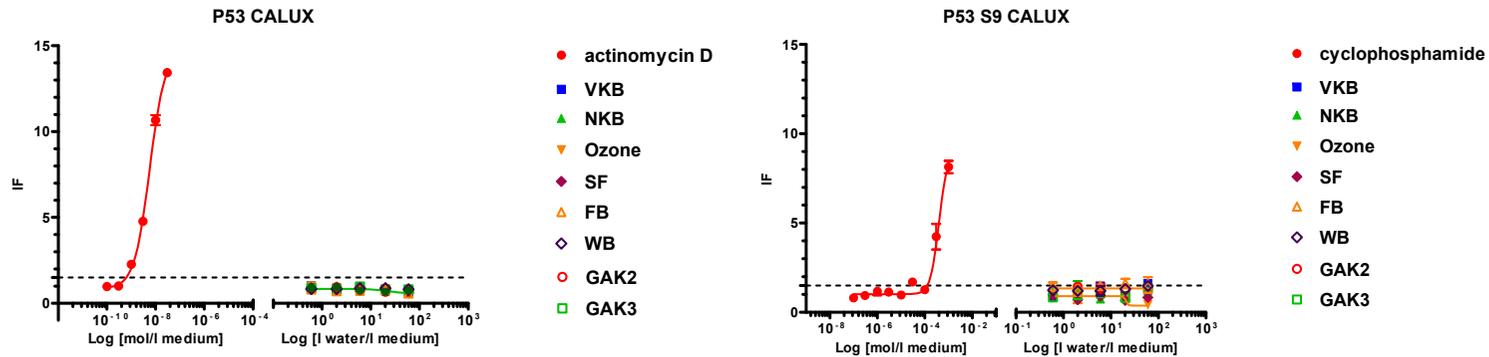
	VKB	NKB	OZ	FB	WB	GAK2	GAK3
<b>Ames-Test</b>	-	0.625-20	0.625-20	0.625-20	0.625-20	0.625-20	0.625-20
<b>Leuchtbakteri-entest</b>	25	125	167	167	167	167	167
<b>Kombinierter Algentest mit Grünalgen</b>	27 <sup>1</sup> , 40 <sup>2</sup> , 53 <sup>3</sup>	100 <sup>1</sup> , 117 <sup>2</sup> , 133 <sup>3</sup>	133 <sup>1,2,3</sup>				

**Tab. 20: Festphasenextraktion für Biotests (nach Escher et al., 2008b): Überblick über die Arbeitsschritte der für die biologische Analytik von allgemein toxischen, mutagenen und Photosystem II-hemmenden Substanzen verwendeten Probenaufbereitungsmethode.**

<b>Allgemeine Informationen</b>	
<b>Probentyp</b>	Wasserproben
<b>Probenvolumina</b>	500 mL Abwasserablauf
<b>Leerprobe/Blank</b>	500 mL Reinstwasser
<b>Probenvorbereitung</b>	
<b>Filtration</b>	Ja, z.B. mit Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm) (Millipore)
<b>Ansäuerung</b>	ja, mit HCl auf pH 3
<b>Addierung von Isotopenmarkierter interner Mischstandardlösung (IS)</b>	Nein, zur Kontrolle der Wiederfindung in der SPE Standardadditionen möglich
<b>Probenaufbereitung</b>	
<b>Anreicherung</b>	Festphasenextraktion (SPE)
<b>SPE Kartuschen</b>	LiChrolut EN RP-18 (100 mg LiChrolut EN unten, 200 mg LiChrolut RP 18 oben) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
<b>Konditionierung</b>	2 mL Hexan 2 mL Aceton 6 mL Methanol 6 mL Reinstwasser (pH 3.0)
<b>Waschen</b>	Nein, nur Auffüllen der Kartusche mit Reinstwasser (pH 3.0)
<b>Elution</b>	4 mL Aceton 1 mL Methanol
<b>Einengen</b>	mit N <sub>2</sub> auf ca. 500 µl einengen, dann auf 1000 µl mit Ethanol auffüllen
<b>Anreicherungs-faktor</b>	500-fach Abwasserablauf
<b>Lagerung</b>	Dunkel, bei -20°C



## Anhang 2 Beispiel für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen



**Abb. 27: Beispiel einer Induktionskurve des Gentox (p53)-CALUX®-Rezeptorbindungstests mit den jeweiligen positiven Referenzsubstanzen sowie die Proben aus Messkampagne 1.**

IF: Induktionsfaktor (gemessene Relative Licht Einheit [RLU] / durchschnittliche RLU der Lösungsmittelkontrolle (DMSO)). Proben wurden als positiv eingestuft wenn eine über 1.5x Induktion gegenüber der Negativkontrolle auftrat. Gestrichelte Linie stellt das cut off-Kriterium dar. VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, Ozone: Ozonung, SF: Sandfilter, WB: Wirbelbett, FB: Festbett, GAK2: unbeladene granulierten Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK.



### Anhang 3 Tabellen mit Ergebnissen der *in vitro*- und *in vivo*-Biotests

**Tab. 21: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA100 ohne S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK. >2fache Induktion über Basislinie = Mutagen (in rot), CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

(\*) Bei einem xfachen Induktionswert < 2, ist keine numerische Angabe des CI und der Elimination möglich. Deshalb werden Veränderungen folgendermassen angegeben: ↓\* (relative Abnahme des Effekts / Verbesserung) und ↑\* (relative Zunahme des Effekts / Verschlechterung).

Datum	Ozon (xfache Induktion)	Ozon + SF (xfache Induktion)	Elimination SF %	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (xfache Induktion)	Elimination Ozon + FB %	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (xfache Induktion)	Elimination WB %	Auswirkung WB (CI)	Ozon + GAK2 (xfache Induktion)	Elimination GAK2 %	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (xfache Induktion)	Elimination GAK3 %	Auswirkung GAK3 (CI)
02.-03.02.15	4.04	2.23	45%	1.81	0.94	*	↓*	1.46	*	↓*	0.94	*	↓*	0.52	*	↓*
09.-10.03.15	1.18	1.24	*	*	0.98	*	*	0.98	*	*	1.11	*	*	0.92	*	*
14.-15.04.15	1.49	1.49	*	*	0.85	*	*	1.49	*	*	1.59	*	*	1.27	*	*

**Tab. 22: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA100 mit S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK. >2fache Induktion über Basislinie = Mutagen (in rot), CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

(\*) Bei einem xfachen Induktionswert < 2, ist keine numerische Angabe des CI und der Elimination möglich. Deshalb werden Veränderungen folgendermassen angegeben: ↓\* (relative Abnahme des Effekts / Verbesserung) und ↑\* (relative Zunahme des Effekts / Verschlechterung).

Datum	Ozon (xfache Induktion)	Ozon + SF (xfache Induktion)	Elimination SF %	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (xfache Induktion)	Elimination Ozon + FB %	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (xfache Induktion)	Elimination WB %	Auswirkung WB (CI)	Ozon + GAK2 (xfache Induktion)	Elimination GAK2 %	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (xfache Induktion)	Elimination GAK3 %	Auswirkung GAK3 (CI)
02.-03.02.15	0.60	0.60	*	*	0.77	*	*	0.51	*	*	0.85	*	*	0.68	*	*
09.-10.03.15	0.69	0.69	*	*	0.08	*	*	1.08	*	*	0.54	*	*	0.39	*	*
14.-15.04.15	0.56	0.35	*	*	0.49	*	*	0.14	*	*	0.49	*	*	0.42	*	*



**Tab. 23: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA98 ohne S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK. >2fache Induktion über Basislinie = Mutagen (in rot), CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

(\*) Bei einem xfachen Induktionswert < 2, ist keine numerische Angabe des CI und der Elimination möglich. Deshalb werden Veränderungen folgendermassen angegeben: ↓\* (relative Abnahme des Effekts / Verbesserung) und ↑\* (relative Zunahme des Effekts / Verschlechterung).

Datum	Ozon (xfache Induktion)	Ozon + SF (xfache Induktion)	Elimination SF	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (xfache Induktion)	Elimination Ozon + FB	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (xfache Induktion)	Elimination WB	Auswirkung WB (CI)	Ozon + GAK2 (xfache Induktion)	Elimination GAK2	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (xfache Induktion)	Elimination GAK3	Auswirkung GAK3 (CI)
02.-03.02.15	2.02	1.82	*	*	1.01	*	↓*	1.01	*	↓*	1.01	*	↓*	0.00	*	↓*
09.-10.03.15	0.48	1.14	*	*	0.90	*	*	0.83	*	*	0.45	*	*	0.97	*	*
14.-15.04.15	1.61	3.82	*	↑*	0.60	*	*	0.40	*	*	0.60	*	*	0.40	*	*

**Tab. 24: Ames-Test, mutagene Wirkung mit Bakterienstamm TA98 mit S9-Mix: xfache Induktion über Basislinie, Eliminationseffizienz (%) und Change Index für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle., GAK3: vorbeladene GAK. >2fache Induktion über Basislinie = Mutagen (in rot), CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

(\*) Bei einem xfachen Induktionswert < 2, ist keine numerische Angabe des CI und der Elimination möglich. Deshalb werden Veränderungen folgendermassen angegeben: ↓\* (relative Abnahme des Effekts / Verbesserung) und ↑\* (relative Zunahme des Effekts / Verschlechterung).

Datum	Ozon (xfache Induktion)	Ozon + SF (xfache Induktion)	Elimination SF	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (xfache Induktion)	Elimination Ozon + FB	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (xfache Induktion)	Elimination WB	Auswirkung WB (CI)	Ozon + GAK2 (xfache Induktion)	Elimination GAK2	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (xfache Induktion)	Elimination GAK3	Auswirkung GAK3 (CI)
02.-03.02.15	0.57	1.02	*	*	0.11	*	*	0.68	*	*	0.23	*	*	0.34	*	*
09.-10.03.15	0.69	0.39	*	*	1.28	*	*	0.59	*	*	0.44	*	*	0.54	*	*
14.-15.04.15	1.04	1.38	*	*	0.52	*	*	0.17	*	*	0.17	*	*	1.21	*	*



**Tab. 25: Leuchtbakterientest, allgemeine Toxizität: Basis-Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentration, Basis-TEQ (mg/L), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle,, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett. CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

Datum	VKB (mg Basis- TEQ/L)	NKB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Biologie	Auswirkung Biologie (CI)	Ozon (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK2 (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + GAK2	Auswirkung Ozon + GAK2 (CI)	Elimination GAK2	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + GAK3	Auswirkung Ozon + GAK3 (CI)	Elimination GAK3	Auswirkung GAK3 (CI)	Gesamt- elimination Ozon	Gesamt- elimination Ozon + GAK2	Gesamt- elimination Ozon + GAK3
<b>02.-03.02.15</b>	10.87	1.28	88%	8.51	0.34	73%	3.72	0.34	74%	3.77	1%	1.01	0.45	65%	2.84	-31%	0.76	97%	97%	96%
±	0.46	0.07			0.01			0.01					0.02							
<b>09.-10.03.15</b>	19.75	0.48	98%	40.84	0.14	71%	3.48	0.08	83%	5.80	40%	1.67	0.11	77%	4.28	19%	1.23	99%	100%	99%
±	1.07	0.09			0.02			0.01					0.00							
<b>14.-15.04.15</b>	29.61	1.15	96%	25.65	0.53	54%	2.17	0.25	78%	4.61	53%	2.12	0.26	77%	4.42	51%	2.03	98%	99%	99%
±	1.62	0.11			0.05			0.03					0.02							
<b>Mittelwert</b>	20.08	0.97	94%	20.65	0.34	66%	2.88	0.22	78%	4.34	31%	1.51	0.27	73%	3.54	13%	1.23	98%	99%	98%
<b>SD</b>	9.37	0.43	5%		0.20	11%		0.13	5%		27%		0.17	7%		41%		1%	1%	2%

Datum	Ozon+SF (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + SF	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Elimination SF	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + FB	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Elimination FB	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + WB	Auswirkung Ozon + WB (CI)	Elimination WB	Auswirkung WB (CI)	Gesamt- elimination Ozon + SF	Gesamt- elimination Ozon + FB	Gesamt- elimination Ozon + WB
<b>02.-03.02.15</b>	0.32	75%	3.99	7%	1.07	0.49	62%	2.60	-43%	0.70	0.51	60%	2.51	-48%	0.68	97%	95%	95%
±	0.05					0.03					0.01							
<b>09.-10.03.15</b>	0.22	55%	2.22	-56%	0.64	0.17	64%	2.78	-25%	0.80	0.16	66%	2.97	-17%	0.85	99%	99%	99%
±	0.03					0.02					0.00							
<b>14.-15.04.15</b>	0.42	64%	2.76	21%	1.27	0.42	63%	2.74	21%	1.26	0.37	68%	3.10	30%	1.43	99%	99%	99%
±	0.05					0.07					0.01							
<b>Mittelwert</b>	0.32	65%	3.05	-9%	1.06	0.36	63%	2.68	-16%	0.93	0.35	65%	2.79	-12%	0.97	98%	98%	98%
<b>SD</b>	0.10	10%		41%		0.17	1%		33%		0.17	4%		39%		1%	2%	2%



**Tab. 26: *Raphidocelis subcapitata*, Photosynthesehemmung nach 2h: Diuron-Äquivalenz-Konzentrationen, DEQ (ng/L, SD unterhalb), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett. CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

Datum	VKB (ng DEQ/L)	NKB (ng DEQ/L)	Elimination Biologie	Auswirkung Biologie (CI)	Ozon (ng DEQ/L)	Elimination Ozon	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK2 (ng DEQ/L)	Elimination Ozon + GAK2	Auswirkung Ozon + GAK2 (CI)	Elimination GAK2	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (ng DEQ/L)	Elimination Ozon + GAK3	Auswirkung Ozon + GAK3 (CI)	Elimination GAK3	Auswirkung GAK3 (CI)	Gesamt- elimination Ozon	Gesamt- elimination Ozon + GAK2	Gesamt- elimination Ozon + GAK3
02.-03.02.15	286.10	55.79	80%	5.13	8.58	85%	6.50	3.63	93%	15.37	58%	2.36	7.44	87%	7.50	13%	1.15	97%	99%	97%
±	19.07	1.05			0.79			0.22					0.21							
09.-10.03.15	70.67	43.25	39%	1.63	6.39	85%	6.77	2.15	95%	20.08	66%	2.97	4.69	89%	9.22	27%	1.36	91%	97%	93%
±	0.41	0.97			0.14			0.19					0.23							
14.-15.04.15	138.38	73.94	47%	1.87	21.33	71%	3.47	5.44	93%	13.59	74%	3.92	10.31	86%	7.17	52%	2.07	85%	96%	93%
±	16.94	3.57			0.25			0.26					0.60							
<b>Mittelwert</b>	165.05	57.66	<b>55%</b>	<b>2.86</b>	<b>12.10</b>	<b>80%</b>	<b>4.77</b>	<b>3.74</b>	<b>94%</b>	<b>15.41</b>	<b>66%</b>	<b>3.23</b>	<b>7.48</b>	<b>87%</b>	<b>7.71</b>	<b>31%</b>	<b>1.62</b>	<b>91%</b>	<b>97%</b>	<b>94%</b>
<b>SD</b>	110.17	15.43	22%		8.07	8%		1.65	1%		8%		2.81	2%		19%		6%	1%	3%

Datum	Ozon+SF (ng DEQ/L)	Elimination Ozon + SF	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Elimination SF	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (ng DEQ/L)	Elimination Ozon + FB	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Elimination FB	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (ng DEQ/L)	Elimination Ozon + WB	Auswirkung Ozon + WB (CI)	Elimination WB	Auswirkung WB (CI)	Gesamt- elimination Ozon + SF	Gesamt- elimination Ozon + FB	Gesamt- elimination Ozon + WB
02.-03.02.15	12.09	78%	4.61	-41%	0.71	8.48	85%	6.58	1%	1.01	9.80	82%	5.69	-14%	0.88	96%	97%	97%
±	0.84					0.36					1.01							
09.-10.03.15	8.54	80%	5.06	-34%	0.75	6.87	84%	6.29	-8%	0.93	8.16	81%	5.30	-28%	0.78	88%	90%	88%
±	0.97					1.25					0.45							
14.-15.04.15	25.01	66%	2.96	-17%	0.85	17.74	76%	4.17	17%	1.20	21.64	71%	3.42	-1%	0.99	82%	87%	84%
±	2.96					0.33					0.68							
<b>Mittelwert</b>	<b>15.22</b>	<b>75%</b>	<b>3.79</b>	<b>-31%</b>	<b>0.80</b>	<b>11.03</b>	<b>82%</b>	<b>5.23</b>	<b>3%</b>	<b>1.10</b>	<b>13.20</b>	<b>78%</b>	<b>4.37</b>	<b>-14%</b>	<b>0.92</b>	<b>89%</b>	<b>91%</b>	<b>90%</b>
<b>SD</b>	8.67	8%		12%		5.86	5%		12%		7.36	6%		13%		7%	5%	6%



**Tab. 27: *Raphidocelis subcapitata*, Wachstumshemmung nach 24h: Basis-Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentrationen, Basis-TEQ (mg/L, SD unterhalb), Eliminationseffizienz (%) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett. CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

Datum	VKB (mg Basis- TEQ/L)	NKB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Biologie	Auswirkung Biologie (CI)	Ozon (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK2 (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + GAK2	Auswirkung Ozon + GAK2	Elimination GAK2	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK3 (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + GAK3	Auswirkung Ozon + GAK3	Elimination GAK3	Auswirkung GAK3 (CI)	Gesamt- elimination Ozon	Gesamt- elimination Ozon + GAK2	Gesamt- elimination Ozon + GAK3
02.-03.02.15	58.39	7.41	87%	7.88	1.78	76%	4.17	0.72	90%	10.34	60%	2.48	1.20	84%	6.16	32%	1.48	97%	99%	98%
±	2.31	0.92			0.49			0.06					0.16							
09.-10.03.15	9.05	2.08	77%	4.35	0.00	-	-	0.13	94%	16.20	-	-	0.00	-	-	-	-	-	99%	-
±	1.12	0.07			0.00			0.05					0.00							
14.-15.04.15	51.41	4.04	92%	12.73	1.21	70%	3.33	1.46	64%	2.76	-21%	0.83	1.56	61%	2.59	-29%	0.78	98%	97%	97%
±	8.27	0.18			0.18			0.14					0.09							
Mittelwert	39.62	4.51	85%	8.78	1.00	73%	4.53	0.77	83%	5.86	19%	1.30	0.92	73%	4.89	2%	1.08	97%	98%	97%
SD	26.70	2.70	8%		0.91	4%		0.67	16%		57%		0.82	16%		43%		0%	1%	1%

Datum	Ozon+SF (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + SF	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Elimination SF	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + FB	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Elimination FB	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (mg Basis- TEQ/L)	Elimination Ozon + WB	Auswirkung Ozon + WB	Elimination WB	Auswirkung WB (CI)	Gesamt- elimination Ozon + SF	Gesamt- elimination Ozon + FB	Gesamt- elimination Ozon + WB
02.-03.02.15	1.06	86%	6.99	40%	1.68	1.55	79%	4.77	13%	1.15	0.67	91%	11.13	63%	2.67	98%	97%	99%
±	0.32					0.15					0.09							
09.-10.03.15	0.25	88%	8.25	-	-	0.01	99%	181.75	-	-	0.21	90%	9.73	-	-	97%	100%	98%
±	0.02										0.06							
14.-15.04.15	1.24	69%	3.25	-3%	0.98	1.23	70%	3.29	-1%	0.99	1.98	51%	2.04	-63%	0.61	98%	98%	96%
±	0.13					0.05					1.05							
Mittelwert	0.85	81%	5.30	19%	1.17	0.93	83%	4.85	6%	1.07	0.95	77%	4.73	0%	1.05	98%	98%	98%
SD	0.53	10%		30%		0.81	15%		10%		0.92	23%		89%		0%	1%	1%



**Tab. 28: Ceriodaphnia dubia, Reproduktion nach 7 d: Effektive Konzentration von Abwasser bei der 20% der Organismen beeinträchtigt sind (EC<sub>20</sub>, %) für die Nachkommenzahl und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NBK: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett. CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün). MSD : minimum significant difference (d.h. soviel % muss der Unterschied in den EC<sub>20</sub>-Werten mindestens betragen, damit die Effekte signifikant sind).

Datum	VKB (EC <sub>20</sub> ) (%)	NBK (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ozon (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon (CI)	Ozon + GAK 2 (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon + GAK2 (CI)	Ausw irkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK 3 (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon + GAK3 (CI)	Ausw irkung GAK3 (CI)
02.-03.02.15	n.m.	110.00	110.00	1.00	110.0	1.00	1.00	110.0	1.00	1.00
MSD		14.80	13.70		11.40			11.30		
09.-10.03.15	n.m.	110.00	70.80	0.64	110.00	1.00	1.55	67.00	1.64	0.95
MSD		15.10	9.60		11.20			10.30		
14.-15.04.15	n.m.	110.00	110.00	1.00	110.00	1.00	1.00	110.00	1.00	1.00
MSD		11.20	7.90		7.30			9.50		
Mittelwert		110.00	96.93	0.88	110.00	1.00	1.13	95.67	1.15	0.99

Datum	Ozon+SF (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon + SF (CI)	Ausw irkung SF (CI)	Ozon + FB (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon + FB (CI)	Ausw irkung FB (CI)	Ozon + WB (EC <sub>20</sub> ) (%)	Ausw irkung Ozon + WB (CI)	Ausw irkung WB (CI)
02.-03.02.15	110.00	1.00	1.00	110.0	1.00	1.00	110.0	1.00	1.00
MSD	13.20			11.30			17.50		
09.-10.03.15	80.80	0.73	1.14	74.50	0.68	1.05	60.00	0.55	0.85
MSD	10.70			11.20			9.30		
14.-15.04.15	110.00	1.00	1.00	93.30	0.85	0.85	110.00	1.00	1.00
MSD	9.30			11.30			8.90		
Mittelwert	100.27	0.91	1.03	92.60	0.84	0.96	93.33	0.85	0.96



**Tab. 29: Lumbriculus variegatus, Reproduktion nach 28 d: Mittelwert mit Standardabweichung (SD) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen bezogen auf die Anzahl (A) und die Biomasse (B) der Würmer**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett. CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

A	Kontrolle (Anzahl Würmer)	NKB (Anzahl Würmer)	Ozon (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK 2 (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon + GAK2 (CI)	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK 3 (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon + GAK3 (CI)	Auswirkung GAK3 (CI)
<b>Datum</b>	21.17	15.50	18.83	1.22	17.67	1.14	0.94	15.83	0.98	0.84
<b>SD</b>	5.34	4.89	1.47		2.58			3.76		
<b>Prozentualer Anteil</b>	100	73	89		83			75		

	Ozon+SF (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (Anzahl Würmer)	Auswirkung Ozon + WB (CI)	Auswirkung WB (CI)
<b>Datum</b>	18.67	1.20	0.99	20.83	1.34	1.11	18.00	1.16	0.96
<b>SD</b>	3.14			4.67			4.53		
<b>Prozentualer Anteil</b>	88			98			85		

B	Kontrolle (mg)	NKB (mg)	Ozon (mg)	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK 2 (mg)	Auswirkung Ozon + GAK2 (CI)	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK 3 (mg)	Auswirkung Ozon + GAK3 (CI)	Auswirkung GAK3 (CI)
<b>Datum</b>	37.40	36.85	41.12	1.12	42.67	1.16	1.04	43.30	0.85	1.05
<b>SD</b>	3.80	4.27	8.70		9.59			7.90		
<b>Prozentualer Anteil</b>	100	99	110		114			116		

	Ozon+SF (mg)	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB (mg)	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB (mg)	Auswirkung Ozon + WB (CI)	Auswirkung WB (CI)
<b>Datum</b>	36.20	0.98	0.88	45.25	1.23	1.10	41.76	1.13	1.02
<b>SD</b>	2.47			9.53			5.91		
<b>Prozentualer Anteil</b>	97			121			112		



**Tab. 30: *Oncorhynchus mykiss*, Überleben und Entwicklungsparameter: Mittelwert (± SD unterhalb) und Change Index (CI) für die jeweiligen Reinigungsstufen.**

VKB: Vorklärbecken, NKB: Nachklärbecken, biologische Reinigung, GAK2: unbeladene granulierte Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett.  
 CI < 0.75 zunehmende Wirkung (in rot), 0.75 ≤ CI ≤ 1.25 gleichbleibende Wirkung (in grau), CI > 1.25 abnehmende Wirkung (in grün).

Parameter		Kontrolle	NKB	Ozon	Auswirkung Ozon (CI)	Ozon + GAK 2	Auswirkung Ozon + GAK2 (CI)	Auswirkung GAK2 (CI)	Ozon + GAK 3	Auswirkung Ozon + GAK3 (CI)	Auswirkung GAK3 (CI)
Gesamt-Überlebensrate (%) 64d	Mittelwert	97.5	93.3	85.6	0.92	93.3	1.00	1.09	91.1	1.02	1.06
	SD	1.7	3.3	10.7		3.3			7.7		
Überleben der Embryonen (%)	Mittelwert	100.0	95.6	84.4	0.88	93.3	0.98	1.11	97.8	0.98	1.16
	SD	0.0	7.7	3.8		6.7			3.8		
Schlupf (%)	Mittelwert	100.0	97.8	91.1	0.93	96.7	0.99	1.06	96.7	1.01	1.06
	SD	0.0	3.1	1.6		2.7			2.7		
Überleben nach Schlupf (%) 64 d	Mittelwert	97.5	95.5	92.6	0.97	96.6	1.01	1.04	92.1	1.04	0.99
	SD	1.7	1.9	9.8		3.4			7.0		
Aufschwimmen (%)	Mittelwert	98.3	95.5	93.9	0.98	95.4	1.00	1.02	92.1	1.04	0.98
	SD	1.9	1.9	7.7		5.3			5.1		
Frischgewicht der Larven bei Testende (g)	Mittelwert	0.92	0.89	0.91	1.03	0.94	1.06	1.03	0.93	0.96	1.02
	SD	0.03	0.02	0.06		0.01			0.02		
	(%)	100.0	95.5	93.9		102.9			101.1		
Standard-Länge der Larven bei Testende (cm)	Mittelwert	3.82	3.73	3.77	1.01	3.85	1.03	1.02	3.84	0.97	1.02
	SD	0.05	0.03	0.06		0.02			0.06		
	(%)	100.0	97.6	98.8		100.8			100.5		
Gesamt-Länge der Larven bei Testende (cm)	Mittelwert	4.4	4.3	4.4	1.01	4.5	1.02	1.01	4.44	0.98	1.01
	SD	0.1	0.0	0.1		0.0			0.06		
	(%)	100.0	99.7	100.7		102.1			101.7		

Parameter		Ozon+SF	Auswirkung Ozon + SF (CI)	Auswirkung SF (CI)	Ozon + FB	Auswirkung Ozon + FB (CI)	Auswirkung FB (CI)	Ozon + WB	Auswirkung Ozon + WB (CI)	Auswirkung WB (CI)
Gesamt-Überlebensrate (%) 64d	Mittelwert	98.9	1.06	1.16	87.8	0.94	1.03	87.8	0.94	1.03
	SD	1.9			5.1			10.2		
Überleben der Embryonen (%)	Mittelwert	97.8	1.02	1.16	93.3	0.98	1.11	93.3	0.98	1.10
	SD	3.8			6.7			6.7		
Schlupf (%)	Mittelwert	98.9	1.01	1.09	94.4	0.97	1.04	94.4	0.97	1.04
	SD	1.6			5.7			5.7		
Überleben nach Schlupf (%) 64 d	Mittelwert	97.8	1.02	1.06	90.8	0.95	0.98	92.8	0.97	1.00
	SD	1.9			2.2			6.3		
Aufschwimmen (%)	Mittelwert	98.9	1.04	1.05	90.8	0.95	0.97	92.8	0.97	0.99
	SD	1.9			2.2			4.1		
Frischgewicht der Larven bei Testende (g)	Mittelwert	0.92	1.04	1.01	0.92	1.04	1.01	0.95	1.07	1.04
	SD	0.01			0.02			0.03		
	(%)	100.7			100.9			103.5		
Standard-Länge der Larven bei Testende (cm)	Mittelwert	3.82	1.02	1.01	3.81	1.02	1.01	3.87	1.04	1.03
	SD	0.02			0.03			0.04		
	(%)	100.0			99.7			101.4		
Gesamt-Länge der Larven bei Testende (cm)	Mittelwert	4.5	1.03	1.02	4.44	1.02	1.01	4.48	1.03	1.02
	SD	0.0			0.04			0.04		
	(%)	102.3			101.7			102.6		



## Anhang 4 Fortpflanzungstest mit *Ceriodaphnia dubia*

**Tab. 31: Fortpflanzungstest mit *Ceriodaphnia dubia*: Zusammenfassung der untersuchten biologischen Endpunkte.**

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. n.a. nicht anwendbar, MSD: Minimal significant difference, MK Messkampagne. NKB: Nachklärbecken = biologische Reinigung, SF: Sandfilter, FB: Festbett, WB: Wirbelbett, GAK2: unbeladene granuliert Aktivkohle, GAK3: vorbeladene GAK. Orange Felder bezeichnen Behandlungen bei der ein schwacher reproduktionshemmender Effekt detektiert wurde.

		Kontrolle	NKB	Ozon	SF	FB	WB	GAK2	GAK3
Replikate (n)		24	12	12	12	12	12	12	12
Überleben der Mütter (%)	1. MK	100	100	100	100	100	100	100	100
	2. MK	100	100	100	100	100	100	100	100
	3. MK	100	100	100	100	100	100	100	100
Anzahl der Nachkommen/ Mutter (n, bei 90% Abwasser)	1. MK	17.6 $\pm$ 3.0	18.6 $\pm$ 2.2	17.6 $\pm$ 2.3	17.2 $\pm$ 1.9	20.4 $\pm$ 2.4	16.2 $\pm$ 5.1	17.5 $\pm$ 2.4	16.6 $\pm$ 1.9
	2. MK	16.7 $\pm$ 2.5	16.8 $\pm$ 2.4	11.0 $\pm$ 0.9	12.4 $\pm$ 2.8	11.8 $\pm$ 1.9	13.5 $\pm$ 1.1	15.6 $\pm$ 2.0	11.8 $\pm$ 1.5
	3. MK	19.2 $\pm$ 1.7	18.3 $\pm$ 3.4	21.5 $\pm$ 1.6	18.7 $\pm$ 1.2	16.4 $\pm$ 3.9	18.1 $\pm$ 3.1	20.9 $\pm$ 2.2	20.6 $\pm$ 1.9
Wachstum der Population (%)	1. MK	100	105.4	99.8	97.4	115.8	91.7	99.3	94.1
	2. MK	100	101.0	66.0	74.5	70.5	82.5	93.5	70.5
	3. MK	100	95.0	111.9	97.2	85.5	94.1	108.9	107.2
Hemmung der Reproduktion (%)	1. MK	0	-5.4	0.2	2.6	-15.8	8.3	0.7	5.9
	2. MK	0	-1.0	34.0	25.5	29.5	17.5	6.5	29.5
	3. MK	0	5.0	-11.9	2.8	14.5	5.9	-8.9	-7.2
No observed effect concentration (NOEC)	1. MK	n.a.	90% (MSD: 14,8%)	90% (MSD: 13.7%)	90% (MSD: 13.2%)	90% (MSD: 11.3%)	90% (MSD: 17.5%)	90% (MSD: 11.4%)	90% (MSD: 11.2%)
	2. MK	n.a.	90% (MSD: 15.1%)	<11.25% (MSD: 9.6%)	40% (MSD: 10.7%)	40% (MSD: 11.2%)	<20% (MSD: 9.3%)	90% (MSD: 11.2%)	40% (MSD: 10.3%)
	3. MK	n.a.	90% (MSD: 11.2%)	90% (MSD: 7.9%)	90% (MSD: 9.3%)	>20% (MSD: 11.3%)	90% (MSD: 8.9%)	90% (MSD: 7.3%)	90% (MSD: 9.5%)
Lowest observed effect concentration (LOEC)	1. MK	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2. MK	n.a.	n.a.	11.25	60.0	60	20	n.a.	60
	3. MK	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	90	n.a.	n.a.	n.a.



## Anhang 5 Fish Early Life Stage Toxicity-Test mit Regenbogenforellen

### Physikalisch-chemische Parameter

Behandlung	pH			Temperatur (°C) während Periode mit Sollwert 10°C				Temperatur (°C) während Periode mit Sollwert 12°C			
	Minimum	Maximum	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	n
Kontrolle	7.1	8.1	60	10.2	8.7	12.3	148	12.9	11.6	15.6	236
NKB	7.6	8.3	45	10.1	9.1	11.2	105	12.6	11.5	15.8	177
Ozon	7.7	8.4	45	10.1	9.1	11.4	105	12.6	11.2	15.7	177
SF	7.7	8.4	45	10.1	9.1	11.3	105	12.6	11.4	15.7	177
FB	7.3	8.3	45	10.1	8.9	11.6	105	12.6	11.3	15.5	177
WB	7.6	8.5	45	10.1	8.9	11.1	105	12.7	11.3	15.7	177
GAK2	7.6	8.3	45	10.1	9.0	11.5	105	12.6	10.9	15.6	177
GAK3	7.5	8.3	45	10.1	9.1	11.5	105	12.6	11.5	15.4	177

Behandlung	Sauerstoffkonzentration (mg/L)				Leitfähigkeit (µS/cm)			
	Mittelwert	Minimum	Maximum	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	n
Kontrolle	8.97	4.46	10.80	60	686	662	713	58
NKB	8.10	3.88	10.32	45	1066	161	1226	45
Ozon	9.01	5.21	10.49	45	1092	850	1234	45
SF	8.81	5.18	10.58	45	1090	881	1221	45
FB	8.94	5.43	10.63	45	1085	860	1214	45
WB	8.78	5.54	10.51	45	1093	860	1269	45
GAK2	8.78	5.55	10.51	45	1085	854	1209	45
GAK3	8.72	4.86	10.44	45	1090	876	1222	45



Behandlung	Gesamthärte (mg CaCO <sub>3</sub> /L)			
	Mittelwert	Minimum	Maximum	n
Kontrolle	287	249	320	17
NKB	313	249	356	16
Ozon	316	249	338	16
SF	316	267	356	15
FB	310	249	356	15
WB	313	267	338	15
GAK2	316	267	409	15
GAK3	316	267	409	15



## Schlupf der Larven

Tage seit Testbeginn	Behandlung	Schlupf (% befruchtete Eier)	SD
28	Kontrolle	0.0	0.0
29	Kontrolle	0.0	0.0
30	Kontrolle	2.5	3.2
31	Kontrolle	15.0	16.9
32	Kontrolle	55.0	39.1
33	Kontrolle	86.7	15.6
34	Kontrolle	100.0	0.0
35	Kontrolle	100.0	0.0
36	Kontrolle	100.0	0.0
37	Kontrolle	100.0	0.0
38	Kontrolle	100.0	0.0
39	Kontrolle	100.0	0.0
28	NKB	0.0	0.0
29	NKB	0.0	0.0
30	NKB	5.6	6.9
31	NKB	14.4	15.0
32	NKB	53.3	38.4
33	NKB	87.8	12.6
34	NKB	93.3	6.7
35	NKB	96.7	3.3
36	NKB	97.8	3.8
37	NKB	97.8	3.8
38	NKB	97.8	0.0
39	NKB	97.8	0.0
28	Ozon	0.0	0.0
29	Ozon	0.0	0.0



Tage seit Testbeginn	Behandlung	Schlupf (% befruchtete Eier)	SD
30	Ozon	1.1	1.9
31	Ozon	13.3	8.8
32	Ozon	52.2	42.5
33	Ozon	70.0	37.6
34	Ozon	91.1	1.9
35	Ozon	91.1	1.9
36	Ozon	91.1	1.9
37	Ozon	91.1	1.9
38	Ozon	91.1	0.0
39	Ozon	91.1	0.0
28	SF	1.1	1.9
29	SF	1.1	1.9
30	SF	1.1	1.9
31	SF	15.6	6.9
32	SF	84.4	24.1
33	SF	97.8	1.9
34	SF	98.9	1.9
35	SF	98.9	1.9
36	SF	98.9	1.9
37	SF	98.9	1.9
38	SF	98.9	0.0
39	SF	98.9	0.0
28	FB	1.1	1.9
29	FB	1.1	1.9
30	FB	5.6	6.9
31	FB	14.4	22.2
32	FB	38.9	45.4



Tage seit Testbeginn	Behandlung	Schlupf (% befruchtete Eier)	SD
33	FB	51.1	41.1
34	FB	78.9	28.0
35	FB	92.2	8.4
36	FB	94.4	6.9
37	FB	94.4	6.9
38	FB	94.4	0.0
39	FB	94.4	0.0
28	WB	0.0	0.0
29	WB	0.0	0.0
30	WB	1.1	1.9
31	WB	10.0	10.0
32	WB	42.2	37.5
33	WB	83.3	18.6
34	WB	93.3	6.7
35	WB	94.4	6.9
36	WB	94.4	6.9
37	WB	94.4	6.9
38	WB	94.4	0.0
39	WB	94.4	0.0
28	GAK2	1.1	1.9
29	GAK2	1.1	1.9
30	GAK2	4.4	5.1
31	GAK2	12.2	15.8
32	GAK2	48.9	28.7
33	GAK2	81.1	21.4
34	GAK2	96.7	3.3
35	GAK2	96.7	3.3



Tage seit Testbeginn	Behandlung	Schlupf (% befruchtete Eier)	SD
36	GAK2	96.7	3.3
37	GAK2	96.7	3.3
38	GAK2	96.7	0.0
39	GAK2	96.7	0.0
28	GAK3	1.1	1.9
29	GAK3	12.2	18.4
30	GAK3	12.2	18.4
31	GAK3	13.3	17.3
32	GAK3	42.2	13.5
33	GAK3	72.2	22.7
34	GAK3	90.0	6.7
35	GAK3	94.4	1.9
36	GAK3	96.7	3.3
37	GAK3	96.7	3.3
38	GAK3	96.7	0.0
39	GAK3	96.7	0.0



### Überleben der Larven nach Schlupf während der Exposition (bis Tag 64 nach Schlupf)

Behandlung	Replik	Überleben (n)	Überleben (%)	Überleben (% eingesetzter Eier)
Kontrolle	a	30	100.0	100.0
Kontrolle	b	29	96.7	96.7
Kontrolle	c	29	96.7	96.7
Kontrolle	d	29	96.7	96.7
NKB	a	29	96.7	96.7
NKB	b	27	96.4	90.0
NKB	c	28	93.3	93.3
Ozon	a	22	81.5	73.3
Ozon	b	28	100.0	93.3
Ozon	c	27	96.4	90.0
SF	a	29	96.7	96.7
SF	b	29	96.7	96.7
SF	c	29	100.0	96.7
FB	a	28	93.3	93.3
FB	b	26	89.7	86.7
FB	c	25	89.3	83.3
WB	a	23	88.5	76.7
WB	b	29	100.0	96.7
WB	c	27	90.0	90.0
GAK2	a	27	93.1	90.0
GAK2	b	28	100.0	93.3
GAK2	c	29	96.7	96.7
GAK3	a	26	89.7	86.7
GAK3	b	30	100.0	100.0
GAK3	c	26	86.7	86.7



### Standard-Länge und Gesamt-Länge der Fische nach Testende

Behandlung	Replikat	Mittelwert Fisch Standard-Länge (mm)	SD	Mittelwert Fisch Gesamt-Länge (mm)	SD
Kontrolle	a	3.75	0.43	4.30	0.60
Kontrolle	b	3.91	0.49	4.37	0.41
Kontrolle	c	3.88	0.42	4.48	0.45
Kontrolle	d	3.73	0.36	4.31	0.42
NKB	a	3.70	0.34	4.34	0.41
NKB	b	3.77	0.30	4.40	0.36
NKB	c	3.71	0.36	4.31	0.43
Ozon	a	3.80	0.42	4.45	0.49
Ozon	b	3.74	0.34	4.37	0.39
Ozon	c	3.77	0.46	4.37	0.52
SF	a	3.86	0.34	4.50	0.40
SF	b	3.82	0.33	4.45	0.40
SF	c	3.78	0.30	4.43	0.36
FB	a	3.97	0.39	4.62	0.46
FB	b	3.63	0.40	4.27	0.48
FB	c	3.81	0.34	4.42	0.40
WB	a	3.81	0.32	4.40	0.36
WB	b	3.96	0.26	4.58	0.30
WB	c	3.84	0.32	4.47	0.37
GAK2	a	3.88	0.34	4.48	0.41
GAK2	b	3.81	0.35	4.41	0.42
GAK2	c	3.86	0.37	4.47	0.44
GAK3	a	3.91	0.46	4.44	0.41
GAK3	b	3.71	0.43	4.34	0.50
GAK3	c	3.90	0.34	4.52	0.38



### Gewicht der Fische nach Testende

Behandlung	Replik	Gewicht (mg)	SD
Kontrolle	a	0.86	0.32
Kontrolle	b	0.95	0.26
Kontrolle	c	0.99	0.30
Kontrolle	d	0.87	0.27
NKB	a	0.88	0.25
NKB	b	0.92	0.23
NKB	c	0.86	0.26
Ozon	a	0.96	0.33
Ozon	b	0.86	0.22
Ozon	c	0.91	0.29
SF	a	0.94	0.24
SF	b	0.94	0.26
SF	c	0.89	0.24
FB	a	1.06	0.32
FB	b	0.83	0.29
FB	c	0.88	0.28
WB	a	0.86	0.22
WB	b	1.05	0.29
WB	c	0.93	0.26
GAK2	a	0.99	0.28
GAK2	b	0.89	0.29
GAK2	c	0.95	0.31
GAK3	a	0.91	0.31
GAK3	b	0.90	0.32
GAK3	c	0.97	0.28