

Zeitlich gestaffeltes Effektmonitoring mit limnischen Wirbellosen
zur biologischen Erfolgskontrolle des Ausbaus einer kommunalen
Kläranlage mit einer vierten Reinigungsstufe

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Katharina Peschke

aus Nürtingen

Tübingen

2019

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

21.06.2019

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rita Triebskorn

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Heinz-R. Köhler

Inhalt

Teil I: Zusammenfassung	1
1 Promotionsthema.....	1
2 Einleitung.....	2
3 Material und Methoden	9
4 Ergebnisse und Diskussion	29
5 Synthese	53
6 Literatur	58
Teil II: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen.....	67
Teil III: Wissenschaftliche Arbeiten	70
Kapitel 1: SchussenAktiv <i>plus</i> : reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany	70
Kapitel 2: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg.....	86
Kapitel 3: Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen.....	104
Kapitel 4: Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe	129
Kapitel 5: Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macro-invertebrates: individual and community responses.....	146
Publikationsliste.....	169
Danksagung	170

Teil I: Zusammenfassung

1 Promotionsthema

1.1 Titel

„Zeitlich gestaffeltes Effektmonitoring mit limnischen Wirbellosen zur biologischen Erfolgskontrolle des Ausbaus einer kommunalen Kläranlage mit einer vierten Reinigungsstufe“

1.2 Graphische Zusammenfassung

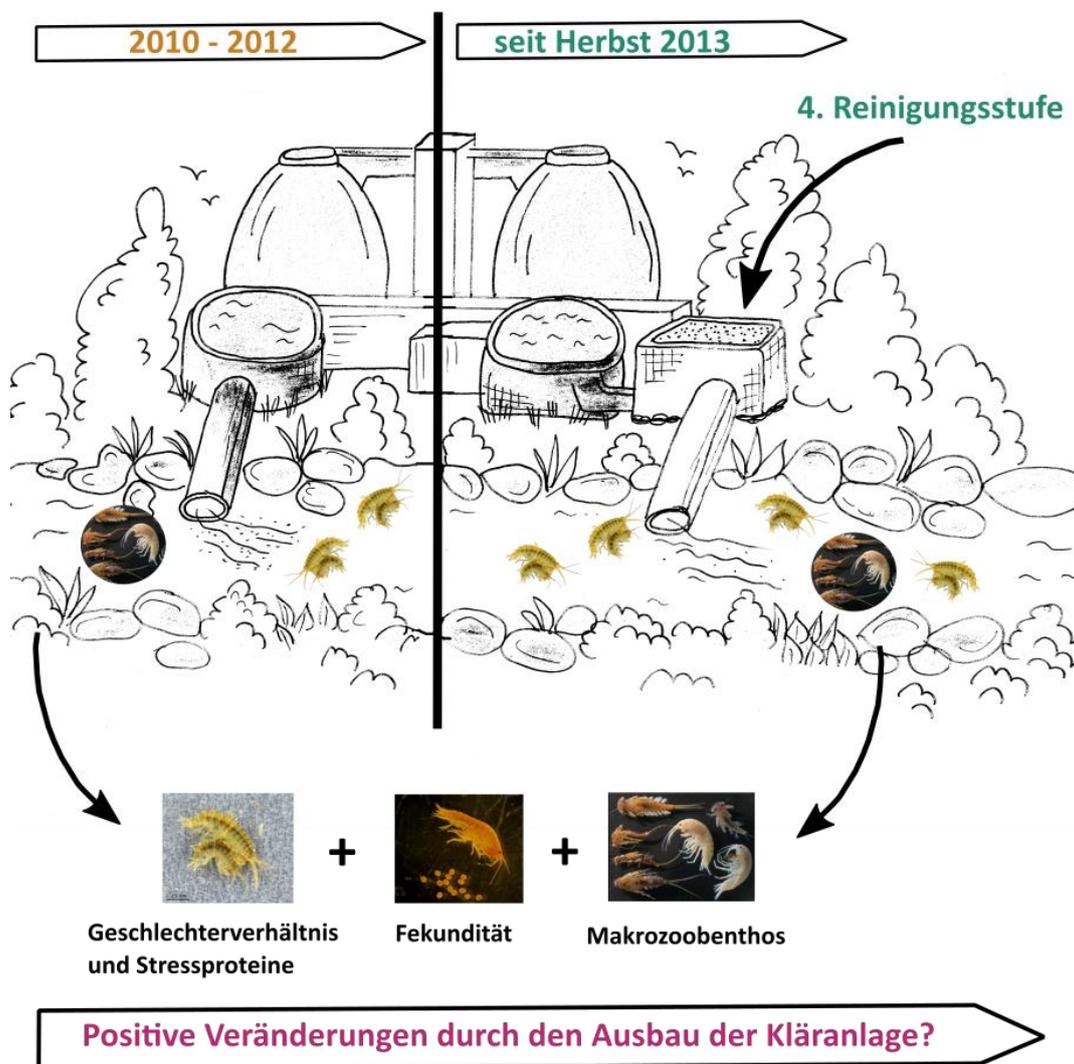


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Inhalts der Dissertation. Im Herbst 2013 wurde eine Pulveraktivkohlestufe als vierte Reinigungsstufe auf der Kläranlage Langwiese (Abwasserzweckverband Mariatal, Ravensburg) in Betrieb genommen. Anhand eines zeitlich gestaffelten Effektmonitorings mit limnischen Wirbellosen im Ökosystem Schussen vor und nach dem Ausbau der Kläranlage wurde mittels populationsökologischer und biochemischer Parameter überprüft, ob der Ausbau der Kläranlage zu einer Verbesserung des Gesundheitszustands der Flohkrebse und der Integrität des Makrozoobenthos führte.

2 Einleitung

2.1 Hintergrund

In Deutschland müssen Oberflächengewässer auf der Basis der Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer regelmäßig untersucht, und Daten zu Biologie, Chemie und Hydromorphologie kontinuierlich erhoben werden (Umweltbundesamt 2017). Die Bewertung der deutschen Oberflächengewässerkörper durch die Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) ergab im Jahr 2016, dass sich lediglich rund acht Prozent der Wasserkörper in einem nach Wasserrahmenrichtlinie definierten „guten ökologischen Zustand“ befanden (BMUB/UBA 2016). Am 22. Dezember 2000 ist die Europäische Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG (im Folgenden als WRRL abgekürzt) mit dem ursprünglichen Ziel in Kraft getreten, den „guten chemischen und ökologischen Zustand“ aller Oberflächengewässer und den „guten chemischen und mengenmäßigen Zustand“ des Grundwassers anhand verschiedener Maßnahmen bis zum Jahr 2015 zu erreichen und zu halten (Europäische Union 2000). Bis 2004 erfolgte die sogenannte Bestandsaufnahme in drei Schritten: (1) Die Auswirkungen menschlicher Tätigkeiten auf die Gewässer wurden geprüft, (2) ein Erreichen der oben genannten Ziele ohne Planung und Umsetzung gezielter Maßnahmen wurde eingeschätzt, (3) Überwachungsprogramme mit europaweit vergleichbaren Bewertungsverfahren wurden erarbeitet und eingeführt. Alle Ergebnisse dieser Bestandsaufnahme mündeten schließlich in die ersten Bewirtschaftungspläne, die bis Ende 2009 fertiggestellt wurden (StMUV 2017). Diese stellen das zentrale Steuerungsinstrument der WRRL dar, und werden alle sechs Jahre überprüft und aktualisiert. Sie enthalten unter anderem Aussagen zu Zustand, Belastungen, Zielerreichung und Maßnahmen. Die wichtigsten Bewirtschaftungspläne und Maßnahmenprogramme betreffen die Verbesserung der Gewässerstruktur und Wiederherstellung der Durchgängigkeit in Oberflächengewässern sowie die Reduzierung des Eintrags von Nähr- und Schadstoffen aus Punktquellen und diffusen Quellen. Der erste Bewirtschaftungszyklus begann 2009 und endete 2015. Am Ende dieses ersten Bewirtschaftungszyklusses zeigte sich, dass die Ziele der WRRL für einen Großteil der Gewässer noch nicht erreicht wurden, so dass eine Fristverlängerung in Anspruch genommen werden musste (BMUB/UBA 2016, StMUV 2017). Der zweite, gerade aktuelle Zyklus, umfasst den Zeitraum von 2015 bis 2021. Spätestens zum Abschluss des dritten Bewirtschaftungszyklus im Jahr 2027 sollen laut WRRL alle Flüsse, Seen, Übergangsgewässer, Küstengewässer und Grundwasser in einem „guten Zustand“ sein (BMUB/UBA 2016, Europäische Union 2000, StMUV 2017).

Eine Maßnahme zur Verbesserung des chemischen Gewässerzustands ist die Aufrüstung kommunaler Kläranlagen mit zusätzlichen Reinigungsstufen zur Reduktion des Schadstoffeintrags (BMUB/UBA 2016, Europäische Union 2000, StMUV 2017). Konventionelle kommunale Kläranlagen mit mehrstufigen Reinigungstechniken sind insbesondere auf den Rückhalt von Nährstoffen (Phosphat-

und Nitratverbindungen) sowie auf die Elimination biologisch gut abbaubarer organischer Substanzen ausgelegt (DVGW 2015, Götz et al. 2011, Schwarzenbach et al. 2006, Seel et al. 1996), und durch fortschreitende Verfeinerung der Analysetechnik wurde ein neues Problem erkannt: In den Oberflächengewässern können immer mehr Mikroschadstoffe (auch als Mikroverunreinigungen oder Spurenschadstoffe bezeichnet) nachgewiesen werden (Abbeglen und Siegrist 2012, Götz et al. 2011, Tribskorn 2017, Umweltbundesamt 2017). Der Begriff Mikroschadstoffe bezeichnet eine organische und stark heterogene Stoffgruppe, die in Konzentrationsbereichen von ng/L bis µg/L im Gewässer nachweisbar ist (Abbeglen und Siegrist 2012). Darunter fallen unter anderem Pflanzenschutzmittel, Pharmazeutika, Haushalts- und Industriechemikalien, Inhaltsstoffe von Kosmetika, Lebensmittelzusatzstoffe, Komplexbildner, Metalle, perfluorierte Tenside und Flammschutzmittel. Die meisten der als Mikroschadstoffe bezeichneten Verbindungen haben eines gemeinsam: Sie können bereits in den geringsten Konzentrationen den Ablauf grundlegender biochemischer Prozesse in der Natur beeinflussen und zu negativen Auswirkungen auf exponierte Organismen führen (Abbeglen und Siegrist 2012, Brauch 2013, de-la-Ossa-Carretero et al. 2016, Munz et al. 2018, Tribskorn et al. 2013b, Villa et al. 2018). Viele dieser potentiell schädlichen Substanzen gelangen kontinuierlich über Haushalte und Gewerbe ins häusliche Abwasser. In herkömmlichen kommunalen Kläranlagen können Mikroschadstoffe jedoch nur schlecht bis gar nicht eliminiert werden, so dass sie mit dem gereinigten Abwasser in die Gewässer eingetragen werden (Abbeglen und Siegrist 2012, Brauch 2013, Daughton und Ternes 1999, Götz et al. 2011). Um eine deutliche Reduktion der Einträge von Mikroschadstoffen in Gewässer, die als Vorfluter für Kläranlagen genutzt werden, zu erreichen, sind weitergehende Verfahren in der Abwasserreinigung nötig, welche auch im Maßnahmenkatalog der WRRL aufgelistet werden. Beispielsweise können anhand einer weitergehenden Abwasserbehandlung durch Adsorption an Aktivkohle oder durch Ozonierung Mikroschadstoffe effektiv dem Wasserkreislauf entzogen werden. Im Jahr 2006 wurde in der Schweiz das Projekt „Strategie Micropoll – Mikroverunreinigungen in den Gewässern“ des Bundesamtes für Umwelt gestartet, in dessen Rahmen Strategien zur Reduktion des Eintrags von Mikroschadstoffen aus kommunalen Abwässern erarbeitet wurden. In verschiedenen Abwasserreinigungsanlagen (in der Schweiz ARAs genannt) wurde die Abwasserbehandlung mit Pulveraktivkohle oder Ozonung für eine großtechnische Umsetzung getestet. Pulveraktivkohle (PAK), eine sehr fein gemahlene Aktivkohle, wird mit dem Abwasser vermischt, wodurch sich die Abwasserinhaltsstoffe an die Oberfläche der Kohlekörner anlagern können. Anschließend wird die mit Mikroschadstoffen beladene PAK durch verschiedene Verfahren (beispielsweise Sandfiltration, Sedimentation-Tuchfiltration oder Membran-Ultrafiltration) vom gereinigten Abwasser getrennt und entsorgt (gemeinsame Verbrennung mit dem Klärschlamm). Mit dieser Methode (12-15 g PAK/m³ Abwasser) konnten Mikroschadstoffe zu über 80 % eliminiert werden (Abbeglen und Siegrist 2012). Das Erreichen dieser Eliminationsrate war aber auch durch Ozonung (3-5 g O₃/m³ Abwasser) möglich,

wie das Projekt „Strategie Micropoll“ zeigte. Wird gasförmiges Ozon ins Abwasser eingetragen, reagiert es mit Mikroschadstoffen und baut diese ab, bzw. um. Durch die Oxidation können allerdings auch reaktive bzw. toxischere Transformationsprodukte entstehen. Dieses Problem kann minimiert werden, wenn der Ozonung eine weitere Behandlungsstufe mit biologischer Aktivität (z. B. Sandfilter) nachgeschaltet wird, wodurch die entstandenen Reaktionsprodukte dem Wasserkreislauf entzogen werden können. Neben PAK und Ozonung sind auch noch andere Verfahren zur Reduktion von Mikroschadstoffen geeignet. Dazu zählen beispielsweise Adsorption an granulierten Aktivkohle (GAK), Nanofiltration und Umkehrosmose, Oxidation der Mikroschadstoffe mit OH-Radikalen und weitere (Abbeglen und Siegrist 2012).

Im Jahr 2009 hat das Land Baden-Württemberg den Beschluss gefasst, die Nachrüstung einiger Kläranlagen im Bodensee-Einzugsgebiet mit Pulveraktivkohlestufen im Rahmen des Konjunkturprogramms zu fördern, um den Bodensee als wichtiges Trinkwasserreservoir zu schützen (Tribskorn et al. 2013b). Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen im Bereich des Bodensees und seines Einzugsgebietes, die im Jahr 2012 von Tribskorn und Hetzenauer zusammengeführt, hinsichtlich ökotoxikologischer Wirkdaten und Umweltqualitätsnormen beurteilt und anschließend als zusammenfassende Literaturstudie veröffentlicht wurden, zeigten, dass in den Bodenseezuflüssen Argen, Schussen und Seefelder Aach zur damaligen Zeit insgesamt 82 Spurenstoffe nachgewiesen werden konnten (Tribskorn und Hetzenauer 2012). Darunter waren verschiedene Arzneimittel (u.a. Schmerzmittel, Röntgenkontrastmittel, Östrogene und Antibiotika), Pflanzenschutzmittel (größtenteils Herbizide), Industriechemikalien, Komplexbildner, Metalle und perfluorierte Tenside. In der Schussen, dem größten rein baden-württembergischen Bodenseezufluss (LUBW 2010), wurden 70 der 84 Spurenstoffe gefunden, davon 31 ökotoxikologisch relevante Substanzen (Tribskorn und Hetzenauer 2012). Die Schussen bildet den Vorfluter der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg (Abwasserzweckverband Mariatal), welche das größte Klärwerk im nördlichen Bodensee-Einzugsgebiet ist, und im Jahr 2009 bereits mit einer Sandfiltration ausgestattet wurde. Die Kläranlage Langwiese zählt neben den Klärwerken Esparsingen, Emmingen-Liptingen und Kressbronn-Langenargen zu den im Rahmen des Konjunkturprogramms ausgebauten Anlagen. Als zusätzlicher vierter Reinigungsschritt wurde hier eine Pulveraktivkohlestufe integriert, deren Inbetriebnahme im Herbst 2013 erfolgte (Tribskorn et al. 2013b).

Basierend auf der Literaturstudie von Tribskorn und Hetzenauer (2012), in der die hohe Belastung an der Schussen umfassend dargestellt wurde, und mit Aussicht auf die Erweiterung der Kläranlage um eine vierte Reinigungsstufe, wurde im Jahr 2010 das Verbundprojekt „SchussenAktiv: Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Monitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese“ von Frau Prof. Dr. Rita Tribskorn (Universität Tübingen) initiiert. Das Projekt wurde mit dem Ziel, den ökotoxiko-

logischen Zustand der Schussen im Vergleich zum weniger belasteten Referenzgewässer Argen vor Ausbau der Kläranlage Langwiese zu beschreiben, vom Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UM-BW) mit einer Laufzeit von 2010 bis 2012 gefördert. Unter Beteiligung mehrerer Verbundpartner verschiedener Institutionen wurde mithilfe einer breitgefächerten Testbatterie der ökologische und ökotoxikologische Zustand der Schussen und Argen zum Zeitpunkt vor Ausbau der Kläranlage Langwiese erfasst und beschrieben. Da sich die geplante Fertigstellung der Pulveraktivkohlestufe verzögerte und die Inbetriebnahme erst im Herbst 2013 erfolgte, wurde das Projekt „SchussenAktiv“ fortgeführt und zu „SchussenAktivplus“ erweitert, um den Ausbau der Kläranlage auch weiterhin begleiten zu können. Im Jahr 2010 wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Zuge des Forschungsrahmenprogramms „Forschung für nachhaltige Entwicklungen“ (FONA) die Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ (RiSKWa) bekanntgegeben. Im Rahmen dieser Fördermaßnahme wurden vom BMBF 12 Verbundprojekte gefördert, darunter auch „SchussenAktivplus: Reduktion von Mikroverunreinigungen und Keimen zur weiteren Verbesserung der Gewässerqualität des Bodenseezuflusses Schussen“. Mit Unterstützung des UM-BW wurde so die Begleitung des Ausbaus der Kläranlage Langwiese für weitere drei Jahre ermöglicht (Laufzeit: 2012-2015). Im Zuge der Erweiterung des Projekts „SchussenAktiv“ zu „SchussenAktivplus“ beteiligten sich nun insgesamt 22 Projektpartner an den Projektelementen Risikominimierung, Risikocharakterisierung und Risikokommunikation (Abbildung 2). In „SchussenAktivplus“ wurde der Fokus nicht nur auf verschiedene Technologien in Kläranlagen gerichtet, sondern auch auf Mischwasserentlastungssysteme wie Regenüberlaufbecken (RÜB) und Retentionsbodenfilter (RBF). Neben Spurenstoffen und toxischen bzw. hormonellen Wirkpotentialen wurden jetzt auch nicht-resistente und resistente Keime in der Beschreibung und Bewertung der Effizienz zusätzlicher Reinigungsstufen zur Reduktion möglicher Abwasserbestandteile berücksichtigt. Durch diese innovative kombinierte Betrachtung von Exposition sowie den damit verbundenen Effekten in Biotests im Labor und in Organismen im Freiland konnte die Effizienz zusätzlicher Reinigungsstufen zur Reduktion von Keimen und Spurenstoffen im Wasserkreislauf umfassend beurteilt werden. Nach Ende der Laufzeit von „SchussenAktivplus“ (31.12.2014) wurde eine Weiterführung der Untersuchungen durch eine Finanzierung über das Land Baden-Württemberg und einer partiellen Weiterfinanzierung durch das BMBF ermöglicht. Unter dem Namen „SchussenAktivplus+: Langzeiteffekte des Ausbaus der Kläranlage Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg) mit der 4. Reinigungsstufe auf der Basis von Pulveraktivkohle für das Ökosystem der Schussen“ wurden nun die Auswirkungen der Pulveraktivkohlestufe auf das angeschlossene Gewässer nicht nur unmittelbar nach Inbetriebnahme, sondern auch noch bis zu drei Jahren danach untersucht. Anhand dieser drei aufeinander aufbauenden Projektteile („SchussenAktiv“, „SchussenAktivplus“ und „SchussenAktivplus+“) wurden die Untersuchungen an den

Bodenseezuflüssen Schussen und Argen über insgesamt fast sieben Jahre durchgeführt, wodurch anhand der umfassenden Datenlage aus chemisch-analytischer, mikrobiologischer und effektbasierter ökotoxikologischer Methoden die Effizienz zusätzlicher Reinigungsstufen zur Reduktion von Mikroschadstoffen und Keimen aus Kläranlagen und Regenentlastungssystemen sowie die Veränderungen im Ökosystem der Schussen durch Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe auf der Kläranlage Langwiese ausführlich beschrieben und bewertet werden konnten. In Kapitel 1 und 2 werden die Projekte „SchussenAktiv“ und „SchussenAktivplus“ detailliert vorgestellt.



Abbildung 2: Beteiligte Verbundpartner des Projekts „SchussenAktivplus“. Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (Forschungsrahmenprogramm „Forschung für nachhaltige Entwicklungen“ (FONA), Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ (RiSKWa)), unter Beteiligung des Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg. Die jeweiligen Aufgaben der verschiedenen Verbundpartner werden in Kapitel 1 dargestellt. Quellenangaben der einzelnen Logos im Literaturverzeichnis gelistet.

2.2 Inhalt der vorliegenden Arbeit

Um die zusätzliche Reinigungsmaßnahme auf der Kläranlage Langwiese im Bodensee-Einzugsgebiet hinsichtlich des Gesundheitszustands wirbelloser Gewässerorganismen im Vorfluter Schussen zu bewerten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ökotoxikologische Untersuchungen mit Gammariden durchgeführt. Gammariden (Flohkrebse) stellen bedeutende Stellvertreter der Invertebratenfauna eines Fließgewässers dar. Sie sind weit verbreitet und treten oft in enormen

Individuenzahlen auf, wodurch ihnen einerseits eine wichtige Stellung im limnischen Nahrungsnetz zukommt, andererseits selbst die Entnahme größerer Stichproben als ökologisch unbedenklich angesehen werden kann (Meijering und Pieper 1982, Pöckl 1993a, Pöckl 2014). Von Gammariden ist auch bekannt, dass sie sich unter anderem durch eine hohe Sensitivität gegenüber Schadstoffen auszeichnen und auf Beeinträchtigungen der Gewässergüte reagieren (Besse et al. 2013, Blarer und Burkhardt-Holm 2016, Bundschuh und Schulz 2011, Chaumot et al. 2015, Pöckl 2014). Somit eignen sie sich hervorragend als Monitororganismen um den Erfolg des Ausbaus der Kläranlage Langwiese mit einer Pulveraktivkohlestufe aus biologischer Sicht zu kontrollieren. Hierzu wurden sowohl vor als auch nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe an Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage an der Schussen Gammariden entnommen. Eine Probestelle an der Argen, ein weiterer Bodenseezufluss mit vergleichsweise geringer Belastung (Triebkorn und Hetzenauer 2012), diene als Referenzstelle.

An allen Probestellen wurden populationsökologische und biochemische Untersuchungen mit Gammariden durchgeführt. Um endokrine Wirkungen zu bewerten, wurde das Geschlechterverhältnis in den entnommenen Stichproben bestimmt. Studien im Labor (Watts et al. 2002) und Freiland (Schneider et al. 2015) weisen darauf hin, dass sich das Geschlechterverhältnis in Gammariden unter dem Einfluss von Östrogenen bzw. östrogenwirksamen Substanzen zugunsten der Weibchen verschiebt. Somit stellt die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses eine gute Methode dar, um Hinweise auf die Präsenz östrogen wirksamer Substanzen in Fließgewässern zu erhalten. Neben dem Geschlechterverhältnis ist auch die Fekundität weiblicher Gammariden ein Faktor, der längerfristig betrachtet unter anhaltender Beeinträchtigung massive Auswirkungen auf die gesamte Population haben kann. Veröffentlichte Daten unterschiedlichster Studien zu den Effekten von Östrogenen und Xenoöstrogenen auf die Reproduktion von Gammariden werden allerdings noch kontrovers diskutiert. Vor allem die Ergebnisse aus Freilandstudien (Harth et al. 2018, Ladewig et al. 2006, Schneider et al. 2015) bestärken die Annahme, dass der Fekunditätsindex in Gammariden nicht ausschließlich von östrogen wirksamen Substanzen sondern eher von einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Faktoren bestimmt wird. In jedem Fall stellte aber die Untersuchung der Fekundität weiblicher Gammariden ein geeignetes Mittel dar, um die Auswirkungen von Abwasser auf den Zustand der Flohkrebsebene auch in der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese zu dokumentieren. Neben diesen populationsökologischen Aspekten wurden auf biochemischer Ebene anhand der Stressprotein Hsp70-Analyse proteotoxische Wirkungen des Kläranlageneinleiters untersucht. Fast alle Organismen, vom Bakterium bis zum Menschen, sind in der Lage, auf einen Stressor, wie z.B. eine Temperaturerhöhung, mit vermehrter Bildung sogenannter Hitzeschockproteine (heat-shock proteins, Hsp70) zu reagieren. Tritt eine Stresssituation auf (z. B. Temperaturbelastung, Schwermetallbelastung, toxische Substanzen, UV-Strahlung und Sauerstoffmangel), die Proteinschädigungen zur Folge hat,

werden Stressproteine induziert, binden an falsch gefaltete Proteine, und es findet eine erneute gezielte Faltung statt (Lewis et al. 1999, Sanders 1993). Eine Erhöhung des Hsp70-Levels lässt somit auch einen Rückschluss auf eine Schadstoffbelastung zu.

Den maßgeblichen Eigenanteil der vorliegenden Arbeit bilden die Untersuchungen mit Gammariden. Um die Effekte bei wirbellosen Gewässerorganismen nicht nur auf Individualebene, sondern auch auf Ebene der Lebensgemeinschaft darzustellen, wurden Daten zum Makrozoobenthos, die von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) erhoben wurden, ausgewertet und in alle Kapitel der vorliegenden Arbeit integriert. Zudem bot das Projekt „SchussenAktivplus“ die einmalige Gelegenheit, die mit Gammariden erhobenen Daten mit Ergebnissen chemischer Analysen sowie vielfältigster Wirkpotential- und Wirkanalytik zu verknüpfen und diese in die Diskussion miteinzubeziehen.

2.3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Effektivität der Pulveraktivkohlestufe auf der Kläranlage Langwiese für das Ökosystem der Schussen durch Untersuchungen an Gammariden zu dokumentieren und zu bewerten. Hierzu wurden vor und nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese populationsökologische und biochemische Daten im Rahmen eines passiven Monitorings erhoben, um endokrine, allgemein toxische und proteotoxische Wirkungen aufzuzeigen. Nach Abschluss der Arbeit sollten auch mit Bezugnahme auf die Ergebnisse des Verbundprojekts „SchussenAktivplus“ folgende Fragestellungen beantwortet werden können:

- *Führt der Ausbau der Kläranlage Langwiese mit einer Pulveraktivkohlestufe zu einer Reduktion toxischer und endokriner Effekte bei Gammariden in der Schussen unterhalb der Kläranlage?*
- *Spiegeln sich die gewonnenen Ergebnisse auf Individualebene auch in Untersuchungen auf Ebene der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft wider?*
- *Lassen sich die bei Gammariden ermittelten Effekte in Zusammenhang mit den im Rahmen des Verbundprojekts erhobenen chemisch-analytischen Daten sowie mit Ergebnissen verschiedenster Wirkpotential- und Effektuntersuchungen bringen?*
- *Führt die Erweiterung der Kläranlage Langwiese mit einer vierten Reinigungsstufe zu positiven Veränderungen im Ökosystem der Schussen?*

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgebiet und Probestellen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit Gammariden wurden, wie alle anderen Untersuchungen im Rahmen der Projekte „SchussenAktiv“, „SchussenAktivplus“ und „SchussenAktivplus+“ auch (Tribskorn 2017, Tribskorn et al. 2013a, Tribskorn et al. 2013b), im Bodensee-Einzugsgebiet an den Bodenseezuflüssen Schussen und Argen durchgeführt. Im Fokus der Untersuchungen stand die an der Schussen gelegene Kläranlage Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg), welche im Herbst 2013 mit einer zusätzlichen vierten Reinigungsstufe ausgebaut wurde. Um die an der Schussen gewonnenen Ergebnisse mit einem Referenzwert vergleichen zu können, wurde eine Probestelle an der Argen in die Untersuchung miteinbezogen. Diese gilt als eher unbelastet (Tribskorn und Hetzenauer 2012) und im Untersuchungszeitraum wurden keine gewässerbaulichen Maßnahmen etc. vorgenommen, welche zu Veränderungen in der Gewässerbeschaffenheit hätten führen können.

Die Schussen

Die Schussen entspringt nördlich von Bad Schussenried (577 m über NN) und mündet nach 60 km bei Eriskirch (395 m über NN) in den Bodensee. 30 % des Einzugsgebiets werden für Ackerbau genutzt, vor allem im mittleren und unteren Schussental. Insbesondere im seenahen Mündungsgebiet und im Raum Tettngang werden auf weiteren 5 % Sonderkulturen, vor allem Obst, Hopfen und Wein, angebaut. 25 % des Einzugsgebietes sind bewaldet und weitere 30 % fallen auf Grünland (Tribskorn et al. 2017). Das Einzugsgebiet der Schussen (815 km²) ist das größte unter den baden-württembergischen Bodenseezuflüssen und dicht besiedelt (11 % Siedlungsfläche, 200.000 Einwohner), wobei der Besiedlungsschwerpunkt auf dem mittleren und unteren Schussental liegt. In diesem Siedlungsbereich, unterhalb des Zusammenflusses mit der Wolfegger Ach, leben rund zwei Drittel der Einwohner des Einzugsgebietes auf etwa ein Drittel seiner Fläche. Die Abwasserleitung erfolgt überwiegend im Mischkanalsystem, d. h. Abwässer aus Haushalten und Industrie werden mit Straßenabwässern zusammengeführt und gemeinsam den Kläranlagen zugeleitet. Der Abwassereintrag ist von häuslichen Abwässern dominiert, das in insgesamt 20 kommunalen Kläranlagen gereinigt wird (LUBW 2009). In der Vergangenheit spielten auch industrielle Abwässer eine Rolle, hierbei vor allem Abwässer aus der Papierfabrik Mochenwangen, die jedoch im Jahr 2015 geschlossen wurde (Tribskorn et al. 2017). Aufgrund des geringen Niederschlags im nordwestlichen Bodenseegebiet (rund 800 mm/Jahr) beträgt der mittlere Abfluss der Schussen trotz ihres großen Einzugsgebiets nur 11 m³/s (LUBW 2009), was eine vergleichsweise geringe Verdünnung der hohen Eintragsmengen an Abwasser zur Folge hat (Tribskorn et al. 2013b). Da zudem zahlreiche Regenüberlaufbecken in die Schussen einleiten, gilt

diese, im Vergleich zu anderen Bodenseezuflüssen, als relativ stark belastet (Tribskorn und Hetzenauer 2012).



Abbildung 3: Probestelle 0 an der Schussen, oberhalb der Kläranlage Langwiese. N47°45'29.59", E9°35'22.88"
Foto: 19.04.2010



Abbildung 4: Probestelle 3 an der Schussen, unterhalb der Kläranlage Langwiese. N47°39'16.20", E9°31'52.93"
Foto: 09.05.2011

Die Argen

Die Argen ist der drittgrößte Bodenseezufluss und entsteht aus dem Zusammenfluss der Oberen und Unteren Argen. Die Obere Argen entsteht nordwestlich von Oberstaufen (Landkreis Oberallgäu) durch den Zusammenfluss des Seelesgrabens, des Moosmühlbachs und des Schwarzenbachs. Durch den Zusammenfluss des Börlasbach und des Sixnerbachs entsteht bei Missen die Untere Argen. Südwestlich von Wangen, in der Nähe von Pfügelberg, fließen beide Flüsse zusammen und bilden die Vereinigte Argen. Nach insgesamt 78 km mündet die Argen bei Langenargen in den Bodensee. Das Einzugsgebiet der Argen beträgt 635 km² und wird von etwa 85.000 Einwohnern besiedelt. Die Abwässer werden von insgesamt neun Kläranlagen gereinigt. Der mittlere Abfluss beträgt 22-23 m³/s und ist damit bei kleinerem Einzugsgebiet doppelt so hoch wie in der Schussen. Neben der daraus resultierenden starken Verdünnung eingetragener Abwässer ist zudem die Belastung aus ackerbaulicher Nutzung geringer als in der Schussen (Tribskorn et al. 2017, Tribskorn und Hetzenauer 2012). Dadurch weist die Argen eine deutlich geringere Belastung mit Schadstoffen auf (Tribskorn und Hetzenauer 2012) und kann somit gut als vergleichsweise gering belastetes Referenzgewässer herangezogen werden. Das Einzugsgebiet der Argen ist im oberen Bereich, in der Umgebung von Wangen, von Grünland dominiert. Der untere Bereich ist durch den Anbau von Sonderkulturen (vor allem Obst) geprägt (Tribskorn et al. 2017). Die Argen ist ein relativ naturnaher, unverbauter Fluss, und wurde vom Gemeinsamen Gewässerbeirat der Naturfreunde Deutschlands und des Deutschen Angelfischerverbandes zur „Flusslandschaft der Jahre 2014/15“ gekürt.



Abbildung 5: Probestelle 5 an der Vereinigten Argen. 2,5 km Entfernung zur Bodensee-Mündung. N47°36'09.71", E9°34'02.91" Foto: 12.10.2010



Abbildung 6: Typisches Gammariden-Habitat am Ufer der Vereinigte Argen, Probestelle 5. Foto: 12.10.2010

Die Kläranlage Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg)

Die an der Schussen gelegene Kläranlage (KA) Langwiese ist die größte Kläranlage im nördlichen Bodensee-Einzugsgebiet. Sie ist dem Abwasserzweckverband (AZV) Mariatal bei Ravensburg zugeordnet und reinigt eine Abwasserfracht von 170.000 Einwohner-Werten (ca. 80.000 Einwohner) (Triebkorn et al. 2013b). Im Jahresmittel gelangen pro Tag 40.000 m³ Abwasser durch ein Mischkanalisationssystem in die Kläranlage. Bei Trockenwetter beträgt der Maximalzufluss etwa 625 L/s. Bei Regenereignissen kann der Zulauf bis zu 1.100 L/s ansteigen, wobei dann 30 % der zu behandelnden Abwassermenge auf Schmutzwasser entfallen, der Rest entfällt auf das von befestigten Flächen abfließende Niederschlagswasser. Das Abwasser wird auf mechanische, biologische und chemische Weise gereinigt (Jedele und Müller 2017). Bereits vor ihrem Ausbau war die Kläranlage mit einem Sandfilter ausgestattet (Triebkorn et al. 2013b). Im Jahr 2010 wurde mit dem Bau einer vierten Reinigungsstufe (Adsorptionstechnologie mit pulverisierter Aktivkohle, PAK) begonnen, und im Oktober 2013 wurde die zusätzliche Reinigungsstufe vollständig in Betrieb genommen. Seitdem durchläuft das Abwasser wie gehabt die mechanische, biologische und chemische Reinigung, wird dann allerdings nach der Nachklärung in ein dreiteiliges Reaktionsbecken geleitet, wo es mit PAK versetzt wird. Nach Zugabe von Fäll- und Flockungsmitteln wird die mit PAK versetzte Wassermenge in ein Absetzbecken geleitet, in welchem die PAK abgeschieden wird. Die abgesetzte PAK wird in das Reaktionsbecken zurückgeführt. Das aus dem Absetzbecken ablaufende Abwasser wird in den Schnellsandfilter geleitet, dort filtriert und gelangt anschließend als gereinigtes Abwasser in die Schussen. Die Dosierung der Pulveraktivkohle betrug im Untersuchungszeitraum 10 mg PAK pro Liter Abwasser (Jedele und Müller 2017).

Probestellen

An der Schussen erfolgte die Entnahme von Gammariden parallel zu den an diesen Stellen durchgeführten Untersuchungen der Kooperationspartner, so dass deren Ergebnisse später in die Interpretation der Ergebnisse des Gammariden-Monitorings miteinfließen konnten. An der Probestelle der Argen war dies leider nicht uneingeschränkt möglich. Untersuchungen der Kooperationspartner (Triebskorn 2017) wurden an Probestellen der Unteren Argen durchgeführt. Da an diesen Probestellen keine Gammariden vorkamen, wurde das Monitoring auf den unteren Abschnitt der Vereinigten Argen, in Bodensee-Nähe, verlegt. Erst an dieser Probestelle traten Gammariden wieder gehäuft auf, so dass die ausgewählten Untersuchungsmethoden auch durchgeführt werden konnten.

Die Lage der einzelnen Probestellen im Untersuchungsgebiet kann Abbildung 7 und Tabelle 1 entnommen werden.

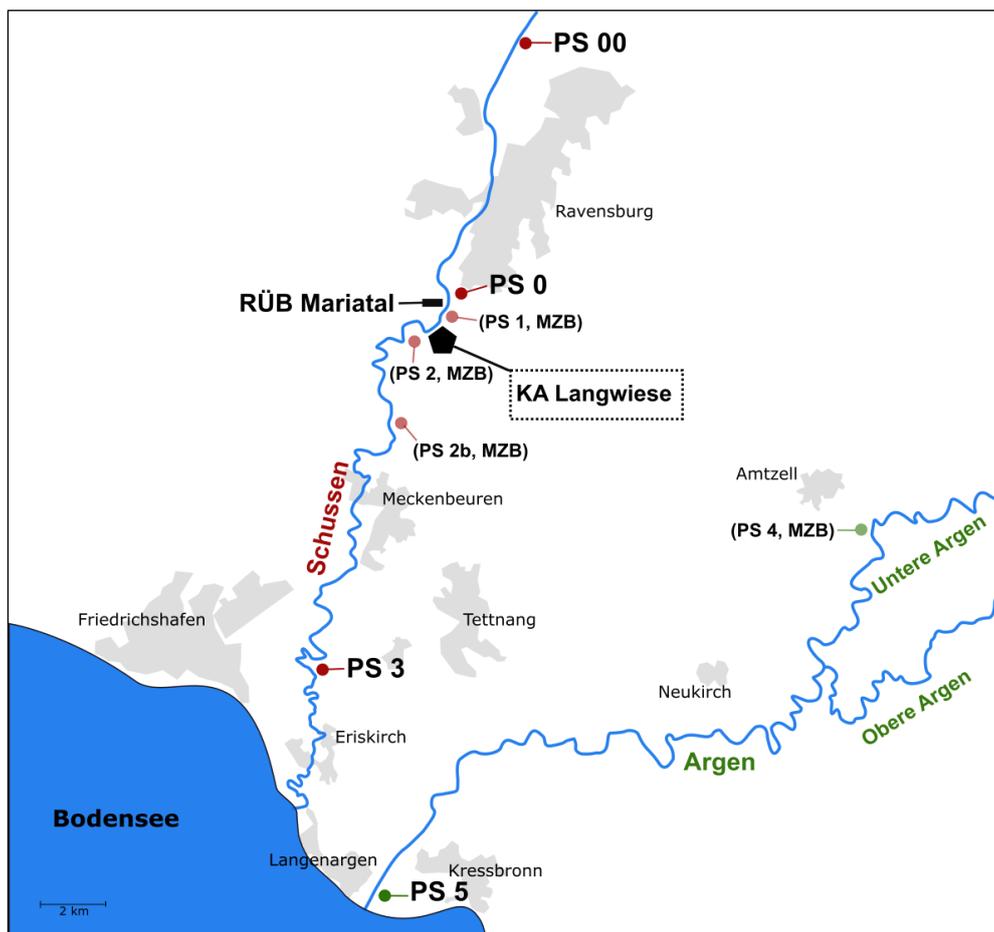


Abbildung 7: Untersuchungsgebiet mit Lage der Probestellen (PS) an Schussen und Argen, an denen Invertebraten entnommen wurden. Für das Monitoring mit Gammariden waren folgende Probestellen, welche auf der Karte deutlich hervorgehoben sind, von Bedeutung: PS 00 und PS 0 (oberhalb der Kläranlage (KA) Langwiese) und PS 3 (unterhalb der KA) an der Schussen sowie PS 5 als Referenzstelle an der Argen. Das Makrozoobenthos (MZB) wurde an folgenden Probestellen untersucht: PS 0 (oberhalb der KA, oberhalb des Regenüberlaufbeckens (RÜB) Mariatal), PS 1 (unterhalb des RÜB, oberhalb der KA), PS 2 (direkt unterhalb der KA), PS 2b (10 km unterhalb der KA) und PS 3 (15 km unterhalb der KA). An der Argen wurde PS 4 als Referenzstelle untersucht. Karte: Basierend auf Daten von © OpenStreetMap contributors, Lizenz: <http://opendatacommons.org/licences/dbcl/1.0/>

Tabelle 1: Geographische Lage der Probestellen an Schussen und Argen, an welchen Invertebraten entnommen wurden. Graphische Darstellung siehe Abbildung 7, Seite 12. PS = Probestelle, KA = Kläranlage Langwiese, RÜB = Regenüberlaufbecken Mariatal, MZB = Makrozoobenthos. Bemerkungen zu den einzelnen Probestellen: ^{A,B}nur im Zeitraum von 2010-2012 untersucht; ^{C-E}andere Bezeichnung der Probestellen in Publikation Nr. 3 (Kapitel 3, Seite 103): ^CPS 1a, ^DPS 1b, ^EPS 2.

	Probestelle	Koordinaten	Lage im Untersuchungsgebiet	Entnahme von:
Schussen	PS 00 ^{A)}	N47°51'39.37" E9°37'04.87"	Ravensburg-Staig; 15 km oberhalb der KA; 12 km oberhalb des RÜB	Gammariden
	PS 0	N47°45'29.59" E9°35'22.88"	Ravensburg-Weißenau; 2,5 km oberhalb der KA; 550 m oberhalb des RÜB	Gammariden MZB
	PS 1 ^{C)}	N47°40'19.57" E9°32'06.20"	Ravensburg-Weißenau; 630 m oberhalb der KA; 1,12 km unterhalb des RÜB	MZB
	PS 2 ^{D)}	N47°44'42.27" E9°33'45.04"	Klöcken (Ravensburg); 850 m unterhalb der KA; 3,8 km unterhalb des RÜB	MZB
	PS 2b ^{B, E)}	N47°40'22.44" E9°32'06.34"	Lochbrücke (Gemeinde Meckenbeuren); 10 km unterhalb der KA; 14 km unterhalb des RÜB	MZB
	PS 3	N47°39'16.20" E9°31'52.93"	Oberbaumgarten (Gemeinde Eriskirch); 15 km unterhalb der KA; 18 km unterhalb des RÜB	Gammariden MZB
Argen	PS 4	N47°44'20.46" E9°53'42.78"	Untere Argen, ~15 km oberhalb des Zusammenflusses mit der Oberen Argen	MZB
	PS 5	N47°36'09.71" E9°34'02.91"	Gohren (Gemeinde Kressbronn); Vereinigte Argen; 2,5 km Entfernung zur Bodensee-Mündung	Gammariden

Um Auswirkungen des Ablaufs der Kläranlage Langwiese auf die Gammaridenpopulationen sowie auf den Gesundheitszustand einzelner Individuen zu untersuchen, wurden an Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage Gammariden entnommen. Oberhalb der Kläranlage war dies an PS 0 bei Weißenau (Ravensburg), 2,5 km oberhalb der Kläranlage. In der ersten Untersuchungsperiode (2010 – 2012, Ergebnisse in Kapitel 3 (Seite 37) beschrieben und 2014 veröffentlicht (Seite 103)) wurden zudem Gammariden an PS 00, etwa 15 km oberhalb der Kläranlage gelegen, entnommen. PS 00 lag flussaufwärts in weiterer Entfernung zur Kläranlage, unweit der Einleitung drei kleinerer Regenüberlaufbecken. Unterhalb der Kläranlage wurde PS 3 (etwa 15 km unterhalb der Kläranlage) untersucht. Die Lage dieser Probestelle als Standort für Untersuchungen unterhalb des Kläranlagen-einleiters war vor allem durch das Monitoring mit Fischen begründet (Henneberg et al. 2014, Henneberg und Tribskorn 2015, Maier et al. 2016, Maier et al. 2015, Tribskorn 2017). Nur durch die relativ große Entfernung (~15 km) zur Kläranlage konnte sichergestellt werden, dass Fische, die an dieser Stelle entnommen wurden, sich auch dauerhaft unterhalb der Kläranlage aufhielten und nicht

in den Flussbereich oberhalb der Kläranlage migrierten. Durch die simultane Entnahme von Gammariden und Fischen an dieser Probestelle konnten somit die Effekte des Kläranlagenablaufs auf unterschiedlichen biozönotischen Ebenen analysiert und interpretiert werden.

Im Rahmen der Erhebungen des Makrozoobenthos wurden an der Schussen weitere Probestellen in die Untersuchungen miteinbezogen, um mögliche Veränderungen in der Integrität des Makrozoobenthos entlang des Flussverlaufs der Schussen aufzuzeigen zu können. Da Makrozoobenthos (hierzu zählen alle aquatischen Lebewesen mit einer Größe über 1 mm, die in und auf der Gewässersohle leben (mit Ausnahme der Fische), wie z.B. Stein-, Eintags- und Köcherfliegenlarven, Krebse, Würmer, Käfer und Egel (Wurm 2017)) im Gegensatz zu Fischen als nahezu stationär bezeichnet werden kann (di Lascio et al. 2013, Langmaier 2006), konnten auch Probestellen untersucht werden, die in geringerer räumlicher Entfernung zueinander lagen. Oberhalb der Kläranlage wurde Makrozoobenthos an PS 0 entnommen. Etwa 1,8 km flussabwärts lag PS 1 – ebenfalls oberhalb der Kläranlage, jedoch unterhalb der Einleitung des Regenüberlaufbeckens Mariatal. Unterhalb der Kläranlage wurde entgegen der Untersuchungen der übrigen Projektpartner nicht nur an einer Probestelle, sondern an mehreren Probestellen Makrozoobenthos entnommen: PS 2 (850 m unterhalb der KA) und PS 3 (15 km unterhalb der KA). In den Jahren 2010 bis 2012 (Ergebnisse in Kapitel 3 (Seite 37) beschrieben und 2014 veröffentlicht (Seite 103)) wurde zusätzlich PS 2b (zwischen PS 2 und PS 3 gelegen, 10 km unterhalb der KA) untersucht. Im Laufe des Projekts „SchussenAktivplus“ wurde ein Teil der an der Schussen gelegenen Probestellen aufgrund der Reduktion der Anzahl untersuchter Stellen umbenannt. In der in 2014 veröffentlichten Publikation “Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen” (Kapitel 3 Seite 103) wurde PS 1 als PS 1a bezeichnet, PS 2 als PS 1b und PS 2b als PS 2. Um innerhalb der vorliegenden Arbeit die untersuchten Probestellen an der Schussen einheitlich zu benennen, wurden im Folgenden die Bezeichnungen PS 1, PS 2 und PS 2b, welche auch in Abbildung 7 und Tabelle 1 dargestellt sind, verwendet.

An der Argen wurde im Rahmen des Gammariden-Monitorings Probestelle PS 5 bei Gohren (Gemeinde Kressbronn) als Referenzstelle gewählt. Die Untersuchungen des Makrozoobenthos wurden an der Unteren Argen an Probestelle PS 4 bei Amtzell Oberau durchgeführt. Auch alle weiteren Untersuchungen der beteiligten Projektpartner fanden an dieser Probestelle (Amtzell Oberau), als auch etwas weiter flussaufwärts bei Rehmen (47°44'20.5"N 9°53'42.8"E), statt. Diese Probestellen lagen nördlich von Wangen im Allgäu, rund 15 km oberhalb des Zusammenflusses der Oberen und Unteren Argen und etwa 30 km entfernt von PS 5 bei Gohren. Insofern konnten die Ergebnisse des

Gammariden-Monitorings mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Kooperationspartner nicht in unmittelbarem Zusammenhang gebracht werden, da sich die Gewässerstruktur zwischen den Probestellen der Unteren Argen und der Vereinigten Argen wesentlich unterscheidet. Die Gewässerstruktur der Unteren Argen wird von großen rundgeschliffenen Steinen dominiert, die keinerlei Unterschlupfmöglichkeiten für Gammariden bieten. Bei Regenereignissen, die eine starke Strömung mit sich bringen, bewegt sich das Flussbett und die Gammariden werden abgeschwemmt und/oder zerdrückt. Aus kleineren Bächen gelangen zwar *Gammarus fossarum* in die Untere Argen, diese können sich dort jedoch nicht halten und werden flussabwärts verdriftet. Erst im Unterlauf der Vereinigten Argen ist die Strömung geringer. Hier ist die Flussmorphologie wesentlich durch eckigere Steine charakterisiert, welche auch kleinere Platten und Vorsprünge aufweisen. Dadurch entstehen viele kleine strömungsberuhigte Areale, in welchen sich Gammariden halten können (pers. Mitteilung Karl Wurm, Gewässerökologisches Labor Starzach, 12/2018). Da die Argen als wenig belastetes Referenzgewässer während des Untersuchungszeitraums keinen wasserbaulichen Maßnahmen unterlag, konnten die Ergebnisse diverser Untersuchungen der Verbundpartner an der Unteren Argen unter Berücksichtigung der verschiedenen Probestellen trotzdem in die Interpretation der Daten des Gammariden-Monitorings miteinfließen und Hinweise auf jahresspezifische und jahreszeitliche Schwankungen liefern.

3.2 Monitororganismen: Flohkrebse der Gattung *Gammarus*

Systematik, Morphologie und Ökologie

Amphipoda (Flohkrebse) stellen eine Ordnung der Malacostraca (Höhere Krebse) dar und werden systematisch zu den Crustacea (Krebstieren) innerhalb des Stamms der Arthropoda (Gliederfüßer) gezählt. Die Gammaridea, die größte Unterordnung innerhalb der Amphipoda, umfassen etwa 85 % der 6.000 beschriebenen Arten der marinen und limnischen Flohkrebse (Westheide und Rieger 2013) und gelten als deren ursprünglichste Gruppe (Schellenberg 1942). Die Gattung *Gammarus* (Gemeine Flohkrebse) ist die arten- und individuenreichste Gruppe innerhalb der Amphipoda und im Süß- und Salzwasser von der Arktis bis in die Tropen vertreten (Schellenberg 1942). In den Fließgewässern Mitteleuropas sind die drei häufigsten Arten *Gammarus fossarum* (Bachflohkrebs, Koch 1835), *Gammarus pulex* (Gemeiner Flohkrebs, Linné 1758) und *Gammarus roeseli* (Flussflohkrebs, Gervais 1835) (Pöckl 1993a). Die Abundanz der genannten Arten wird durch die Beschaffenheit der Gewässer bestimmt: *G. fossarum* gilt als der sensitivste Vertreter und besiedelt schnell fließende Oberläufe sowie Quellregionen und toleriert auch starke Strömung (Pöckl 1993a). In den Mittelläufen größerer Flüsse ist *G. pulex* die dominante Art, kann jedoch auch in Quellen und langsam fließenden Bächen vorkommen. *G. roeseli* besiedelt vor allem träge fließende Flussunterläufe, in welchen abgestorbene

Pflanzenteile und Aas die Nahrungsquelle bilden (Schwab 1995). In Fließgewässern können jedoch weite Bereiche auftreten, in denen beide Arten (*G. pulex* und *G. roeseli*) vorkommen (Pöckl 1993a).

In mitteleuropäischen Fließgewässern besiedeln Flohkrebse den Gewässergrund und den Ufersaum, wo sie sich zwischen Steinen, Wurzelgeflechten und Falllaub aufhalten. Mit Hilfe der fünf Peraeopodenpaare (Schreitbeinpaare) können sie auf dem Untergrund laufen, oder sich mittels der drei Pleopodenpaare (Schwimmbeinpaare) und Bewegungen des Pleons schwimmend fortbewegen (Brehm und Meijering 1996). Die in Mitteleuropa heimischen *Gammarus*-Arten sind nicht besonders bunt oder farbenprächtig, sondern eher unscheinbar bräunlich, grünlich oder gräulich, teilweise orange (Pöckl 2014). Ausgewachsene männliche Flohkrebse können eine Körperlänge von bis zu 23 mm erreichen (Pöckl 2014), Weibchen sind durchschnittlich etwas kleiner (Eggers und Martens 2001, Pöckl 1993a, Schellenberg 1942).

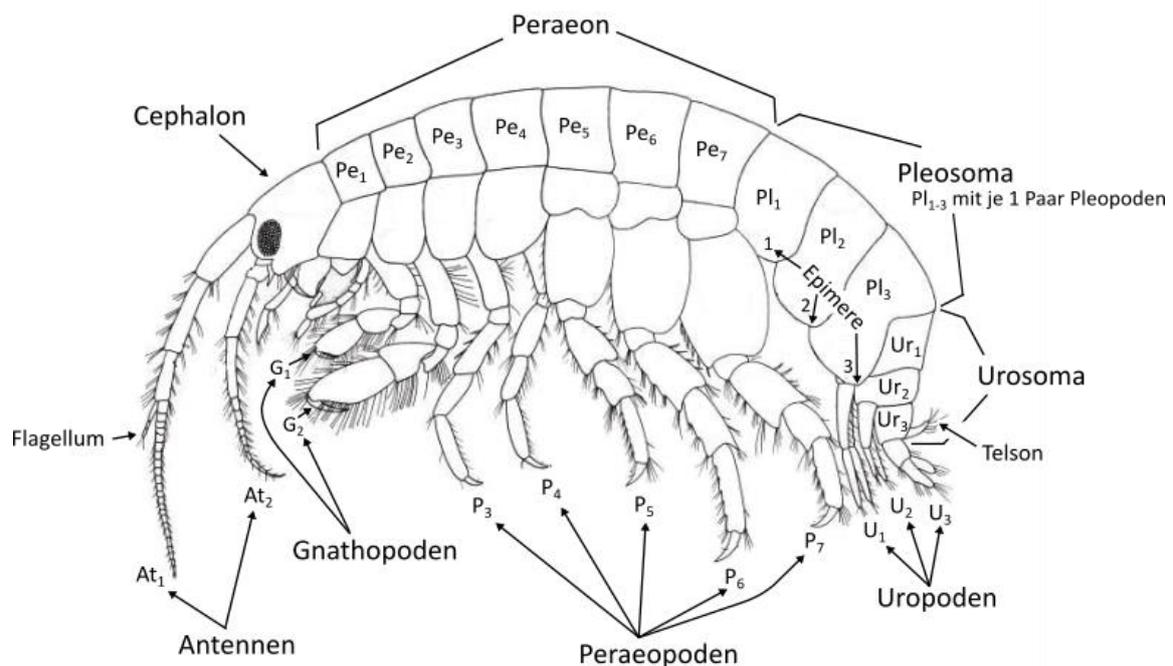


Abbildung 8: Körpergliederung von *Gammarus* sp.: Schematische Darstellung (lateral), verändert nach Chapman (2007). Peraeon bestehend aus sieben Segmenten (Pe₁ – Pe₇); Pleosoma (drei Segmente: Pl₁ – Pl₃) und Urosoma (drei Segmente: Ur₁ – Ur₃) bilden das Pleon (Abdomen). At₁₋₂: 1. und 2. Antenne, G₁₋₂: 1. und 2. Gnathopoden, P₃₋₅: Peraeopoden (Schreitbeinpaare), U₁₋₃: Uropoden. Pleopoden (Schwimmbeinpaare) an Pl₁ – Pl₃ sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Charakteristisch für die Fortpflanzung der Gammariden ist eine „mate-guarding“-Phase vor der eigentlichen Paarung. Kurz vor der Reifehäutung (Parturialhäutung) des Weibchens hakt sich ein Männchen mit seinem ersten Gnathopodenpaar zwischen Cephalothorax und dem ersten Peraeonsegment des Weibchens ein und verharrt dort. Beide bilden nun das sogenannte Präkopula-

Stadium (Abbildung 9 und 10). Dieses Stadium kann je nach Wassertemperatur zwischen mehreren Tagen und mehreren Wochen andauern. Die eigentliche Paarung ist erst nach der Reifehäutung des Weibchens möglich, in der das Marsupium (Brutraum) gebildet wird und sich die beborsteten Oostegite (Brutlamellen) entfalten, welche einen Verlust der Eier verhindern (Pöckl 1993a, Schellenberg 1942, Westheide und Rieger 2013). Ist die Reifehäutung erfolgt, dreht das Männchen das Weibchen so, dass beide ventralseitig über Kreuz zu liegen kommen. In dieser Position entlässt das Männchen die Spermien und leitet sie mit seinen Pleopoden zum Marsupium des Weibchens. Danach trennt sich das Paar wieder. Das Weibchen entlässt nun die Eier ins Marsupium, wo sie befruchtet werden und sich entwickeln (Pöckl 1993a). Die Entwicklungszeit der Eier ist stark temperaturabhängig (Pöckl 1993a) und kann vier bis sechs Wochen betragen (Brehm und Meijering 1996). Nach dem Schlupf verbleiben die Juvenilen noch einen bis wenige Tage im Marsupium („posthatch-time“) (Pöckl 1993a). Danach beginnt eine dreimonatige Juvenilphase im Gewässer, bei der etwa alle zwei Wochen eine Häutung stattfindet (Eggers und Martens 2001). Nach etwa neun bis zehn Häutungen bei einer Körperlänge von sechs bis neun Millimeter erreichen sie dann ihre Geschlechtsreife (Pöckl 1993a). Die Lebensdauer von Gammariden beträgt etwa ein bis zwei Jahre (Eggers und Martens 2001).



Abbildung 9: *Gammarus roeseli*, Präkopula-Stadium. Das Männchen liegt in der oberen Position und hält das Weibchen mit seinem ersten Gnathopodenpaar (siehe Abbildung 10) fest.

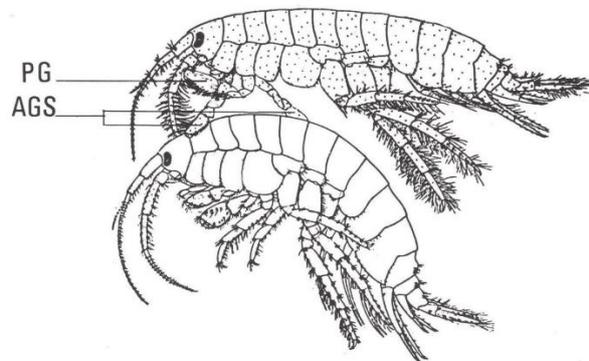


Abbildung 10: Präkopula-Stadium von *Gammarus* sp., Zeichnung aus Borowsky (1984). Männchen gepunktet, Weibchen weiß. Das Männchen hält mit den kleineren anterioren Gnathopoden (AGS) das Weibchen fest, die posterioren Gnathopoden (PG) können währenddessen uneingeschränkt bewegt werden (Borowsky 1984).

Bedeutung für das aquatische Ökosystem und als Monitororganismus

Gammariden spielen in Fließgewässern eine essentielle Rolle beim Abbau von partikulärem organischem Material (Pöckl 2014). Zwar ernähren sie sich omnivor, die Hauptnahrungsquelle bilden jedoch Falllaub und anderes totes Pflanzenmaterial, das in die Gewässer gelangt (Pöckl 1993a,

Schellenberg 1942). Dieses wird zuerst von Mikroorganismen besiedelt und anschließend von Flohkrebse geschreddert. Somit steht es anderen Organismen der Nahrungskette zur Verfügung und die Anhäufung von organischem Material im Gewässer wird verhindert (Pöckl 2014, Schwoerbel 1999). Demzufolge sind Flohkrebse von zentraler Bedeutung für das aquatische Ökosystem und nehmen die Stellung ein, die im terrestrischen Ökosystem den Regenwürmern zukommt (Pöckl 2014).

Mit Ausnahme einer kurzen Reproduktionspause im Spätherbst und Winter sind Gammariden das ganze Jahr über fortpflanzungsfähig (Pöckl 2014). Bis zu Beginn der Reproduktionspause trägt ein Weibchen in etwa einmonatigem Abstand (Eggers und Martens 2001) bis zu sechs Bruten pro Saison aus (Pöckl 1993b). Zwei weitere Male kann das Weibchen in der folgenden Saison brüten (Pöckl 1993b). Dabei nimmt im Laufe der Zeit die Größe der Brut kontinuierlich zu. Pöckl und Humpesch (1990) untersuchten in ihren Studien ausführlich die Reproduktion von Flohkrebse, die in verschiedenen Gewässern in Österreich gesammelt wurden. Für *G. roeseli* zählten sie in fünf Bruten einer Saison 10, 22, 34, 48 und 61 Eier (= 175 Eier pro Saison). Bei optimalen Nahrungsangebot und zwei bis drei weiteren Bruten in der Folgesaison kann ein *G. roeseli* Weibchen während seiner Lebensdauer sogar insgesamt um die 333 Eier produzieren (Pöckl 1993b). Bei 13,5 °C Wassertemperatur betrug der Schlupferfolg der Eier von *G. roeseli* 51 %. In *G. fossarum* entwickelten sich sogar 76 % der gelegten Eier zu juvenilen Gammariden (Wassertemperatur 11,4 °C) (Pöckl und Humpesch 1990). In Abhängigkeit von der Wassertemperatur erreichen die Nachkommen aus der ersten bis zur vierten Brut in derselben Saison die Geschlechtsreife und produzieren selbst noch im gleichen Sommer weitere Nachkommen (Pöckl 1993b). Durch diese ausdauernde Reproduktion und hohen Reproduktionsraten kann der Flohkrebsebestand bei guten Bedingungen leicht eine Dichte von 10.000 Individuen pro Quadratmeter oder mehr erreichen (Pöckl 2014). Somit machen Flohkrebse einen hohen Biomasseanteil von Fließgewässer-Ökosystemen aus. Da sie im unteren Bereich der Nahrungskette stehen, sind sie dadurch insbesondere durch ihre „Funktion“ als Fischnährtiere von großer ökologischer und ökonomischer Bedeutung (Meijering und Pieper 1982, Pöckl 1993a, Pöckl 2014, Schellenberg 1942).

Neben weiteren Aspekten eignen sich Gammariden aufgrund dieser hohen Abundanz hervorragend als Monitororganismen. Sie sind weit verbreitet und kommen „entweder in rauen Mengen oder überhaupt nicht“ (Pöckl 2014) vor. Wenn die Habitat-Anforderungen erfüllt sind, reproduzieren sich Gammariden in großer Zahl. Innerhalb kürzester Zeit können somit eine große Anzahl an Flohkrebse gesammelt werden, wobei daher selbst die Entnahme größerer Stichproben als ökologisch unproblematisch anzusehen ist (Pöckl 1993a, Pöckl 2014). Durch ihre Größe von bis zu 23 mm sind sie mit bloßem Auge gut zu erkennen, im Präkopula-Stadium können die Geschlechter einfach getrennt und brütende Weibchen leicht erkannt werden. Somit sprechen auch diese eher praktischen Gründe, welche die Probenahme und das Handling betreffen, für den Einsatz von Gammariden als

Monitororganismen (Pöckl 2014). Ein letzter wichtiger Aspekt ist außerdem deren Sensitivität. Sie gelten als relativ anspruchsvoll in Bezug auf ihr Habitat (Pöckl 1993a) und reagieren empfindlich auf Beeinträchtigungen der Gewässergüte, gewässerbauliche Maßnahmen und Schadstoffeinträge (Meijering und Pieper 1982, Schirling et al. 2005, Williams et al. 1984). Aufgrund dieser Eigenschaften sind Flohkrebse vielseitig einsetzbar, was sich in einer großen Anzahl veröffentlichter öko(toxiko)-logischer Studien mit Gammariden bemerkbar macht (Andrei et al. 2016, Blarer und Burkhardt-Holm 2016, Brettschneider et al. 2019, Brückner et al. 2018, Buchberger et al. 2018, Bundschuh et al. 2017, Chaumot et al. 2015, Dalhoff et al. 2018, De Castro-Catala et al. 2017, Gerhardt et al. 2007, Gerhardt et al. 2012, Gómez-Canela et al. 2016, Jungmann et al. 2017, Könemann et al. 2019, Langer et al. 2017, Mehennaoui et al. 2016, Munz et al. 2018, Rollin et al. 2018, Rösch et al. 2017, Shahid et al. 2018a, 2018b, Straub et al. 2017, Tatar et al. 2018, von Fumetti und Blaurock 2018, Weber et al. 2018, Wigh et al. 2017, Zubrod et al. 2014).

3.3 Untersuchungsmethoden

Entnahme der Gammariden

An jeder Probestelle wurden mit einem herkömmlichen Küchensieb (1 mm Maschenweite) Gammariden per Handfang entnommen. Laubanhäufungen und ins Wasser hängende Pflanzen der Ufervegetation sowie Wurzelgeflechte von Bäumen und Sträuchern stellen typische Gammaridenhabitate dar, in denen es von Flohkrebse „nur so wurtelt und wimmelt“ (Pöckl 2014). Mit der Hand wurden diese Habitate geschüttelt/aufgewirbelt und die Gammariden im stromabwärts gehaltenen Küchensieb aufgefangen.



Abbildung 11: Hohe Gammaridendichte an Probestelle PS 0 im Mai 2017, es „wurtelt und wimmelt“ (Pöckl 2014). Nach nur wenigen Minuten war das Küchensieb voller Gammariden.



Abbildung 12: Gammariden, randomisiert dem Eimer entnommen, zur Bestimmung des Geschlechterverhältnisses.

Auf diese Art wurden in vielen unterschiedlichen Bereichen der Probestelle Gammariden gesammelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst alle verschiedenen Habitats an einer Probestelle in die Aufnahme miteinbezogen wurden. Alle gesammelten Flohkrebse wurden in einem Eimer zusammengeführt. Aus diesem konnte die für jede Untersuchung erforderliche Anzahl an Individuen randomisiert entnommen werden. Probenahmen wurden bis zu vier Mal pro Jahr, vor und nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese, durchgeführt. Genaue Angaben zu den Probenahmezeitpunkten können Tabelle 2 entnommen werden. Parallel zur Entnahme der Gammariden wurden jeweils limnochemische und limnophysikalische Parameter bestimmt.

Tabelle 2: Probenahmezeitpunkte im Frühling, Sommer und Herbst vor (2010-2012) und nach Ausbau (2014-2017) der Kläranlage (KA) Langwiese. Entnahme der Gammariden und Bestimmung limnochemischer und limnophysikalischer Parameter erfolgten jeweils an den Probestellen der Schussen (PS 0 oberhalb der KA und PS 3 unterhalb der KA) sowie an Probestelle PS 5 am Referenzgewässer Argen.

		Jahreszeit		
	Jahr	Frühling	Sommer	Herbst
Vor KA-Ausbau	2010	19. April	29. Juni 19. August	13. Oktober
	2011	9. Mai	7. Juli	2. September 28. Oktober
	2012	3. Mai	4. Juli	24. Oktober
Nach KA-Ausbau	2014	21. Mai	1. Juli	2. Oktober
	2015	30. Mai	12. August	
	2016	3. Mai		
	2017	18. Mai		

3.3.1 Populationsökologische Untersuchungen

Bestimmung der Art

An allen untersuchten Probestellen wurden 100 Gammariden dem Sammelgefäß randomisiert entnommen und in 2 % Glutardialdehyd (gelöst in 0,005 M Cacodylatpuffer) fixiert und bis zur weiteren Verwendung gekühlt aufbewahrt. Jedes Individuum wurde im Labor unter einem Stereomikroskop in einem mit Fixans gefüllten Blockschälchen morphologisch auf Artniveau bestimmt. *Gammarus roeseli* lässt sich bereits bei genauem Betrachten mit bloßem Auge von den zwei anderen Arten (*Gammarus pulex* und *Gammarus fossarum*) anhand des ausgeprägten Rückenkiels am Pleosoma unterscheiden (Eggers und Martens 2001) (Abbildung 14). Für die Unterscheidung zwischen *Gammarus pulex* und *Gammarus fossarum* (beide ohne ausgeprägte Rückenkielung) wird als Bestimmungsmerkmal die Länge des Innenasts des dritten Uropoden (Schwanzanhänge)

herangezogen (Abbildung 13). Ist der Innenast (innerer Ramus) des dritten Uropoden halb so lang oder weniger als halb so lang wie der Außenast (äußerer Ramus), handelt es sich um *Gammarus fossarum* (Eggers und Martens 2001). Bei *Gammarus pulex* beträgt die Länge des Innenasts mindestens zwei Drittel der Länge des Außenasts (Amann 2003). Auch für *Gammarus lacustris* (Seeflohkrebs, Sars 1863) trafen diese Bestimmungsmerkmale zu. Diese Art ließe sich jedoch anhand der Form des zweiten Epimers und bei männlichen Individuen zusätzlich durch die Dicke und Beborstung des Flagellums der zweiten Antenne gut von *G. pulex* unterscheiden. *Gammarus lacustris* ist aber, wie bereits dem Namen nach zu schließen, fast ausschließlich in stehenden Gewässern verbreitet (Eggers und Martens 2001, Schellenberg 1942), in welchen Algen und Plankton die Nahrungsquelle bilden (Amann 2003). In den untersuchten Bodenseezuflüssen kommt diese Flohkrebsart nicht vor.

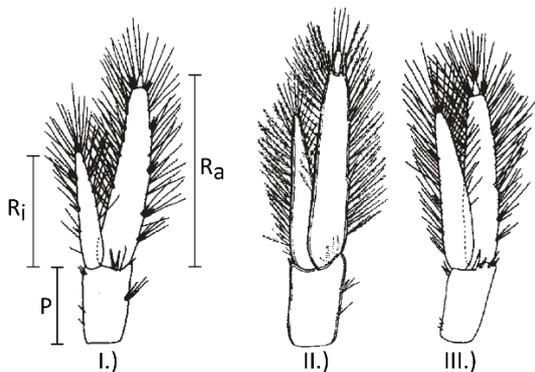


Abbildung 13: Dritter Uropod (Schwanzanhang) von: I.) *Gammarus fossarum*, II.) *Gammarus pulex* und III.) *Gammarus roeseli*. P = Pedunculus, R_i = innerer Ramus (Innenast), R_a = äußerer Ramus (Außenast). Abbildung verändert nach Eggers und Martens (2001).

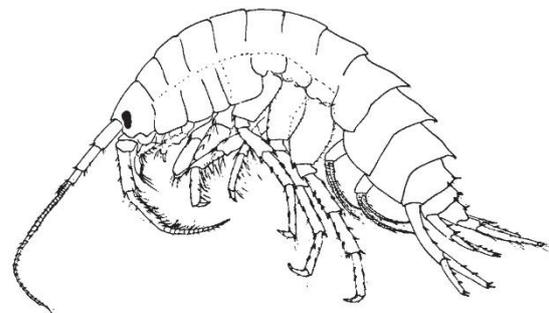


Abbildung 14: *Gammarus roeseli*. Markantes Bestimmungsmerkmal: Rückenkiel (Dorsaldornen) am Pleosoma. Abbildung nach Karaman und Pinkster (1977).

Bestimmung des Geschlechts und der Körperlänge

Nach Bestimmung der Art wurde von allen 100 Gammariden die Körperlänge gemessen. Dazu wurde jedes Individuum mit Hilfe von Federstahlpinzetten vorsichtig auf einem Millimeterpapier gestreckt, bis Cephalothorax, Peraeon, Pleon und Telson in einer Linie lagen. Anschließend wurde die Distanz zwischen vorderem Rand des Rostrums und dem Ende des Telsons (= Körperlänge) ermittelt und notiert. Die Bestimmung des Geschlechts erfolgte anhand der sekundären Geschlechtsorgane. Männchen sind durch zwei Penispapillen am Sternit des siebten Peraeonsegments (Ventralseite, zwischen dem letzten Schreitbeinpaar) erkennbar (Welton 1979) (Abbildung 15). Weibliche Flohkrebsse weisen auf der Ventralseite des ersten bis vierten Peraeonsegments vier Paar Oostegite (Brutlamellen) auf. Diese bilden bei Eiablage das Marsupium (Brutraum) (Sutcliffe 1993) (Abbildung 16). Intersexindividuen sind durch das Auftreten beider äußerer Geschlechtsorgane bestimmbar. Waren

keine äußeren Geschlechtsmerkmale ersichtlich, wurde das Tier als „juvenil“ klassifiziert. Erst nach etwa neun bis zehn Häutungen (bei einer Körperlänge zwischen sechs und neun Millimeter) erreichen die Gammariden ihre Geschlechtsreife (Pöckl 1993b). Davor sind die sekundären Geschlechtsorgane noch nicht soweit ausgebildet, dass eine Bestimmung anhand dieser möglich wäre.

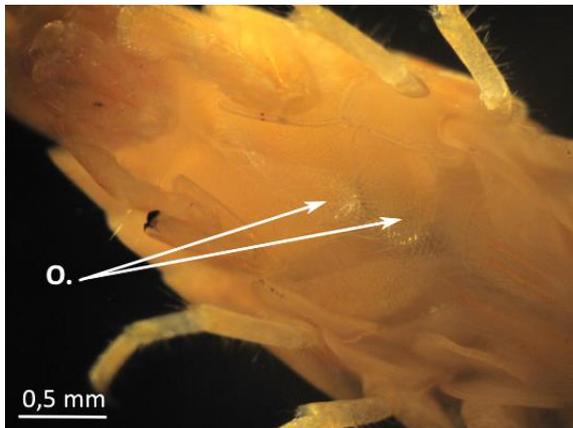


Abbildung 15: *Gammarus pulex*, Weibchen. Äußere Geschlechtsmerkmale. O. = Oostegite (Brutlamellen)

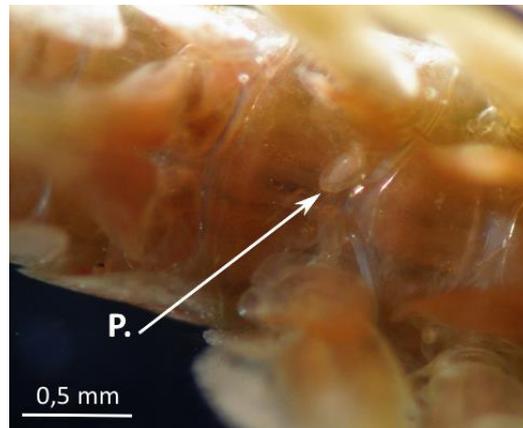


Abbildung 16: *Gammarus pulex*, Männchen. Äußere Geschlechtsmerkmale. P. = Penispapillen

Bestimmung der Fekundität

Um die Fekundität brütender Weibchen an den Probestellen zu bestimmen, wurden 20 brütende Weibchen dem Sammelgefäß entnommen. Brütende Weibchen sind bereits makroskopisch durch das mit Eiern gefüllte Marsupium erkennbar (Abbildung 17). Jedes Weibchen wurde einzeln in 2 % Glutardialdehyd (gelöst in 0,005 M Cacodylatpuffer) fixiert und bis zur weiteren Verwendung gekühlt aufbewahrt. Im Labor wurde zunächst von jedem Weibchen die Körperlänge (Distanz zwischen vorderem Rand des Rostrums und Ende des Telsons) gemessen. Dazu wurden, wie bereits bei der Bestimmung der Geschlechter angegeben, die Weibchen vorsichtig mit Hilfe zweier Federstahlpinzetten auf Millimeterpapier gestreckt. Anschließend wurde jedes Weibchen unter dem Stereomikroskop in einem mit Fixans gefüllten Blockschälchen auf Artniveau bestimmt. Um die Anzahl der Eier zu ermitteln, wurde mit Präparier- und Insektennadeln vorsichtig das Marsupium geöffnet, indem die Oostegite weit zur Seite gebogen wurden. Mit einer Pipette und Fixans aus dem Blockschälchen wurden die Eier aus dem Marsupium gespült, um diese möglichst nicht zu beschädigen (Abbildung 18). Sollten sich noch einzelne Eier im Marsupium befunden haben, wurden diese vorsichtig mit einer Insektennadel entnommen. Aufgrund der „post hatch time“, der Zeit, in der Juvenile auch nach dem Schlüpfen noch im Marsupium verweilen (Pöckl 1993a), können sich Juvenile und frisch gelegte Eier zeitgleich im Marsupium befinden. War dies der Fall, wurden auch sie dem Marsupium entnommen. Alle Eier bzw. Juvenile wurden gezählt, ggf. addiert, und die Summe neben der Länge

eines jeden Weibchens notiert. Mit diesen Angaben konnte nach folgender Formel der Fekunditätsindex (FI) berechnet werden: $FI = \text{Anzahl der Eier bzw. Juvenile} / \text{Körperlänge des Weibchens}$ (Pöckl 1993a). Untersuchungen von Pöckl (1993a) zeigten, dass der Fekunditätsindex bei gleich großen Weibchen verschiedener Art gleich groß ist. Demzufolge konnten für jede Probestelle die Fekunditätsindizes aller brütenden Weibchen, unabhängig ihrer Art, zusammengefasst werden.



Abbildung 17: *Gammarus pulex*, Weibchen. Ventral gelegenes Marsupium (Brutraum) mit Eiern/Juvenilen gefüllt.



Abbildung 18: Herauspräparierte Eier und Juvenile des *Gammarus pulex* Weibchens.

3.3.2 Biochemische Untersuchung

Stressproteinanalyse

Zur Bestimmung des Stressproteinlevels (Hsp70) wurden Flohkrebse verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Probenahme im Präkopula-Stadium befanden. Während der Präkopula, die „mate-guarding“-Phase vor der eigentlichen Paarung (Pöckl 1993a), hält das Männchen mit seinem ersten Gnathopodenpaar das Weibchen am Rücken fest (Borowsky 1984) und befindet sich somit in der Präkopula immer in der oberen Position. Dadurch konnte schnell und einfach das Geschlecht des jeweiligen Gammariden bestimmt werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium, das die Verwendung von Präkopula-Paaren bedingt, stellt das Stressprotein-Grundlevel dar. Dieses ist in fast jedem Organismus nachweisbar (Lewis et al. 1999, Sanders 1993), variiert jedoch innerhalb eines Reproduktionszyklusses in Gammariden (Schirling et al. 2004). Durch die Verwendung von Präkopula-Paaren wurde sichergestellt, dass sich alle zu untersuchenden Individuen im gleichen Entwicklungsstadium befanden und sich demnach nicht in ihrem Stressprotein-Grundlevel voneinander unterschieden. Da Untersuchungen von Sures und Radszuweit (2007) und Sures (2008a) gezeigt haben, dass eine Parasitierung mit Acanthocephala (Kratzer) das Stressprotein-Grundlevel in Gammariden beeinflussen kann, wurden zudem nur Individuen verwendet, welche äußerlich sichtbar nicht parasitiert waren. Bei

mit Kratzern parasitierten Individuen ist der Parasit als gelber, orangener oder roter Fleck auf der Dorsalseite des Gammariden erkennbar (Abbildung 19a und 19b).

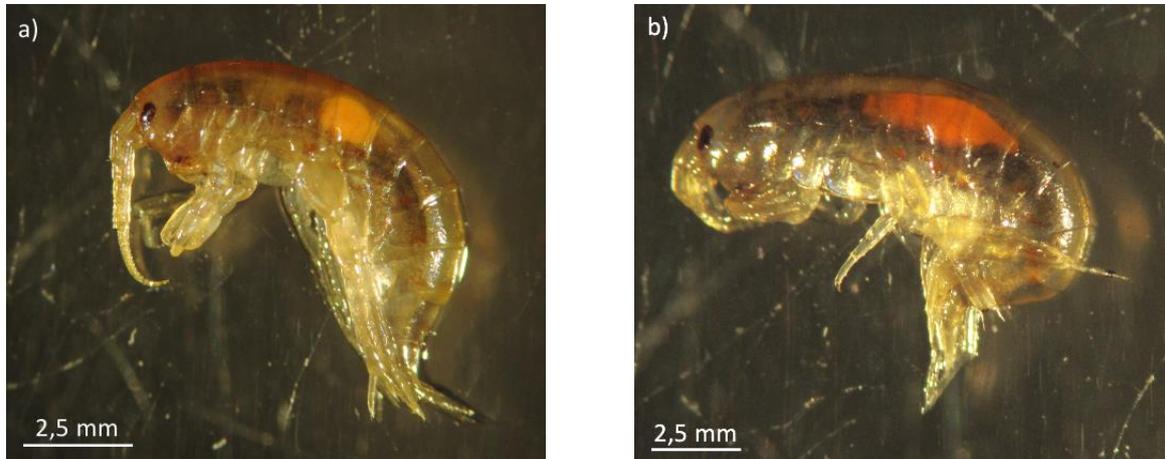


Abbildung 19 a) und b): *Gammarus pulex* parasitiert mit Acanthocephala (Kratzer) an Probestelle 3 an der Schussen (19a) und Probestelle 5 an der Argen (19b). Grobe Artbestimmung anhand der Färbung des Parasiten: 19a) *Pomphorhynchus laevis* (Endwirt: Fische) erscheint als gelb bis gelborangener Fleck auf der Dorsalseite; 19b) *Polymorphus minutus* (Endwirt: Wasservogel) ist dagegen viel dunkler orange bis rötlich gefärbt (Bollache et al. 2001, Cézilly et al. 2000).

An jeder Probestelle wurden 40 Gammariden im Präkopula-Stadium (= 20 Paare) dem Sammeleimer entnommen. Rein makroskopisch wurde von jedem Paar die Art bestimmt. Da in langjährigen Erhebungen von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor, Starzach) in Schussen und Argen an den untersuchten Probestellen fast ausschließlich *Gammarus roeseli* und *Gammarus pulex* auftraten, wurde lediglich zwischen *G. roeseli* (Rückenkielung vorhanden) und *G. pulex* (ohne Rückenkielung) differenziert. Die Unterscheidung zwischen *G. pulex* und *G. fossarum* ist nur anhand der Betrachtung der Äste des dritten Uropoden möglich. Dies ist am lebenden Tier kaum durchführbar und sollte in Anbetracht des dadurch entstehenden immensen Stresses, welcher die Ergebnisse der Stressproteinanalyse verfälscht hätte, vermieden werden. Männchen und Weibchen wurden mittels Federstahlpinzette vorsichtig voneinander getrennt, auf einem Papiertuch trockengetupft und zügig einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Organismen im Labor bei -80 °C gelagert.

Die relativen Stressprotein-Hsp70-Level wurden über ein Immunoblotting-Verfahren ermittelt, in welchem durch Reaktionen mit zwei aufeinanderfolgenden Antikörpern die Proteinbanden per Farbreaktion sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch quantifiziert wurden. Um einen Abbau der Proteine zu verhindern, wurden die Proben während der folgenden Arbeitsschritte ständig auf Eis gehalten. Aufgrund der geringen Größe wurden von jedem Tier Ganzkörperhomogenate hergestellt. Dazu wurden die Proben mit einem Extraktionsgemisch aus 80 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 20 mM Hepes und 2 % Proteasehemmer (Protease inhibitor cocktail, Sigma-

Aldrich) versetzt (Weibchen: 60 µL; Männchen: 80 µL), mechanisch mit einem Stößel homogenisiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 20.000 rcf, 10 min). Aus dem erhaltenen Überstand wurden 5 µL entnommen und die Menge an Gesamtprotein anhand der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Der restliche Überstand wurde im Verhältnis 1:3 mit SDS-Probenpuffer (Glycerin, Natriumdodecylsulfat (SDS), β-Mercaptoethanol, 10 mM Tris pH 7, Bromphenolblau) gemischt, für 5 min bei 96-100 °C erhitzt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Auftrennung des mit SDS versetzten Proteingemischs erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 12 % Acrylamid / Bisacrylamid pH 8,8) wobei je Probe 80 µg Gesamtprotein aufgetragen wurde. Mittels semi-dry-Blotting Verfahren (Westernblot) wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu besetzen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Transfer für 1,5 Stunden in einer Absättigungslösung (50 % Pferdeserum, 50 % TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5)) bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 5 min in TBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Nitrozellulosemembran in einer ersten Antikörperlösung (mouse anti-human Hsp70, Verdünnung 1:5000 in 10 % Pferdeserum und TBS) über Nacht inkubiert. Nach dem nächsten Waschschrift (5 min in TBS) wurde die Membran in einer zweiten Antikörperlösung (goat anti-mouse IgG konjugiert an Peroxidase, Verdünnung 1:1000 in 10 % Pferdeserum und TBS) für 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS (5 min) wurden die Proteinbanden in einer Färbelösung (1 mM 4-chloro(l)naphtol, 6 % Methanol, 30 mM Tris pH 8,5, 0,015 % H₂O₂) auf der Basis der durch die Peroxidase des 2. Antikörperkomplexes katalysierten Farbreaktion sichtbar gemacht. Die gefärbte Membran wurde eingescannt und das optische Volumen der Proteinbanden densitometrisch quantifiziert (Image Studio Lite, 4.0.21, LI-COR Inc.). Die erhaltenen Werte wurden in Relation zu einem in jedem Gel parallel doppelt aufgetragenem Standard (*Danio rerio*, Ganzkörperhomogenat) gesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

3.4 Limnologische Untersuchungen

Begleitend zur Entnahme der Flohkrebse wurden an jeder Probestelle limnologische Untersuchungen durchgeführt. Vor Ort, direkt in der Strömung, wurden die Wassertemperatur, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert sowie Sauerstoffgehalt und -sättigung mithilfe eines Multimeters (HQ40D portables 2-Kanal Multimeter, Hach Lange GmbH) gemessen. Zur Bestimmung limnochemischer Parameter wurden an jeder Probestelle Wasserproben aus der Strömung entnommen. Diese wurden gekühlt transportiert und am Ende jeder Probenahmekampagne umgehend analysiert. Mittels Rundküvettestests (NANOCOLOR®, Machery-Nagel) wurden die Gehalte an Nitrat-Stickstoff, Nitrit-Stickstoff und Ammonium-Stickstoff sowie Ortho-Phosphat-Phosphor und Chlorid photometrisch (Kompaktphotometer PF-12, Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt. Die Bestimmung der Gesamt- und Carbonathärte erfolgte titrimetrisch mittels Tröpfchentests (MColortest™, Merck). Nach erfolgter

Analyse wurden die Ergebnisse anhand der Oberflächengewässerverordnung (OGewV 2011) und nach den Orientierungswerten der LAWA (Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser) (LUBW 2008) eingestuft.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand der Software JMP (SAS Institute Inc., Version 14.0.0). Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($\alpha=0,05$) festgelegt.

Artenverteilung: Um Unterschiede hinsichtlich der Artenverteilung zwischen den einzelnen Probestellen zu ermitteln, wurde ein Likelihood-Ratio χ^2 -Test mit anschließenden paarweisen Vergleichen (Fisher's exact test) angewandt. Anschließend wurde für multiples Testen mit der sequenziellen Bonferroni-Holm Methode korrigiert.

Geschlechterverhältnis: Für jede Probestelle wurde das Verhältnis von Männchen zu Weibchen berechnet. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Verteilung der Arten an den einzelnen Probestellen wurden für die Betrachtung dieses Parameters beide *Gammarus*-Arten zusammengefasst, um eine ausreichend große Stichprobengröße zu erhalten. Anschließend wurde mittels Likelihood-ratio χ^2 -Test mit anschließender sequentieller Bonferroni-Holm Korrektur überprüft, ob sich das für die Probestelle errechnete Verhältnis signifikant von einem Verhältnis von 1:1,5 (Verteilung der Männchen zu Weibchen) unterscheidet. Das für diesen Parameter gesetzte Verhältnis von 1:1,5 wurde aufgrund der Ergebnisse von Ladewig et al. (2006) gewählt. Deren Untersuchungen haben gezeigt, dass das Geschlechterverhältnis in Gammaridenpopulationen auch unter normalen Bedingungen, also in eher unbelasteten Gewässern, von einer 1:1 Verteilung der Männchen zu Weibchen abweichen kann. In Gammaridenpopulationen in einem geringfügig belasteten Fluss in Baden-Württemberg betrug das Verhältnis von Männchen zu Weibchen 1:1,5 (Ladewig et al. 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen kann an den Probestellen der Schussen eine signifikante Abweichung des Verhältnisses von Männchen zu Weibchen von 1:1,5 auf Effekte, die durch den Einleiter der Kläranlage Langwiese verursacht werden, hindeuten.

Fekundität: Für jedes Weibchen wurde der Fekunditätsindex (= Anzahl der Eier bzw. Juvenilen / Körperlänge des Weibchens) berechnet. Pöckl (1993a) zeigte in seinen Studien, dass der Fekunditätsindex von *Gammarus*-Weibchen unterschiedlicher Art bei gleicher Körpergröße gleich groß ist. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden pro Probestelle die Fekunditätsindizes aller 20 Weibchen zusammengefasst, da aufgrund der hohen Varianz in der Artenverteilung für eine gesonderte Betrachtung jeder Art die Stichprobengröße für ein aussagekräftiges Ergebnis nicht ausreichend gewesen wäre. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen zu ermitteln, wurde zunächst der Datensatz auf Normalverteilung (Shapiro Wilk Test) und Varianzhomogenität (Levene's Test) überprüft. Lag eine Normalverteilung und Varianzhomogenität der Daten vor, wurden die Probestellen

mittels one-way ANOVA gekoppelt an einen Tukey Kramer HSD Post Hoc Test verglichen. Im Falle von normalverteilten Daten mit inhomogenen Varianzen wurde zum Vergleich der Probestellen ein Welch's t-Test mit anschließender sequentieller Bonferroni-Holm Korrektur angewandt. Lagen die Daten in nicht normalverteilter Form jedoch mit homogener Varianz vor, wurden die Probestellen mittels eines Kruskal-Wallis Tests gefolgt von einem Steel-Dwass Post Hoc Test miteinander verglichen. Stressprotein Hsp70-Level: Für jede analysierte Probe wurde der relative Hsp70-Gehalt (relativ zu einem parallel laufenden Standard) berechnet. Anschließend wurde der Datensatz auf dieselbe Methode, welche bereits bei Auswertung der Fekundität angewandt wurde, statistisch analysiert.

3.6 Zusätzliche Untersuchungen des Makrozoobenthos

Im Rahmen der Verbundprojekte SchussenAktiv, SchussenAktiv*plus* und SchussenAktiv*plus+* wurde von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) das Makrozoobenthos an verschiedenen Probestellen der Schussen sowie an einer Referenzstelle an der Argen untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Makrozoobenthos sind Bestandteil der in dieser Arbeit aufgeführten Publikationen, insbesondere der Kapitel 3 bis 5. Alle weiteren Untersuchungsmethoden der Projektpartner, welche vor allem in Kapitel 1 und 2 im Rahmen der Projektvorstellung dargestellt wurden, werden hier nicht näher erläutert.

Zwei Mal pro Jahr wurde Makrozoobenthos an den in Abbildung 7 dargestellten Probestellen entnommen. Vor dem Ausbau der Kläranlage fanden die Untersuchungen in den Jahren 2012 (29. April und 6. Oktober) und 2013 (20. Mai und 9. Oktober) statt. Nach Ausbau der Kläranlage wurden Untersuchungen in den Jahren 2014 (11. April und 4. Oktober), 2015 (11. Juni und 3. Oktober) und 2016 (9. Juli und 8. Oktober) durchgeführt.

Untersuchungen des Makrozoobenthos erfolgten gemäß der Methode der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG (WRRL) (Europäische Union 2000). Hierbei wurden die Aufnahmen flächen- und substratbezogen nach den Vorgaben des Multi-Habitat-Sampling Verfahrens durchgeführt: Zuerst erfolgte eine Kartierung der verschiedenen Substrate in 5 %-Stufen; anschließend wurden 20 Teilproben (à 25x25 cm), paritätisch zu den vorhandenen Substraten, mit Hilfe eines Surber-Samplers (500 µm Maschenweite, ISO 8265) entnommen und zu einer Gesamtprobe vereinigt (=1,25 m²). Um das maximal mögliche Arteninventar der Schussen und Argen zu erfassen und larval schwierig zu bestimmende Taxa determinieren zu können, wurden zusätzlich Adultfänge mittels Kescherung der Ufervegetation und Lichtfallen durchgeführt (Wurm 2017). Die entnommenen Proben wurden im Gelände lebend sortiert und in 70 % Ethanol fixiert. Die anschließende taxonomische Bestimmung im Labor wurde mindestens bis zum Niveau der operationellen Taxaliste (Haase et al. 2004) vorgenommen. Die ökologische Qualität der Schussen wurde nach dem Bewertungssystem „Perlodes“ mithilfe der Bewertungssoftware ASTERICS (AQEM/STAR Ecological River Classification

System 4.04) ermittelt: Für jede Probestelle wurde die Abundanz aller makrozoobenthischer Organismen berechnet (Individuen pro m²), die Gesamtaxazahl (Haase et al. 2004), EPT-Taxa (Ephemeropteren, Plecopteren und Trichopteren) und Anzahl sensibler Taxa (nach Fauna Aquatica Austriaca (Moog et al. 2017)) bestimmt sowie der Saprobienindex (Rolauffs et al. 2003) berechnet.

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Effektmonitoring mit limnischen Wirbellosen, Inhalt der vorliegenden Arbeit, wurde zeitlich gestaffelt durchgeführt. Die folgenden fünf Kapitel bauen aufeinander auf, und die Ergebnisse werden chronologisch von der Integration der vorliegenden Arbeit in das Gesamtprojekt bis zu den Langzeiteffekten der Pulveraktivkohlestufe vier Jahre nach deren Inbetriebnahme vorgestellt. Der Inhalt der einzelnen Kapitel sowie entsprechende Zusatzinformationen und Fortschritte können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Kapitel 1 – 5 der vorliegenden Arbeit: Inhalt, Zusatzinformationen und Fortschritte

Kapitel	Inhalt	Zusatzinformationen, Fortschritte
1	Integration der vorliegenden Arbeit in das Gesamtprojekt	Vorstellung der weiteren Untersuchungen und Kooperationspartner
2	Ergebnisse aller Projektteile vor dem Ausbau der Kläranlage	Herstellung von Zusammenhängen zwischen ausgewählten Ergebnissen in limnischen Wirbellosen und den Ergebnissen weiterer Projektteile vor dem Ausbau der Kläranlage
3	Spezifische Ergebnisse für Gammariden und Makrozoobenthos vor dem Ausbau der Kläranlage	Ausführliche Darstellung der Endpunkte Geschlechterverhältnis, Fekundität, Parasitierung und Stressproteingehalt in Gammariden sowie Abundanz, sensitive Taxa und Saprobienindex innerhalb des Makrozoobenthos vor dem Ausbau der Kläranlage
4	Kurzzeiteffekte in limnischen Wirbellosen zwei Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage	Vergleich zwischen den Ergebnissen in Gammariden/Makrozoobenthos vor dem Ausbau der Kläranlage und zwei Jahren danach
5	Langzeiteffekte der Pulveraktivkohlestufe bis 2017 (vier Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage)	Statistische Gesamtanalyse aller mit limnischen Wirbellosen erhobenen Daten, von 2010 bis 2017. Geschlechterverhältnis in Gammariden: Nichtlineare Regression des Unterschieds zwischen PS 3 und PS 0. Makrozoobenthos: Ähnlichkeitsanalysen (ANOSIM, Analysis of Similarity) und graphische Darstellung durch NMDS-Plots (Nichtmetrische multidimensionale Skalierung).

Kapitel 1: SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany

Triebskorn R, Amler K, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung J-M, Kneipp S, Köhler H-R, Kraus S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J and Wurm K (2013)

Environmental Sciences Europe 25: 2. DOI: 10.1186/2190-4715-25-2

Das erste Kapitel beschreibt Aufbau und Ziele des Verbundprojekts „SchussenAktivplus“ und bildet somit den Rahmen der vorliegenden Arbeit. Das Projekt „SchussenAktivplus: Reduktion von Mikroverunreinigung und Keimen zur weiteren Verbesserung der Gewässerqualität, des Bodenseezuflusses Schussen“ wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), mit Unterstützung des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UM-BW), unter der Fördermaßnahme RiSKWa - Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf, mit einer Projektlaufzeit von 2012 bis 2015 gefördert. Das Hauptziel des Projekts war die Untersuchung und anschließende Bewertung unterschiedlicher Reinigungstechnologien auf Kläranlagen und Regenentlastungen hinsichtlich deren Effizienz zur Verminderung des Eintrags von Mikroschadstoffen und Keimen in Fließgewässer. Die Untersuchungen fanden, begleitend zum Ausbau der Kläranlage Langwiese (AZV Mariatal, Ravensburg) mit einer vierten Reinigungsstufe, im Bodenseezufluss Schussen als Modell für ein durch Abwasser beeinflusstes Gewässer mit großem Einzugsgebiet, statt. Parallel wurden Untersuchungen an der Argen durchgeführt, die aufgrund der relativ geringen Schadstoffbelastung als Referenzgewässer gewählt wurde.

Wie auch im Vorgänger-Projekt „SchussenAktiv“ stand die Kläranlage Langwiese im Zentrum der Untersuchungen, jedoch wurde der Fokus im Projekt „SchussenAktivplus“ erweitert und mehrere unterschiedliche Reinigungssysteme in Abwasser- und Mischwasseranlagen untersucht. Neben der Kläranlage Langwiese waren dies die Kläranlagen (KA) Eriskirch und Merklingen sowie das Regenüberlaufbecken (RÜB) Mariatal und der Retentionsbodenfilter (RBF) Tettngang. Die an der Schussen gelegene KA Langwiese war ein Modell für eine große Kläranlage mit 170.000 Einwohnerwerten (EW). Im Oktober 2013 wurde der großtechnische Ausbau mit einer Pulveraktivkohlestufe abgeschlossen und diese vollständig in Betrieb genommen. Die KA Eriskirch, ebenfalls an der Schussen gelegen, wurde als Modell einer mittelgroßen KA (40.000 EW) gewählt. Hier wurde eine Pilotanlage mit Ozonierung, granulierter Aktivkohle und Sandfilter installiert. Die KA Merklingen, welche als einziges Testsystem außerhalb des Bodensee-Einzugsgebiets lag, galt als Modell für eine kleine Kläranlage mit 2.400 EW.

Hier konnte der großtechnische Einsatz von Ozon vor einem bereits bestehenden Langsandsandfilter untersucht werden. Auch innerhalb der untersuchten Mischwasserentlastungssysteme kamen verschiedene Technologien zum Einsatz. Im RÜB Mariatal bei Ravensburg wurde ein Lamellenklärer zum Feststoffrückhalt installiert. Mit dem RBF Tettnang wurde ein bestehender Retentionsbodenfilter als ein Modell für ein biologisches System nach mehreren vorgeschalteten RÜBs auf seine Effektivität getestet. In allen Testsystemen wurden in verschiedenen Abschnitten des Reinigungsprozesses Wasserproben entnommen.

Um die Auswirkungen weiterführender Reinigungsstufen auf die Biota und das Ökosystem der Schussen zu untersuchen, wurden vier Probestellen an der Schussen, ober- und unterhalb der KA Langwiese und Eriskirch sowie des RÜB Mariatal, und eine Referenzstelle an der Argen gewählt. An diesen Stellen wurden Oberflächenwasser- und Sedimentproben entnommen sowie durch passives Monitoring auch Fische (*Leuciscus cephalus* (Döbel) und *Alburnoides bipunctatus* (Schneider)), Flohkrebse und Makrozoobenthos untersucht. Neben dem passiven Monitoring an den Freilandprobestellen wurde zusätzlich ein aktives Monitoring mit *Salmo trutta* f. *fario* (Bachforelle) und *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle) durchgeführt, um die Effekte des Ablaufs der KA Langwiese breit gefächert zu bestimmen. Hierzu wurden zwei Bypass-Stationen, eine an der Schussen und eine an der Argen, installiert. In jeder Station befanden sich fünf Aquarien, durch die Flusswasser geleitet wurde. Hier konnten Forellen, Forelleneier und daraus geschlüpfte Jungfische sowie Schnecken gehalten werden. Zusätzlich wurden Forellen in Schwimmkäfigen direkt in der Schussen ober- und unterhalb des Einleiters der KA Langwiese aktiv exponiert. Auch der Ablauf der KA Eriskirch wurde mittels aktivem Monitoring mit Regen- und Bachforellen detaillierter untersucht. Hier wurden Aquarien in der Kläranlage installiert, durch die zum einen der herkömmliche KA-Ablauf und zum anderen der aus der Modellanlage (Ozon, granuliert Aktivkohle und Sandfilter) geleitet wurde.

Die durch diese Verfahren gewonnenen Abwasser-, Oberflächenwasser-, Sediment- und Biotaprobe wurden anhand verschiedener chemischer, mikrobiologischer und ökotoxikologischer Methoden untersucht. Die Aufgaben der daran beteiligten Projektpartner sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Angewandte Methoden einzelner Projektpartner zur Untersuchung gewonnener Abwasser-, Oberflächenwasser-, Sediment- und Biotaprobe im Rahmen des Projekts „SchussenAktivplus“

	Verantwortliche Projektpartner	Angewandte Methoden
Analytik	DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW) Karlsruhe	→ Chemische Analytik (> 150 Spurenstoffe) von Abwasser-, Oberflächenwasser-, Sediment- und Fischproben
	Institut für Seenforschung (ISF) Langenargen	→ Mikrobiologische Analytik von Fäkalkeimen in Abwasser-, Oberflächenwasser- und Sedimentproben
	Karlsruher Institut für Technologie (KIT)	→ Mikrobiologische Analytik antibiotikaresistenter Stämme von <i>E. coli</i> , Enterokokken und Staphylokokken
Untersuchung von Wirkpotentialen	Eberhard Karls Universität Tübingen	→ Early-Life-Stage Test mit <i>Danio rerio</i> (Entwicklungstoxische Potentiale)
	Goethe-Universität Frankfurt am Main	→ umu-Test und Ames-Fluktuationstest mit <i>Salmonella typhimurium</i> (Genotoxische Potentiale) → Reporteragenassay (YDS) (Dioxin-ähnliche Potentiale) → Zellkulturtest mit Vertebratenzelllinien (Zytotoxische Potentiale) → Wachstums-Inhibitionstest mit <i>Lumbriculus variegatus</i> (Entwicklungstoxische Potentiale) → Wachstums-Inhibitionstest mit <i>Lemna minor</i> (Phytotoxische Potentiale) → Reporteragenassay (YES, YAES, YAS, YAAS) und Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Endokrine Potentiale)
	Research Centre for Toxic Compounds in the Environment (RECETOX), Brno	→ Reporteragenassay mit Ratten-Zelllinie H4IIE.luc (Dioxin-ähnliche Potentiale) → Reporteragenassay mit Mammakarzinomzelllinie, HeLa- Zelllinie und MDA-kb2-Zellen (Endokrine Potentiale)
	Universität Stuttgart	→ E-Screen-Assay (Endokrine Potentiale)
Untersuchung von Wirkungen	Eberhard Karls Universität Tübingen	Untersuchungen mit Fischen: → Mikrokern-Test (Genotoxische Effekte) → EROD Assay (Cytochrom P4501A1) (Dioxin-ähnliche Toxizität) → Histopathologie (zytotoxische Effekte) → Early-Life-Stage-Test (entwicklungstoxische Effekte) → Stressprotein-Analyse (proteotoxische Effekte) → Vitellogeninanalyse, Gonadenhistologie, Gonadosomatischer Index (endokrine Effekte) *Untersuchungen mit Flohkrebse: → Stressprotein-Analyse (proteotoxische Effekte) → Geschlechterverhältnis in Flohkrebpopulationen und Fekunditätsindizes brütender Weibchen (endokrine Effekte)
	Universität Avignon	→ Acetylcholinesterase-Inhibition in Fischen (neurotoxische Effekte)
	Gewässerökologisches Labor Starzach	→ *Makrozoobenthos (Effekte in der Biozönose)

*Bestandteil der vorliegenden Arbeit

Die chemische Analyse von über 150 Spurenstoffen (darunter Pharmazeutika, Schwermetalle und Zuckeraustauschstoffe) erfolgte in Abwasser-, Oberflächenwasser-, Sediment- und Fischproben. Auf mikrobiologischer Ebene wurden in Abwasser-, Oberflächenwasser- und Sedimentproben die Konzentrationen an Fäkalkeimen (*Escherichia coli* und intestinale Enterokokken) bestimmt. Zusätzlich wurde in Abwasser- und Oberflächenwasserproben nach antibiotikaresistenten Stämmen von *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken gesucht.

Um Rückschlüsse auf potentielle toxische und endokrine Wirkungen des Ab- und Oberflächenwassers sowie Sediment zu ziehen, wurden mit diesen Proben zudem *in vitro* und *in vivo* Wirkpotentialtests durchgeführt. Genotoxische Potentiale wurden *in vitro* anhand des umu-Tests und Ames-Fluktuationstests mit *Salmonella typhimurium* bestimmt. Potentielle Dioxin-ähnliche Toxizität wurde *in vitro* mittels zwei verschiedener Reporterger-Assays, unter Verwendung von Hefezellen (Yeast Dioxin Screen YDS) und der Ratten-Zelllinie H4IIE.luc, untersucht. Um zytotoxische Potentiale zu bestimmen, wurden *in vitro* Zellkulturtests mit Vertebratenzelllinien (HR3: Hypophysenzellen der Ratte; RTL-W1: Leberzellen der Regenbogenforelle) durchgeführt. Entwicklungstoxische Potentiale wurden *in vivo* anhand des Early-Life-Stage Tests mit *Danio rerio* (Zebrafisch) und des Wachstums-Inhibitionstests mit *Lumbriculus variegatus* (Glanzwurm) bestimmt. Für die Untersuchung phytotoxischer Potentiale *in vivo* wurde der Wachstumsinhibitionstest mit *Lemna minor* (Kleine Wasserlinse) durchgeführt. Zur Bestimmung endokriner Potentiale *in vitro* wurden verschiedene Methoden angewandt. Östrogene Potentiale wurden anhand verschiedener Reportergerassays (mit Hefe (YES: Yeast Estrogen Screen), Mammakarzinomzelllinie und HeLa-Zelllinie (humane Zervixkarzinomzelllinie)) sowie anhand von E-Screen-Assays mit humanen Brustkrebszellen bestimmt. Anti-Östrogene Potentiale, Androgene Potentiale und Anti-Androgene Potentiale wurden ebenfalls anhand verschiedener Reportergerassays bestimmt: mit Hefezellen (YEAS Yeast Anti Estrogen Screen = Anti-Östrogene Potentiale; YAS Yeast Androgen Screen = Androgene Potentiale; YAAS Yeast Androgen Screen = Anti-Androgene Potentiale), mit Mammakarzinomzelllinie und HeLa-Zelllinie (Androgene Potentiale) sowie mit humanen Brustkrebszellen MDA-kb-2 (Androgene und Anti-Androgene Potentiale). *In vivo* wurden endokrine Potentiale (Östrogenität) mit dem Reproduktionstest mit *Potamopyrgus antipodarum* (Zwergdeckelschnecke) untersucht.

Um neben den potentiell zu erwartenden Wirkungen auch die tatsächlichen toxischen und endokrinen Wirkungen in Fischen und Fischnährtieren (direkt aus dem Freiland entnommen oder gegenüber Flusswasser exponiert) in Schussen und Argen zu untersuchen, wurden verschiedene Biomarkeranalysen durchgeführt. Genotoxische Effekte wurden anhand des Mikrokern-Tests in Fisch-Erythrozyten bestimmt. Dioxin-ähnliche Toxizität wurde anhand des EROD Assays in Fischen untersucht. Um zytotoxische Effekte zu bestimmen, wurden histopathologische Untersuchungen von verschiedenen Fischorganen (Leber, Niere, Kieme) durchgeführt. Entwicklungstoxische Effekte wurden

mittels Early-Life-Stage-Test mit Bach- und Regenbogenforelleneiern und -larven, welche in den Bypässen gehältert wurden, bestimmt. Analysen des Stressprotein Hsp70 Levels in Fischen und Fischnährtieren (Gammariden) ließen Rückschlüsse über proteotoxische Effekte zu. Die Daten der Stressproteinanalyse in Gammariden sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation. Mittels Messung der Acetylcholinesterase-Inhibition in Fischen wurden neurotoxische Effekte bestimmt. Endokrine Effekte (sowohl (Anti)-Östrogenität als auch (Anti)-Androgenität) wurden sowohl in Fischen als auch in Fischnährtieren bestimmt. Mittels Vitellogeninanalysen, Gonadenhistologie und Bestimmung der Gonadosomatischen Indizes konnten endokrine Effekte in Fischen nachgewiesen werden. In Fischnährtieren wurden endokrine Wirkungen auf der Basis der Veränderungen des Geschlechterverhältnisses in Flohkrebpopulationen sowie der Fekunditätsindizes brütender Weibchen bestimmt. Diese Untersuchungen sind Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Damit Rückschlüsse über mögliche Effekte des Kläranlageneinleiters nicht nur hinsichtlich einzelner Organismen gezogen, sondern auch die Auswirkungen auf ganze Lebensgemeinschaften berücksichtigt werden konnten, wurde an den Freilandprobestellen parallel zu allen bereits genannten Analysen die Integrität des Makrozoobenthos untersucht. Hier wurden verschiedene Endpunkte betrachtet, wie beispielsweise die Anzahl sensibler Taxa oder der Saprobienindex. Die gewonnenen Ergebnisse wurden in die Kapitel 3 bis 5 der vorliegenden Arbeit integriert.

Gegen Abschluss des Projektes, als die Probenahmekampagne beendet und die verschiedenen Untersuchungen abgeschlossen waren, wurde der gesamte Datensatz statistisch analysiert. Dadurch konnte ein Gesamtbild erstellt und der Erfolg für jede einzelne Maßnahme zusammenfassend dargestellt werden. Anhand der Untersuchungen an Fischen, Flohkrebse und der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft direkt im Ökosystem wurde zudem die ökologische Relevanz einer jeden Maßnahme beurteilt. Alle ermittelten Ergebnisse flossen in Kosten-Nutzenabschätzungen für das Einzugsgebiet der Schussen ein. Es konnte abgeschätzt werden, in welchem Maß Spurenstoffe und Keime reduziert werden können, und welche Aufwendungen dafür notwendig sind. Neben den genannten wissenschaftlichen und technischen Untersuchungen und Erkenntnissen war aber auch das Thema Öffentlichkeitsarbeit ein wichtiger Aspekt des Projekts. Mit Informationsflyern und einer eigenen Projekthomepage wurden das Projekt „SchussenAktivplus“ und die gewonnenen Ergebnisse der breiten Öffentlichkeit vorgestellt und anhand verschiedener Vorträge auf Tagungen und diversen Publikationen auch im wissenschaftlichen Bereich veröffentlicht.

Kapitel 2: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg

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

Korrespondenz Wasserwirtschaft Nr. 8: 427-436. DOI: 10.3243/kwe2013.08.001

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Projektes „SchussenAktiv: Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Monitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese“ - das Initialprojekt des im ersten Kapitel beschriebenen weiterführenden Verbundprojekts „SchussenAktivplus“ und dessen Fortsetzung „SchussenAktivplus+“ - vorgestellt. Die Ergebnisse werden für eine Probestelle an der Schussen (PS 3), unterhalb der Kläranlage, und einer Probestelle an der Argen (PS 4), als Referenz, beschrieben. Hier wurden im passiven Monitoring Oberflächenwasser- und Sedimentproben sowie zwei heimische Fischarten (Döbel und Schneider) und Flohkrebse entnommen. Im aktiven Monitoring wurden in mit Flusswasser durchströmten Aquarien in Bypässen an der Schussen (Gunzenhaus, unterhalb der Kläranlage Langwiese) und Argen (Pflegelberg) Regen- und Bachforellen gehältert und Embryotests mit Forelleneiern durchgeführt. Zudem wurden von 2009-2011 zu neun Zeitpunkten 24h-Mischproben vom Ablauf der Kläranlage Langwiese entnommen. Alle entnommenen Proben wurden nach der in Kapitel 1 beschriebenen Methodenpalette bearbeitet. Somit konnten die Ergebnisse aus chemischer Analytik, toxischen und endokrinen Potentialtests sowie toxischen und endokrinen Effekttests miteinander verglichen werden und die Relevanz der Wirkpotentialtests im Labor für tatsächliche Wirkungen in Organismen aus dem Freiland überprüft werden.

Die chemische Analytik in Oberflächenwasserproben zeigte deutliche Unterschiede in der Belastungssituation zwischen den beiden Bodenseezuflüssen Schussen und Argen. Insgesamt wurden in der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese (PS 3) deutlich mehr Spurenstoffe nachgewiesen als an Probestelle PS 4 an der Argen. Von 75 untersuchten Spurenstoffen konnten in der Argen lediglich 12 in Konzentrationen über der Nachweisgrenze analysiert werden. Im Ablauf der Kläranlage Langwiese wurden 29 Spurenstoffe nachgewiesen und im Oberflächenwasser der Schussen traten davon 21 auf. Das Auftreten mehrerer Stoffe (z.B. Carbamazepin, N,N-Dimethylsulfamid, Sucralose, Benzotriazol) in der Schussen unterhalb der Kläranlage konnte eindeutig auf den Kläranlageneinleiter zurückgeführt werden. Dem Verhältnis von gereinigtem Abwasser zur Wasserführung der Schussen entsprechend,

waren die gemessenen Spurenstoffkonzentrationen im Oberflächenwasser der Schussen drei- bis zehnmal geringer als im reinen Kläranlagenablauf.

Auch die entnommenen Fischproben (Döbel: primär Leberproben und Muskulatur; Schneider: Pool aus drei bis vier ganzen Fischen) wurden der chemischen Analytik unterzogen. Hierbei traten von 82 untersuchten Spurenstoffen 22 über der Nachweisgrenze auf, darunter Quecksilber, Arsen und Cadmium sowie persistente Stoffe wie polychlorierte Biphenyle (PCBs) und polybromierte Diphenylether (PBDEs). Sowohl in den Fischproben der Schussen als auch in jenen der Argen wurden hinsichtlich der Gehalte an Quecksilber, Arsen und Cadmium sehr hohe Konzentrationen nachgewiesen. Die Konzentrationen an Quecksilber im Fischgewebe überschritten in der Schussen (max. 750 µg/kg) und Argen (max. 910 µg/kg) sogar deutlich die existierende Umweltqualitätsnorm von 20 µg/kg. Auch DDX (ein Metabolit des Insektizids DDT (Dichlorphenyltrichlorethan), dessen Herstellung und Vertrieb in Deutschland seit 1977 verboten ist), Methyltriclosan (Metabolit des Antibakterizids Triclosan), PCBs und PBDEs wurden in mittleren bis höheren Konzentrationen in Fischgeweben nachgewiesen. Dahingegen konnten die meisten untersuchten endokrin wirksamen Substanzen nicht in den Fischproben gefunden werden.

Endokrine Wirkpotentiale konnten *in vitro* sowohl im Kläranlagenablauf und Oberflächenwasser (E-Screen) als auch im Sediment (Reporter-Gen-Assays) der Schussen nachgewiesen werden. *In vivo* wurden durch Reproduktionstests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* in Sedimenten der Schussen und auch in Sedimenten der Argen sehr starke östrogenwirksame Potentiale gefunden. Dass sich diese östrogenen Einflüsse bereits in Freilandorganismen äußerten, deuteten die Ergebnisse der Wirktests in Fischen und Flohkrebse an. In der Schussen traten unterhalb der Kläranlage vermehrt weibliche Schneider und Gammariden auf und in im Bypass exponierten Jungforellen konnte Vitellogenin (ein Dottervorläuferprotein, das normalerweise nur von weiblichen geschlechtsreifen Tieren gebildet wird) nachgewiesen werden. Neben den beschriebenen östrogenen Einflüssen wurden auch zusätzliche anti-östrogene, toxische und genotoxische Effekte nachgewiesen, welche mit den Ergebnissen der chemischen Analytik in Verbindung gebracht werden konnten. Im Vergleich zur Argen wurden bei Döbeln aus der Schussen eine verzögerte Gonadenreife (bei Weibchen) und ein signifikant verringerter gonadosomatischer Index (bei Weibchen und Männchen) ermittelt. Zudem wurden im Vergleich zur Argen ein signifikant verringerter Glykogengehalt (Speicherkohlenhydrat) in der Leber und eine deutlich erhöhte Anzahl an Mikrokernen, welche DNA-Schädigungen anzeigen, in den Erythrozyten von Döbeln festgestellt. Auch auf Ebene der Lebensgemeinschaft wurden Veränderungen hinsichtlich der ermittelten Endpunkte im Flussverlauf der Schussen festgestellt. So war die Artenanzahl und Individuendichte innerhalb des Makrozoobenthos, vor allem die sensitiven Artengruppen betreffend, unterhalb der Kläranlage deutlich verringert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Flohkrebse stellen einen wichtigen Bestandteil des Gesamtprojekts dar. Durch das Effektmonitoring mit Gammariden wurde die Methodenpalette des Gesamtprojekts erweitert und die Effekte der Kläranlage Langwiese konnten neben Wirbeltieren (freilebende und aktiv exponierte Fische) auch in wirbellosen Gewässerorganismen, welche von großer Bedeutung für aquatische Ökosysteme sind, beschrieben werden. Die in Kapitel 3 detailliert dargestellten Ergebnisse des Flohkrebsemonitorings sind in das vorliegende Kapitel eingeflossen und haben erheblich zur Interpretation der Resultate des Gesamtprojekts beigetragen.

Anhand der Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden, welche sowohl die Expositions- als auch die Effektseite abdeckten, war es im Projekt „SchussenAktiv“ möglich, Zusammenhänge zwischen dem Auftreten ausgewählter Spurenstoffe, den Ergebnissen endokriner und toxischer Wirkpotentialtests, den direkt in Freilandorganismen auftretenden Effekten und der Veränderung der wirbellosen Lebensgemeinschaft herzustellen. Auf dieser Basis konnte auch gezeigt werden, dass unterhalb der Kläranlage vor deren Ausbau mit einer vierten Reinigungsstufe toxische und hormonell wirksame Substanzen in der Schussen vorlagen, welche sich bereits durch die entsprechenden Effekte in den im Gewässer lebenden Organismen widerspiegelten. Des Weiteren wurde durch die im Rahmen von „SchussenAktiv“ durchgeführten Untersuchungen aber auch deutlich, dass die als Referenzgewässer hinzugezogene Argen zwar deutlich geringer belastet war als die Schussen, jedoch auch nicht völlig frei von Beeinträchtigungen (z.B. hoher Quecksilbergehalt in Fischen), und somit der Bedarf besteht, auch hier weitere Untersuchungen durchzuführen.

Kapitel 3: Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen

Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Tribskorn R

Ecotoxicology and Environmental Safety 106: 115-124; DOI: 101016.j.ecoenv.2014.04.011

Kapitel 3 enthält die Ergebnisse zu Untersuchungen mit limnischen Invertebraten an Schussen und Argen im Zeitraum vor dem Ausbau der Kläranlage Langwiese. Untersucht wurden toxische und endokrine Effekte in Gammariden sowie die Integrität des Makrozoobenthos. Auf biochemischer Ebene wurden proteotoxische Wirkungen in Gammariden anhand der Stressproteinanalyse (Hsp70) untersucht. Um toxische und endokrine Effekte auf organismischer Ebene zu beurteilen, wurden das

Geschlechterverhältnis in Flohkrebse sowie die Fekundität brütender Weibchen bestimmt. Zusätzlich wurden alle entnommenen Gammariden makroskopisch auf einen Befall mit Parasiten (Acanthocephala) untersucht. Die durch eine Parasitierung entstehenden strukturellen Veränderungen im Organismus wurden exemplarisch für ein Individuum anhand histologischer Techniken dargestellt. Um mögliche Auswirkungen des Ablaufs der Kläranlage Langwiese sowie der Einleitung des flussaufwärts gelegenen Regenüberlaufbeckens Mariatal auch auf biozönotischer Ebene zu analysieren, wurde an mehreren Probestellen, dem Flussverlauf der Schussen folgend, Makrozoobenthos nach Vorgaben der WRRL (Europäische Union 2000) entnommen. Für jede Probestelle wurde die Abundanz aller makrozoobenthischer Organismen ermittelt (Individuen pro Quadratmeter). Anschließend wurden die unterschiedlichen Taxa mindestens bis zum Niveau der Operationellen Taxaliste (Haase et al. 2004) bestimmt, die Gesamttaxazahl, EPT-Taxa (Ephemeropteren, Plecopteren und Trichopteren) und Anzahl sensibler Taxa (nach Fauna Aquatica Austriaca (Moog et al. 2017)) ermittelt sowie der Saprobienindex (Rolauffs et al. 2003) berechnet.

Die Untersuchung der Artenverteilung der zwei abundanten Flohkrebsearten, *Gammarus pulex* und *Gammarus roeseli*, zeigte deutliche Unterschiede zwischen Schussen und Argen sowie zwischen den einzelnen Probestellen der Schussen. In der Argen traten an Probestelle PS 5 ausschließlich *G. pulex* auf, wohingegen die Flohkrebsegemeinschaft an den Probestellen der Schussen aus beiden Arten mit jeweils verschiedenen Abundanzen bestand. An PS 0 (oberhalb der KA) traten signifikant mehr *G. pulex* und weniger *G. roeseli* auf als an den Probestellen PS 00 (weit oberhalb der KA, unterhalb drei kleiner RÜB) und PS 3 (unterhalb der KA). Zwischen den Probestellen PS 00 und PS 3 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. An diesen beiden Probestellen bestand die untersuchte Gammaridengemeinschaft zu über 90 % aus *G. roeseli*. Das gemischte Auftreten mehrere Gammariden Spezies ist *per se* nicht ungewöhnlich. In unseren heimischen Fließgewässern werden häufig weite Bereiche von beiden Arten (*G. pulex* und *G. roeseli*) besiedelt (Pöckl 1993a). Nach Schwab (1995) ist das Auftreten von *G. pulex* allerdings eher durch höhere Sauerstoffgehalte und bessere Wasserqualität bedingt, wohingegen *G. roeseli* als ein wenig toleranter eingestuft wird. Die Ergebnisse der parallel durchgeführten limnochemischen Analysen zeigten jedoch keine wesentlichen Unterschiede im Sauerstoff- und Nährstoffgehalt zwischen den einzelnen Probestellen. Die Verringerung der Abundanz von *G. pulex* an PS 00 und PS 3 kann möglicherweise als Hinweis auf eine Schadstoffbelastung an diesen Probestellen, verursacht durch drei kleine RÜB (PS 00) und durch die KA Langwiese (PS 3), gesehen werden.

Gammariden stellen für *Pomphorhynchus laevis* und *Polymorphus minutus*, welche beide als acanthocephale Parasiten eingeordnet werden können, den Zwischenwirt dar. Da in mehreren Studien bereits beschrieben wurde, dass eine toxisch belastete Umwelt eine Parasitierung von Organismen begünstigen kann (Marcogliese 2005, Morley et al. 2010, Sures 2008a, 2008b), wurde in diesem Kapitel

auch die Parasitierungsrate in Gammariden bestimmt. Dies erfolgte makroskopisch im Freiland vor Fixierung der Individuen, anhand der äußerlich sichtbaren gelb-orange gefärbten Bereiche unter dem Carapax. Die Parasitierungsrate wurde für beide Flohkrebsarten (*G. pulex* und *G. roeseli*) getrennt betrachtet. Die Anzahl parasitierter *G. roeseli* Individuen unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Probestellen und lag zwischen drei bis fünf Prozent. Im Gegensatz dazu traten in Individuen von *G. pulex* signifikante Unterschiede in der Parasitierungsrate zwischen Probestelle PS 00 (2 %) und PS 3 (7 %) in der Schussen auf. Zwischen PS 0 (oberhalb der KA) und PS 3 (unterhalb der KA) gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Vielmehr wurde ein Trend zu zunehmender Parasitierungsrate (PS 00 < PS 0 < PS 3) festgestellt. Möglicherweise nimmt der Schadstoffcocktail, verursacht durch die RÜB und KAs im Flussverlauf der Schussen immer mehr zu und erreicht an PS 3 ein Niveau, das einen Anstieg der Parasitierungsrate zur Folge hat. Anhand histopathologischer Untersuchungen wurde deutlich, welche Ausmaße eine Parasitierung mit Acanthocephala im betroffenen Wirt annehmen kann. Aufgrund der enormen Größe des Parasiten, welcher fast 50 % der Größe des Wirts erreichte, wurden die Wirtsorgane (Gonaden, Mitteldarm und Mitteldarmdrüse) extrem zurückgedrängt. Eine deutliche Funktionsbeeinträchtigung der Organe kann die Folge einer solchen Parasitierung sein.

Um mögliche endokrine Effekte aufzuzeigen, wurde das Geschlechterverhältnis in jeder zu untersuchenden Flohkrebsgemeinschaft bestimmt. In den Probenahmen der Frühlings- und Sommermonate wurde an den Probestellen PS 00 (weit oberhalb KA, unterhalb drei kleiner RÜB) und PS 3 (unterhalb der KA) ein signifikant zugunsten der Weibchen verschobenes Geschlechterverhältnis festgestellt. Basierend auf den Ergebnissen von Ladewig et al. (2006), die in einem eher unbelasteten Gewässer ein Geschlechterverhältnis von Männchen zu Weibchen von 1:1,5 fand, deuteten die an der Schussen ermittelten signifikanten Abweichungen von diesem Verhältnis zugunsten der Weibchen auf Effekte hin, die durch die Regenüberlaufbecken (PS 00) und den Einleiter der Kläranlage Langwiese (PS 3) verursacht wurden. Durch diese Einleitungen können unter anderem endokrine Disruptoren ins Gewässer gelangen, welche eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Weibchen verursachen können. Diesen Effekt konnten auch Schneider et al. (2015) in ihrer Studie beobachten. *G. pulex* wurden in Fließrinnen gegenüber 33-, 66- und 100-prozentigem Kläranlagenablauf der Kläranlage Grävenwiesbach in Hessen (ausgestattet mit drei Reinigungsstufen, 25.000 Einwohner-Werte) für einen Zeitraum von 30 Tagen exponiert. In allen Fließrinnen, die Abwasseranteile enthielten, war das Geschlechterverhältnis signifikant zugunsten der Weibchen verschoben und der Anteil der Weibchen nahm signifikant mit steigender Abwasserkonzentration zu (Schneider et al. 2015). Auch bei Watts et al. (2002) wurden in Laborstudien signifikante Verschiebungen des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Weibchen bei Expositionen von *G. pulex* gegenüber 100 ng/L, 1 µg/L und 10 µg/L 17α-Ethinylestradiol (EE₂) festgestellt. Im Gegensatz zum

Frühjahr war im Herbst das Geschlechterverhältnis an den Probestellen der Schussen nicht mehr signifikant zugunsten der Weibchen verschoben. Die energiezehrende Fortpflanzung im Frühjahr und Sommer (Pöckl 1993a) kann eine steigende Mortalität der Weibchen zur Folge haben, welche sich wiederum auf das Geschlechterverhältnis auswirken kann.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Geschlechterverhältnisses deuteten auf die Präsenz endokrin wirksamer Stoffe unterhalb der RÜB und der Kläranlage Langwiese hin. Untersuchungen von Harth et al. (2018), Ladewig et al. (2006) und Mazurová et al. (2010) zeigten im Gegensatz zu den Studien von Schneider et al. (2015) und Watts et al. (2002), dass im Freiland auch nachweislich erhöhte Konzentrationen östrogenwirksamer Stoffe nicht zwangsläufig in erhöhter Fekundität weiblicher Gammariden resultierten. Ladewig et al. (2006) und Mazurová et al. (2010) konnten bei erhöhten Östrogenkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Fekundität nachweisen. Harth et al. (2018) berichteten von verringerter Fekundität weiblicher Gammariden an einer Probestelle unterhalb der Kläranlage Wallernhausen in Hessen und auch Untersuchungen von Brettschneider et al. (2019) an der Nidda, ebenfalls in Hessen gelegen, zeigten einen verringerten Fekunditätsindex in weiblichen Gammariden an einer Probestelle flussabwärts von zwei kommunalen Kläranlagen. Wigh et al. (2017) exponierten *G. fossarum* in einer Pilotanlage der Kläranlage Bellecombe (Haute-Savoie, Frankreich). Hier konnten die Effekte der Abwasserreinigung anhand des Belebtschlammverfahrens mit und ohne Zugabe von Ozon (9,4 mg O₃/L) untersucht werden. In beiden Abläufen war die Fekundität weiblicher Gammariden im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert (Wigh et al. 2017). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Fekunditätsindex in Gammariden von einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Faktoren bestimmt wird. An den Probestellen der Schussen wurde im Sommer und Herbst ein signifikant verringerter Fekunditätsindex an PS 3 (unterhalb der KA) und PS 00 (weit oberhalb der KA, unterhalb drei kleiner RÜB) im Vergleich zu PS 0 (oberhalb der KA) festgestellt. Zwischen Schussen und Argen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz zu Laborstudien sind Flohkrebse in Freiland keiner definierten Menge ausgewählter Chemikalien ausgesetzt, sondern einer breiten Mischung unterschiedlichster Schadstoffe. Dieser Schadstoff-Cocktail, welcher durch RÜB und KAs in die Gewässer gelangt, kann durch toxische Wirkung trotz erhöhter endokriner Potentiale die Fekundität negativ beeinflussen.

Neben diesen populationsökologischen Aspekten wurden an jeder Probestelle in einzelnen Ganzkörperhomogenaten von jeweils 40 Gammariden (20 weibliche und 20 männliche Individuen) mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot auf biochemischer Ebene die Stressproteinlevel (Hsp70) bestimmt, um mögliche proteotoxische Effekte zu ermitteln. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt unterschieden sich die beiden Arten (*G. pulex* und *G. roeseli*) in ihrem Stressprotein-Grundlevel signifikant. Deshalb wurden die Ergebnisse für beide Arten getrennt ausgewertet. Zwischen dem Hsp70-Level weiblicher und männlicher Flohkrebse traten keine

signifikanten Unterschiede auf, so dass die Ergebnisse beider Geschlechter zusammengefasst werden konnten. In *G. roeseli* konnte die Hsp70-Analyse nur in Individuen aus der Schussen durchgeführt werden, da diese Flohkrebsart an der Argen nicht auftrat. Die für *G. roeseli* ermittelten Stressproteinlevel unterschieden sich zwischen den Probestellen der Schussen nicht signifikant voneinander. Daten für *G. pulex*, die im Sommer erhoben wurden, zeigten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Probestellen der Schussen: Das Hsp70-Level in *G. pulex* war an PS 00 (weit oberhalb der KA, unterhalb drei kleiner RÜB) und PS 3 (unterhalb der KA) im Vergleich zu Probestelle PS 0 (oberhalb der KA) signifikant erhöht. Zwischen Schussen und Argen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die chemische Analytik im Rahmen des Verbundprojekts zeigte, dass die Konzentrationen von 14 ausgewählten Spurenstoffen (darunter Carbamazepin, Diclofenac, Metoprolol, Acesulfam und 1H-Benzotriazol), die mit 100 %iger Detektionshäufigkeit vor dem Kläranlagenausbau an den Probenahmestellen PS 0 und PS 3 gemessen wurden, an PS 3 (unterhalb der KA) deutlich höher lagen als an PS 0 (oberhalb der KA) (Scheurer et al. 2017b). Unter Berücksichtigung dieser unterschiedlichen Belastung der Probestellen mit Spurenstoffen ist anzunehmen, dass das ermittelte Stressproteinlevel an PS 0 (oberhalb der KA) einen eher ungestresster Zustand der Gammariden widerspiegelt. Demzufolge kann die Erhöhung des Stressproteinlevels in *G. pulex* an PS 3 (unterhalb der KA) auf proteotoxische Wirkungen von Schadstoffen, welche in erhöhter Konzentration unterhalb der Kläranlage vorlagen, zurückzuführen sein. An Probestelle PS 00 (weit oberhalb der KA, unterhalb drei kleiner RÜB) wurde zwar keine chemische Analytik durchgeführt, aber auch hier war von einer höheren Schadstoffkonzentration aufgrund der Regenwasserentlastung auszugehen, wodurch das Stressproteinlevel in *G. pulex* erhöht wurde. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in den bereits diskutierten Untersuchungen des Geschlechterverhältnisses und der Fekundität wider.

Um die Auswirkungen des Einleiters der Kläranlage auch auf Ebene der Lebensgemeinschaft darzustellen, wurden Daten zum Makrozoobenthos ausgewertet, die von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) im Herbst 2010 erhoben wurden. Nach dem von der WRRL (Europäische Union 2000) vorgegebenen Verfahren wurde an den Probestellen PS 0 (oberhalb der KA, oberhalb des RÜB), PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB), PS 2 (direkt unterhalb der KA), PS 2b (10 km unterhalb der KA) und PS 3 (15 km unterhalb der KA) der Schussen Makrozoobenthos entnommen. Es konnte ein deutlicher Einfluss des Regenüberlaufbeckens Mariatal und der Kläranlage Langwiese auf alle untersuchten Parameter innerhalb der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft festgestellt werden. Im Verlauf der Schussen nahmen sowohl die Anzahl makrozoobenthischer Taxa als auch die Individuendichte pro Quadratmeter kontinuierlich von PS 0 (oberhalb der KA, oberhalb des RÜB) über PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB) zu PS 2 (direkt unterhalb der KA) ab und waren dort am geringsten. Weiter flussabwärts, an PS 2b und PS 3, nahmen die Anzahl der Taxa und auch deren Abundanz wieder zu. Dasselbe Muster ergab sich auch bei Betrachtung der Anzahl sensitiver Taxa nach

Fauna Aquatica Austriaca (Moog et al. 2017) und der EPT-Taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera). Da vor allem sensitive Taxa und EPT-Taxa, welche überwiegend intolerante Arten beinhalten, empfindlicher auf Belastungen, insbesondere auf toxische Einflüsse, reagieren (Hering et al. 2004), kann der Rückgang dieser Arten durch mögliche toxische Einflüsse des RÜB und der KA bedingt sein. Von fünf der in der Schussen vorkommenden Arten der Käferfamilie Elmidae, welche zu den sensitiven Taxa gezählt werden (Moog et al. 2017), traten an PS 2 direkt unterhalb der Kläranlage lediglich *Elmis maugetii* und *Limnius volckmari* auf. *Esolus parallelepipedus*, *Riolus cupreus* und *Oulimnius tuberculatus*, welche an Probestellen oberhalb der Kläranlage noch gefunden wurden, kamen an PS 2 nicht mehr vor. Weiter flussabwärts, zehn Kilometer unterhalb der Kläranlage (PS 2b), schien sich das Makrozoobenthos wieder erholt zu haben und ähnelte in Bezug auf Individuendichte und Artenzahl der zuvor ermittelten Situation an PS 0, oberhalb der Kläranlage.

Nachdem die gesammelten Arten auf Niveau der Operationellen Taxaliste (Ofenböck et al. 2010) bestimmt wurden, wurde der Saprobienindex berechnet. Der Saprobienindex gibt das Maß der organische Belastung, der die Artengemeinschaft eines Fließgewässers ausgesetzt ist, wieder (Rolauffs et al. 2003). Durch das Saprobienindexsystem wird jeder einzelnen Art des Makrozoobenthos ein Saprobienwert zugeordnet, der ein Maß für den Sauerstoffbedarf der jeweiligen Art darstellt. Der gewichtete Mittelwert der Saprobienwerte aller makrozoobenthischen Organismen eines Fließgewässerabschnitts indiziert somit die Sauerstoffverhältnisse, die in diesem Gewässerabschnitt herrschen. Werden organische Substanzen ins Gewässer eingetragen, kann dies durch unterschiedliche Prozesse zu einer Verringerung des Sauerstoffgehalts im entsprechenden Gewässerabschnitt führen. Im betroffenen Abschnitt können dann nur die Arten überleben, die an sauerstoffarme Verhältnisse angepasst sind. Im Verlauf der Fließstrecke können eingetragene organische Substanzen aber auch wieder abgebaut werden. Dies führt zu einem steigenden Sauerstoffgehalt im Gewässer und anspruchsvollere Arten können diesen Gewässerabschnitt wieder besiedeln. Ein hoher Saprobienindex weist auf organische Belastung hin, während bei sinkender organischer Belastung auch der Saprobienindex niedriger wird (Rolauffs et al. 2003). Der Saprobienindex an den Probestellen der Schussen lag zwischen 1,77 (PS 3) und 1,90 (PS 2b), der Schwankungsbereich zwischen den einzelnen Probestellen war also relativ gering. Anhand dieser Werte konnte dem gesamten Untersuchungsbereich der Schussen der nach WRRL (Europäische Union 2000) mindestens geforderte „gute saprobielle Zustand“ (Saprobienwerte zwischen 1,6 und 2,1) zugeordnet werden. Der nur minimale Anstieg des Saprobienindex an PS 2 direkt unterhalb der Kläranlage (1,86) im Vergleich zu PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB; 1,83) zeigte, dass die Kläranlage Langwiese nur geringe Auswirkungen auf die Saprobie des untersuchten Gewässerabschnitts hatte. Bereits vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe wies die Kläranlage einen hohen Reinigungsgrad auf, so dass die organische Fraktion des Abwassers in der KA vollständig abgebaut wurde und nicht mehr in den Vorfluter gelangte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen vor dem Ausbau der Kläranlage zeigten, dass sowohl der Gesundheitszustand von Gammariden als auch die Integrität des Makrozoobenthos an verschiedenen Probestellen der Schussen durch die Einleitung der Kläranlage Langwiese beeinträchtigt waren. Unterhalb der Kläranlage (PS 3) war das Geschlechterverhältnis in Gammariden signifikant zugunsten der Weibchen verschoben, was auf die Präsenz endokrinwirksamer Substanzen hindeutete. Dass auch allgemein toxische und proteotoxische Stoffe unterhalb der Kläranlage vorhanden waren, äußerte sich in einer signifikant verringerten Fekundität brütender Weibchen und einem signifikant erhöhten Stressproteinlevel. Auch auf der Ebene der Lebensgemeinschaft konnten Veränderungen beobachtet werden. Direkt unterhalb der Kläranlage (PS 2) war die Gesamtaxazahl als auch die Anzahl sensitiver und EPT-Taxa deutlich verringert. Zudem war die Anzahl an Individuen pro Quadratmeter an PS 2, direkt unterhalb der Kläranlage, geringer als an den flussaufwärts gelegenen Probestellen. Neben der Veranschaulichung der Auswirkungen des Kläranlageneinleiters auf Gammariden und Makrozoobenthos wurde anhand dieser Untersuchungen auch verdeutlicht, dass ökotoxikologische Studien auf unterschiedlichen biologischen Organisationsebenen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Beispielsweise wurden in Gammariden 15 km unterhalb der Kläranlage (PS 3) festgestellt, dass diese durch den Kläranlageneinleiter beeinträchtigt oder durch zusätzliche diffuse Einträge beeinflusst waren, wohingegen die Lebensgemeinschaft des Makrozoobenthos an dieser Stelle noch unbeeinflusst zu sein schien. Somit wurde auch die Bedeutung eines breitgefächerten Monitorings auf verschiedenen biologischen Organisationsebenen zur Beurteilung der Auswirkungen von Mikroschadstoffeinträgen auf invertebrate Gewässerorganismen bekräftigt.

Kapitel 4: Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe

Peschke K, Burmester J, Hermann M, Köhler H-R, Reitter K, Scheurer M, Wurm K und Triebkorn R

gwf - Wasser/Abwasser 157(4): 370-379

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit Invertebraten vor (2010-2013) und zwei Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese (2014 und 2015) verglichen und in Zusammenhang mit den Ergebnissen weiterer Projektpartner des Verbundprojekts SchussenAktiv*plus* gebracht. Die Untersuchungen mit Gammariden wurden an PS 0 (oberhalb der Kläranlage) und PS 3 (15 km unterhalb der Kläranlage) an der Schussen sowie an PS 5 an der Argen durchgeführt. Die Effekte

auf Ebene der Lebensgemeinschaft (Makrozoobenthos) wurden an PS 0 (oberhalb der Kläranlage) und PS 2 (direkt unterhalb der Kläranlage) an der Schussen sowie an PS 4 an der Argen betrachtet.

An Gammariden wurde das Geschlechterverhältnisses und die Fekundität bestimmt und der Stressproteingehalt analysiert. Um die Ergebnisse vor dem Ausbau der Kläranlage besser mit jenen nach dem Ausbau vergleichen zu können, wurden für die einzelnen Parameter die Daten jeweils vor und nach dem Ausbau der Kläranlage jeweils für Frühling, Sommer und Herbst zusammengefasst. Nach dem Ausbau der Kläranlage war die Datenlage zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichung noch etwas geringer. Die Ergebnisse im Frühling nach Ausbau der Kläranlage wurden durch die gemittelten Frühlingsprobenahmen der Jahre 2014 und 2015 dargestellt, Sommer und Herbst bestanden lediglich jeweils aus einer Probenahme im Jahr 2015.

Wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, war das Geschlechterverhältnis unterhalb der Kläranlage Langwiese vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe im Frühling und Sommer signifikant zugunsten der Weibchen verschoben. Anderweitige Studien im Labor und Freiland konnten ein in Richtung der Weibchen verschobenes Geschlechterverhältnis in Gammariden in Zusammenhang mit einer Exposition gegenüber Östrogenen und/oder Xenoöstrogenen bringen (Schneider et al. 2015, Watts et al. 2002). Und auch die an der Schussen gewonnenen Ergebnisse vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe deuteten auf mögliche hormonell wirksame Substanzen flussabwärts des Kläranlageneinleiters hin. Nach dem Ausbau der Kläranlage war das Geschlechterverhältnis in Gammariden nur noch im Frühling signifikant zugunsten der Weibchen verschoben, die zuvor beobachteten Unterschiede im Sommer traten nicht mehr auf. Dass hormonell wirksame Mikroschadstoffe unterhalb der Kläranlage vor deren Ausbau präsent waren, zeigten auch Untersuchungen weiterer Kooperationspartner. Anhand von Reporterassays mit Mammakarzinomzelllinie und HeLa-Zelllinie (Blaha und Benisek 2017) sowie E-Screen Assays (Kuch 2017a) wurden östrogene Wirkpotentiale an PS 3 unterhalb der Kläranlage festgestellt. Nach dem Ausbau der Kläranlage waren sowohl in den Reporterassays als auch in den durchgeführten E-Screen Assays die ermittelten Konzentrationen an Ethinylöstradioläquivalenten (EEQ) deutlich geringer als zum Zeitpunkt vor Ausbau der Kläranlage (Blaha und Benisek 2017, Kuch 2017a). Demzufolge kann die Reduktion östrogenen Substanzen durch die Pulveraktivkohlestufe zu einer Veränderung im Geschlechterverhältnis geführt haben, wodurch dieses im Sommer nicht mehr signifikant zugunsten der Weibchen verschoben wurde. Nach wie vor war das Geschlechterverhältnis allerdings im Frühling auch nach Ausbau der Kläranlage signifikant zugunsten der Weibchen verschoben. Möglicherweise haben sich Pestizide, die verstärkt im Frühjahr eingesetzt werden und auch hormonell wirken können, auf das Geschlechterverhältnis ausgewirkt.

Zusätzliche toxische Einflüsse der Kläranlage Langwiese wurden anhand der Untersuchung der Fekundität brütender Gammariden ersichtlich. Wie in Kapitel 3 bereits diskutiert, bestärkten weitere Studien (Brettschneider et al. 2019, Harth et al. 2018, Ladewig et al. 2006, Mazurová et al. 2010, Wigh et al. 2017) die Annahme, dass die Fekundität weiblicher Gammariden von einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Faktoren bestimmt wird. Vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe war der Fekunditätsindex weiblicher Gammariden in den Sommer- und Herbstprobenahmen unterhalb der Kläranlage signifikant niedriger als oberhalb. Dies stand vermutlich weniger mit hormonellen als mit zusätzlichen toxischen Einflüssen im Zusammenhang. Durch den Ausbau der Kläranlage wurden diese Einflüsse reduziert, so dass hinsichtlich der Fekundität weiblicher Gammariden zwischen den Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage keine signifikanten Unterschiede mehr auftraten. Im Probenahmezeitraum nach dem Ausbau der Kläranlage waren die Fekunditätsindizes brütender Weibchen im Herbst an PS 5 an der Argen signifikant höher als an PS 3 unterhalb der Kläranlage an der Schussen. Im Herbst waren die toxischen Wirkungen in der Argen somit geringer als in der Schussen.

Um gezielt proteotoxische Wirkungen zu untersuchen, wurde, wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, das Stressproteinlevel der an den einzelnen Probestellen entnommenen Gammariden bestimmt. Nach dem Kläranlagenausbau, im Frühling 2014, konnten an PS 0 anhand einer größeren Stichprobe an *G. roeseli* und *G. pulex* Individuen erneut die Stressprotein-Grundlevel beider Arten statistisch verglichen werden. Im Gegensatz zu Ergebnissen die eine kleinere Stichprobe vor Ausbau der Kläranlage lieferte, ergaben sich nun mit der für statistische Auswertungen geeigneteren größeren Stichprobe keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Arten. Im Folgenden wurden deshalb die beiden Arten nicht mehr getrennt analysiert und als *Gammarus spec.* bezeichnet. Dadurch konnten nun auch die Stressproteinlevel in Gammariden von PS 3 an der Schussen (unterhalb der KA) mit denjenigen in Gammariden von PS 5 an der Argen verglichen werden. Wie vor Ausbau der Kläranlage ergaben sich nach deren Ausbau keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Stressprotein-Grundlevel weiblicher und männlicher Gammariden. Somit konnten nach wie vor die Analysen beider Geschlechter zusammengeführt und gemeinsam ausgewertet werden. Vor dem Ausbau der Kläranlage Langwiese war im Frühling das Stressproteinlevel in Gammariden unterhalb der Kläranlage signifikant höher als an der Probestelle oberhalb der Kläranlage. In Gammariden, die nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe unterhalb der Kläranlage entnommen wurden, war das Stressproteinlevel im Vergleich zur Probestelle oberhalb der Kläranlage nicht mehr signifikant erhöht. Dies deutete darauf hin, dass proteotoxische Substanzen, die vor dem Ausbau der Kläranlage das Stressproteinlevel in Gammariden erhöht hatten, durch Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe reduziert wurden, und sich nicht mehr in einem Anstieg des Stressproteinlevels äußerten.

Auch auf Ebene der Lebensgemeinschaft (Untersuchung des Makrozoobenthos durch Dr. Karl Wurm, Gewässerökologisches Labor Starzach) konnten durch den Ausbau der Kläranlage Langwiese bereits

15 Monate nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe erste Veränderungen festgestellt werden. Betrachtet wurden in diesem Kapitel die Gesamtaxazahl und der Saprobienindex anhand der Daten für Frühling und Herbst vor (Mittelwerte der Jahre 2012 und 2013) und nach dem Ausbau der Kläranlage (2014). Vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe waren direkt unterhalb der Kläranlage (PS 2) die makrozoobenthischen Taxa in geringerer Anzahl vertreten als es oberhalb der Kläranlage (PS 0) und an der Argen (PS 4) der Fall war. Nach Ausbau der Kläranlage war die Taxazahl an der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese im Frühjahr als auch im Herbst im Vergleich zu Probenahmen vor dem Ausbau deutlich erhöht. Im Referenzgewässer Argen erniedrigte sich im Frühling und Herbst nach dem Zeitpunkt des Kläranlagenausbaus an der Schussen die Anzahl der Taxa. Da die Untersuchungen des Zustands nach Ausbau der Kläranlage lediglich ein Jahr (2014) umfassten, konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob der Rückgang makrozoobenthischer Taxa an der Argen eher mit jahresspezifischen Schwankungen oder einer Verschlechterung des Gewässerzustands an der Argen in Zusammenhang gebracht werden konnte. An der Schussen wurden positive Veränderungen auch bei Auswertung des Saprobienindex gezeigt. Nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe war der Saprobienindex in der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese im Frühling deutlich und im Herbst leicht niedriger als vor dem Ausbau der Kläranlage. Dies war am Referenzgewässer Argen nicht der Fall. Die Zuschaltung einer vierten Reinigungsstufe kann den CSB-Wert (Chemischer Sauerstoffbedarf, beschreibt die Menge an Sauerstoff, welche zur Oxidation der gesamten organischen Stoffe im Wasser verbraucht wird) im Kläranlagenablauf deutlich verringern, da organische Verbindungen über Aktivkohle entnommen werden können (Metzger 2019). Eine Erhöhung des Sauerstoffgehalts im Gewässer unterhalb der Kläranlage nach deren Ausbau könnte sich in einem Anstieg der Anzahl sauerstoffsensitiver Taxa äußern. Diesen wird im Saprobienindex ein geringerer Saprobiewert zugeordnet als es bei Arten die an sauerstoffarme Bedingungen angepasst sind der Fall ist, was zu einer Verringerung des Saprobienindex führen würde. Anhand der begleitenden limnochemischen Wasseruntersuchungen konnten an der Probestelle unterhalb der Kläranlage jedoch keine Unterschiede zwischen den Untersuchungszeiträumen vor und nach deren Ausbau festgestellt werden. Da aber belastungssensitive Arten zumeist auch die Arten sind, welche höhere Anforderungen an den Sauerstoffgehalt des Gewässers stellen, kann einer Erniedrigung des Saprobienindex auch der Anstieg belastungssensitiver Taxa aufgrund der Reduktion von Spurenstoffen im Kläranlagenablauf zugrunde liegen.

Diese positiven Auswirkungen der Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe auf der Kläranlage Langwiese auf invertebrate Lebewesen in der Schussen spiegeln sich auch in zahlreichen Ergebnissen beteiligter Kooperationspartner des Verbundprojekts wider, welche in Abschnitt 5 zusammengefasst und diskutiert werden. Im vorliegenden Kapitel konnte zum einen gezeigt werden, dass sowohl die Verteilung der Taxa innerhalb des Makrozoobenthos als auch der Gesundheitszustand von

Gammariden durch die Kläranlage Langwiese bei Ravensburg vor deren Ausbau mit einer Pulveraktivkohlestufe negativ beeinflusst wurde. Hinweise auf mögliche Wirkungen hormonell wirksamer Substanzen lieferten die Untersuchungen zum Geschlechterverhältnis bei Gammariden. Die Resultate zur Fekundität der Weibchen sprachen zudem für den Einfluss nicht nur hormonell wirksamer, sondern auch vor allem toxischer Substanzen, die sich negativ auf die Fruchtbarkeit weiblicher Gammariden vor Ausbau der Kläranlage ausgewirkt haben. Nach Ausbau der Kläranlage kam es zu einer deutlichen Verbesserung des Gesundheitszustandes der Gammariden. Dieser Effekt auf Individualebene spiegelte sich auf biozönotischer Ebene wider: Der verbesserte Saprobienindex und die höheren Taxazahlen in der Schussen unterhalb der Kläranlage wiesen auf einen positiven Einfluss des KA Ausbaus auf die Gewässerbiozönose hin. Da der Untersuchungszeitraum nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe jedoch erst zwei Jahre umfasste, konnten auch jahresspezifische Schwankungen nicht ausgeschlossen werden. Um die in diesem Kapitel gewonnenen Aussagen zu untermauern und jahresspezifische Schwankungen bestmöglich ausschließen zu können, wurden die Untersuchungen noch für weitere Jahre fortgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 5 zusammenfassend vorgestellt.

Kapitel 5: Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macro-invertebrates: individual and community responses

Peschke K, Capowiez Y, Köhler H-R, Wurm K and Tribskorn R

Frontiers in Environmental Science 7: 64; DOI: 10.3389/fenvs.2019.00064

Effekte des Ausbaus der Kläranlage Langwiese mit einer Pulveraktivkohlestufe auf wirbellose Gewässerorganismen sind auch Inhalt des Kapitels 5, allerdings werden jetzt Langzeiteffekte bis 2017 betrachtet. Die Untersuchungen mit Gammariden wurden, wie in allen vorherigen Kapiteln auch, an den Probestellen PS 0 (oberhalb der KA Langwiese) und PS 3 (unterhalb der KA) an der Schussen sowie an PS 5 am Referenzgewässer Argen durchgeführt. Makrozoobenthosorganismen wurden an den Probestellen PS 0 (oberhalb der KA), PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB), PS 2 (direkt unterhalb der KA) und PS 3 (15 km unterhalb der KA) an der Schussen, und an PS 4 am Referenzgewässer Argen untersucht. Es erfolgte eine umfassende statistische Datenanalyse der gesamten Datensätze bis 2017.

Sowohl vor als auch nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese unterschied sich die Verteilung der *Gammarus*-Spezies signifikant zwischen den Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage der Schussen als auch zwischen Schussen und Argen. Wie bereits in Kapitel 3 dargestellt, trat in der Argen

weiterhin ausschließlich *G. pulex* auf, wohingegen die Gammaridengemeinschaft in der Schussen aus *G. pulex* und *G. roeseli* bestand. Vor und nach dem Ausbau der Kläranlage waren an PS 0 (oberhalb der KA) signifikant mehr *G. pulex* und weniger *G. roeseli* vertreten als an PS 3 (unterhalb der KA). An allen untersuchten Probestellen traten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Artenverteilung zwischen dem Untersuchungszeitraum vor und nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese auf. Demzufolge schien der Auslauf der Kläranlage die Artenzusammensetzung der Gammaridengemeinschaft an dieser Probestelle nicht zu beeinflussen.

Das Geschlechterverhältnis (Ergebnisse von *G. pulex* und *G. roeseli* zusammengeführt und als *G. spec* betrachtet) war vor dem Ausbau der Kläranlage Langwiese an PS 3 (unterhalb der KA) im Frühling 2010, 2011 und 2012 sowie im Sommer 2010 signifikant zugunsten der Weibchen verschoben (Statistische Überprüfung auf Abweichung von einem Verhältnis der Männchen zu Weibchen von 1:1,5). Nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe wurde unterhalb der Kläranlage eine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Weibchen nur noch im Frühling 2014 und 2015 festgestellt. In Untersuchungen drei und vier Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage (Frühling 2016 und 2017) gab es keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Probestellen oberhalb (PS 0) und unterhalb (PS 3) der Kläranlage. Ergebnisse der innerhalb des Verbundprojekts durchgeführten E-Screen Assays zeigten beim Vergleich der Untersuchungszeitpunkte vor und nach dem Ausbau der Kläranlage, dass deutlich weniger Ethinylöstradiolequivalente (EEQ) an PS 3 (unterhalb der KA) nach dem Ausbau nachgewiesen werden konnten (Kuch 2017a). Untersuchungen in Wasserproben, die den verschiedenen Reinigungsabschnitten der Kläranlage entnommen wurden, zeigten sogar, dass im Vergleich zum Ablauf der Nachklärung durch Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe die östrogene Aktivität um $86\% \pm 5\%$ reduziert wurde (Kuch 2017b). Demzufolge ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Veränderung des Geschlechterverhältnisses in Gammaridengemeinschaften unterhalb der Kläranlage nach deren Ausbau mit der damit einhergehenden Reduktion östrogenwirksamer Substanzen zusammenhängt. Für jeden Probenahmezeitpunkt wurde der Unterschied zwischen den ermittelten Geschlechterverhältnissen an PS 0 und PS 3 berechnet (Δ PS3-PS0) und anhand nichtlinearer Regression (Fourier Polynom 7x2, $r^2=0,98$) graphisch dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt deutlich, dass vor dem Ausbau der Kläranlage vor allem im Frühling und Frühsommer große Unterschiede zwischen PS 0 und PS 3 bestanden. Zu diesen Zeitpunkten war das Geschlechterverhältnis an PS 3 (unterhalb der KA) stärker zugunsten der Weibchen verschoben als an PS 0 (oberhalb der KA). In Übereinstimmung mit den von Kuch (2017b) anhand des E-Screen Assays gewonnenen Ergebnissen, äußerte sich die Reduktion östrogenener Aktivität im Kläranlagenablauf durch eine kontinuierliche Verringerung der Unterschiede zwischen den ermittelten Geschlechterverhältnissen ober- (PS 0) und unterhalb (PS 3) der Kläranlage Langwiese. Jedoch wurden auch nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe trotz einer Verringerung der

östrogenen Aktivität im Kläranlagenablauf (Kuch 2017b) im Frühling Unterschiede zwischen PS 0 und PS 3 festgestellt. Dies kann damit zusammenhängen, dass Gammariden an PS 3 (15 km unterhalb der Kläranlage) nicht ausschließlich durch den Kläranlageneinleiter beeinflusst wurden. Der Anteil landwirtschaftlich genutzter Flächen (Hopfen und Obstkulturen) in der Umgebung von PS 3 ist sehr hoch. Pestizide, die zu den endokrinwirksamen Substanzen zählen (Andersen et al. 2002) und vor allem im Frühling und Frühsommer ausgebracht werden, können an dieser Probestelle das Geschlechterverhältnis in Gammariden im Frühling und frühen Sommer beeinträchtigt haben.

Vor dem Ausbau der Kläranlage zeigten sich auch deutliche Effekte des Kläranlageneinleiters auf die Fekundität weiblicher Gammariden. In brütenden Weibchen unterhalb der Kläranlage (PS 3) war der Fekunditätsindex im Herbst 2010, 2011 und 2012 vor der Erweiterung der Kläranlage mit einer vierten Reinigungsstufe signifikant verringert im Vergleich zur Probestelle oberhalb der Kläranlage (PS 0). Nachdem die Pulveraktivkohlestufe in Betrieb genommen wurde, traten im Herbst 2014 keine Unterschiede mehr zwischen den Fekunditätsindizes brütender Weibchen an PS 0 (oberhalb der KA) und PS 3 (unterhalb der KA) auf. Ergebnisse der Untersuchungen im Frühling und Sommer zeigten dasselbe Muster. Die Fekundität in weiblichen Gammariden kann neben endokrinwirksamen Substanzen (Mazurová et al. 2010, Schneider et al. 2015, Watts et al. 2002) auch durch die Wassertemperatur beeinflusst werden (Pöckl 1993a). Limnochemische Untersuchungen, die parallel zu jeder Entnahme der Gammariden an den entsprechenden Probestellen durchgeführt wurden, zeigten, dass weder vor noch nach dem Ausbau der Kläranlage Unterschiede zwischen der Wassertemperatur an PS 0 und PS 3 bestanden. Demzufolge konnte in diesem Fall die Wassertemperatur als die Fekundität verändernder Faktor ausgeschlossen werden. Im Freiland sind Gammariden einer komplexen Mischung unterschiedlichster Spurenschadstoffe ausgesetzt. Dieser Schadstoff-Cocktail kann durch unspezifische Toxizität endokrine Effekte überlagern und sich dadurch beeinträchtigend auf die Fekundität weiblicher Gammariden auswirken. Durch den Ausbau der Kläranlage konnte die Konzentration zahlreicher Schadstoffe sowohl im Kläranlagenauslauf (Scheurer et al. 2017a) als auch an PS 3 unterhalb der Kläranlage maßgeblich verringert werden (Scheurer et al. 2017b). Diese Verbesserung hinsichtlich der Schadstoffbelastung unterhalb der Kläranlage äußerte sich somit auch in der Fekundität brütender Weibchen. Auf Basis von Untersuchungen im Referenzgewässer Argen konnten jahresspezifische Effekte ausgeschlossen werden. Die Fekunditätsindizes brütender Weibchen an PS 5 (Referenzgewässer Argen) unterschieden sich zwischen allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant und bewegten sich stets im ähnlichen Bereich.

Durch Erweiterung des Datensatzes zu den Stressprotein-Hsp70-Analysen in Gammariden konnten aufgrund der großen Variabilität der Daten durch statistische Auswertung keine Unterschiede mehr zwischen den Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage festgestellt werden. Allerdings war ein Trend zu geringeren Hsp70-Leveln in Gammariden unterhalb der Kläranlage (PS 3) im Vergleich zur

Probestelle oberhalb (PS 0) ersichtlich. Außerdem gab es Unterschiede zwischen den untersuchten Jahren. Beide eben genannten Unterschiede traten jedoch jahreszeitenunabhängig sowohl vor als auch nach dem Ausbau der Kläranlage auf. Zu ähnlichen Ergebnisse kamen auch weitere Kooperationspartner anhand deren Untersuchungen mit Fischen. Wilhelm et al. (2017) analysierten die Hsp70-Level in Leber-, Nieren- und Kiemenproben von im Freiland entnommener Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Schneider (*Alburnoides bipunctatus*). Auch für diese Fischarten konnten für Stressproteine keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probestellen, jedoch zwischen den einzelnen Jahren nachgewiesen werden. Die beiden im Freiland entnommenen Fischarten reagierten sehr stark auf jahresspezifische Schwankungen, so dass die von der Kläranlage ausgehenden Effekte möglicherweise überlagert wurden (Wilhelm et al. 2017). Da Gammariden und Fische an den Probestellen zum selben Zeitpunkt entnommen wurden, können auch bei der in Gammariden durchgeführten Stressproteinanalyse die Effekte der Kläranlage durch jahresspezifische Schwankungen überlagert worden sein.

Auch die Untersuchungen des Makrozoobenthos zeigten positive Langzeiteffekte des Ausbaus der Kläranlage Langwiese. Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse beinhalten Datensätze der Erhebungen aus Frühling und Herbst der Jahre 2012 und 2013 vor dem Ausbau der Kläranlage und aus Frühling und Herbst der Jahre 2014, 2015 und 2016 nach Ausbau der Kläranlage. Neben den an Probestelle PS 0 (Schussen, oberhalb der KA), PS 2 (Schussen, direkt unterhalb der KA) und PS 4 (Referenzgewässer Argen) erhobenen Daten, die bereits teilweise in Kapitel 4 vorgestellt wurden, enthält die in diesem Kapitel enthaltene Analyse zusätzlich Daten für die Probestellen PS 1 (unterhalb des RÜB Mariatal) und PS 3 (15 km unterhalb der KA) an der Schussen. Hierdurch konnten Veränderungen im Flussverlauf der Schussen dargestellt werden, welche Effekte des RÜB Mariatal und der KA Langwiese miteinschlossen.

Im Herbst wurde vor dem Ausbau der Kläranlage ein Rückgang der Gesamttaxazahl entlang des Flussverlaufs der Schussen von PS 0 zu PS 3 festgestellt: Die Anzahl makrozoobenthischer Taxa war unterhalb des RÜB Mariatal (PS 1) geringer als oberhalb (PS 0) und nahm an den Probestellen unterhalb der KA Langwiese (PS 2 und PS 3) noch weiter ab. An PS 3 (15 km unterhalb der KA) war die Taxazahl am geringsten. Im Zeitraum nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe an der Schussen war die Taxazahl an der Schussen an PS 0, PS 1 und PS 3 geringer als im Zeitraum vor Ausbau der Kläranlage. Dies war aber auch an PS 4 am Referenzgewässer Argen der Fall, wodurch die beschriebenen Unterschiede auf jahresspezifische Effekte zurückgeführt werden können. An der Schussen wurde jedoch direkt unterhalb der Kläranlage (PS 2) nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe ein deutlicher Anstieg der Taxazahl festgestellt. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei Betrachtung der Anzahl sensitiver Taxa (nach Fauna Aquatica Austriaca (Moog et al. 2017, Ofenböck et al. 2010)) der Frühlingsprobenahmen. Im Zeitraum vor Ausbau der Kläranlage an der Schussen nahm

die Zahl sensitiver Taxa von PS 0 (oberhalb der KA und des RÜB) über PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB) zu PS 2 (direkt unterhalb der KA) kontinuierlich ab. Die geringste Anzahl sensitiver Taxa wurde vor dem Ausbau der Kläranlage direkt unterhalb der Kläranlage (PS 2) ermittelt, an PS 0 (oberhalb der KA und des RÜB) und an der Probestelle der Argen (PS 4) war die Zahl sensitiver Taxa am größten. Untersuchungen im Zeitraum nach dem Ausbau der Kläranlage ergaben eine geringere Anzahl sensitiver Taxa an PS 0 (Schussen, oberhalb KA) und PS 4 (Referenzgewässer Argen). Diesen Veränderungen liegen vermutlich auch jahresspezifische Schwankungen zugrunde. Jedoch war auch hier, wie bereits bei Betrachtung der Gesamttaxazahl festgestellt, die Anzahl sensitiver Taxa direkt unterhalb der Kläranlage (PS 2) nach deren Ausbau deutlich höher als im Untersuchungszeitraum vor Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe.

Unterschiede in der Struktur der Makrozoobenthosgemeinschaft zwischen Schussen und Argen sowie zwischen den Zeiträumen vor und nach dem Ausbau der Kläranlage wurden statistisch anhand von Ähnlichkeitsanalysen (ANOSIM, Analysis of Similarity) nach vorheriger Quadratwurzeltransformation des Datensatzes der Gesamttaxazahl ermittelt und graphisch durch NMDS-Plots (Nichtmetrische multidimensionale Skalierung) dargestellt. Das Ergebnis der Ähnlichkeitsanalyse unter Berücksichtigung aller Probestellen zeigte deutliche Unterschiede in der Struktur der gesamten Makrozoobenthosgemeinschaft zwischen Schussen und Argen. Des Weiteren wurden durch den Vergleich der Untersuchungszeiträume signifikante Unterschiede in der Makrozoobenthos-Struktur zwischen dem Zeitraum vor und nach dem Ausbau der Kläranlage ermittelt. Noch deutlicher wurden die Unterschiede zwischen dem Zeitraum vor und nach dem Ausbau der Kläranlage durch eine Ähnlichkeitsanalyse anhand der Probestellen der Schussen, ohne Berücksichtigung von PS 4 an der Argen: Die Struktur der Makrozoobenthosgemeinschaft unterschied sich hochsignifikant zwischen dem Zeitraum vor und nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese. Dieser Unterschied verdeutlicht, dass die Änderungen in der Makrozoobenthosgemeinschaft an der Schussen vor allem vom Ausbau der Kläranlage verursacht wurden und weniger von jahresspezifischen Schwankungen abhing.

Auch bei Betrachtung einzelner sensitiver Taxa wurden positive Veränderungen durch Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe an Probestelle 2 direkt unterhalb der Kläranlage deutlich sichtbar. Innerhalb der Plecoptera (Steinfliegen) war die Abundanz von *Perla abdominalis*, *Protonemura* sp. und *Leuctra fusca*, welche als sehr sensitiv eingestuft werden (Moog et al. 2017), nach dem Ausbau der Kläranlage fast doppelt so hoch im Vergleich zum Zeitraum davor. Zudem trat nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe die hochsensitive Steinfliegenart *Perla marginata* zum ersten Mal seit Beginn der Untersuchungen an PS 2 direkt unterhalb der Kläranlage auf. Weiterhin traten nach dem Ausbau der Kläranlage verschiedene Arten der Ephemeroptera (Eintagsfliegen), Trichoptera (Köcherfliegen) und Elmidae (Hakenkäfer) an PS 2 (direkt unterhalb der KA) in deutlich größerer Anzahl auf als vor dem Ausbau der Kläranlage. Eine Ähnlichkeitsanalyse wurde auch mit diesem Datensatz für sensitive Taxa

durchgeführt. Anhand dieser konnten allerdings noch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Zeitraum vor und nach dem Ausbau der Kläranlage berechnet werden, da die Abundanz der neu auftretenden Taxa unterhalb der Kläranlage noch zu niedrig war, um sich in signifikanten Unterschieden niederzuschlagen. Allerdings zeigte allein die reine Tatsache, dass Arten, die vor dem Ausbau der Kläranlage nicht im Flussabschnitt unterhalb der Kläranlage auftraten und in Untersuchungen nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe nun auch an Probestellen flussabwärts der Kläranlage gefunden werden konnten, ganz deutlich, dass sich die Erweiterung der Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe bereits nach drei Jahren positiv auf die makrozoobenthische Lebensgemeinschaft ausgewirkt hat. Anhand des Wandels bezüglich der Abundanz sensitiver Taxa innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Veränderungen in den kommenden Jahren fortsetzen werden und dann auch anhand statistischer Methoden belegt werden können.

Die Veränderungen in der Abundanz makrozoobenthischer Taxa führten anhand der zugeordneten Saprobiewerte auch zu Veränderungen im Saprobienindex an den untersuchten Probestellen. Zwar wurde allen Probestellen der Schussen sowohl vor als auch nach dem Ausbau der Kläranlage der nach WRRL definierte „gute saprobielle Zustand“ (Saprobienindex zwischen 1,6 und 2,1 (Europäische Union 2000)) zugeordnet, jedoch konnten innerhalb dieses definierten Bereichs Veränderungen festgestellt werden. Vor dem Ausbau der Kläranlage stieg der Saprobienindex im Frühling und Herbst kontinuierlich von PS 0 (oberhalb der KA, oberhalb des RÜB) über PS 1 (oberhalb der KA, unterhalb des RÜB) zu PS 2 (direkt unterhalb der KA) an. Nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe war der Saprobienindex unterhalb des RÜB Mariatal im Vergleich zur Probestelle flussaufwärts immer noch erhöht, verringerte sich jedoch wieder an PS 2 direkt unterhalb der KA und lag im Mittel sogar leicht unter dem an PS 0 ermittelten Wert. Zudem war der Saprobienindex direkt unterhalb der Kläranlage nach deren Ausbau geringer als im vorhergehenden Untersuchungszeitraum. Durch den Anstieg sensitiver Taxa und dem Rückgang saprophiler Taxa, wie z.B. dem Egel *Erpobdella octoculata* und Schlammröhrenwürmer der Gattung *Tubifex*, direkt unterhalb der Kläranlage nach deren Ausbau, verringerte sich der Saprobienindex an dieser Probestelle. Diese positiven Veränderungen hinsichtlich des Saprobienindex konnten allerdings 15 km unterhalb der Kläranlage (PS 3) nicht festgestellt werden. Auch nach dem Ausbau der Kläranlage unterschied sich an dieser Probestelle der Saprobienindex nicht wesentlich vom Zeitraum davor. Grund hierfür ist vermutlich der stärkere Eintrag von Pestiziden an dieser Probestelle, deren Umgebung im Vergleich zu Probestelle 2 durch stärkere landwirtschaftliche Nutzung geprägt ist. Durch den Eintrag von Pestiziden kann die Abundanz sensitiver Taxa wieder verringert werden, wodurch sich anhand der entsprechenden den Taxa zugeordneten Saprobiewerten dann erneut der Saprobienindex verändert.

Zusammenfassend konnte durch die in diesem Kapitel beschriebenen Langzeiteffekte deutlich gemacht werden, dass es durch die Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe zu sehr positiven Veränderungen innerhalb der wirbellosen Lebensgemeinschaft im Ökosystem der Schussen kam, und dass sich sowohl der Gesundheitszustand der Gammariden als auch die Integrität des Makrozoobenthos verbesserten. Veränderungen, die schon kurze Zeit nach dem Ausbau der Kläranlage sichtbar wurden, manifestierten sich in den Folgejahren und waren auch noch drei Jahre nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe im Gewässer feststellbar. Ein Zusammenhang mit der Reduktion von Spurenstoffen, die mittels chemischer Analytik im Rahmen des Projekts „SchussenAktivplus“ gezeigt wurde (Scheurer et al. 2017a, 2017b), ist wahrscheinlich. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Erweiterung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe eine geeignete und lohnenswerte Maßnahme ist, um den Gesundheitszustand von Gammariden sowie sogar die Integrität der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft wiederherzustellen und somit aquatische Ökosysteme nachhaltig zu schützen.

5 Synthese

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Dokumentation und Bewertung der neu installierten Pulveraktivkohlestufe auf der Kläranlage Langwiese anhand eines Monitorings mit Gammariden im Ökosystem Schussen. Hierbei wurden vor und nach dem Ausbau der Kläranlage Langwiese populationsökologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt, um endokrine, allgemein toxische und proteotoxische Wirkungen bei Gammariden aufzuzeigen. Abschließend können nun folgende Fragestellungen, die zu Beginn der Arbeit aufgeworfen wurden, beantwortet werden:

- *Führt der Ausbau der Kläranlage Langwiese mit einer Pulveraktivkohlestufe zu einer Reduktion toxischer und endokriner Effekte bei Gammariden in der Schussen unterhalb der Kläranlage?*

Vor allem die Ergebnisse auf populationsökologischer Ebene zeigen, dass sich die untersuchten Parameter an der Probestelle unterhalb der Kläranlage über den Untersuchungszeitraum positiv veränderten und diesbezüglich ein deutlicher Zusammenhang mit der Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe besteht. Vor dem Ausbau der Kläranlage war das Geschlechterverhältnis bei Gammariden unterhalb der Kläranlage in jeder Frühlingsprobenahme signifikant zugunsten der Weibchen verschoben. Dieser Effekt wurde auch im Frühling zwei Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage an der flussabwärts gelegenen Probestelle festgestellt. Die positiven Auswirkungen des Kläranlagen-Ausbaus wurden erst durch die Untersuchung der Langzeiteffekte deutlich: Drei und vier Jahre nach dem

Ausbau der Kläranlage war das Geschlechterverhältnis auch im Frühling nicht mehr signifikant zugunsten der Weibchen verschoben, zudem nahm der Unterschied zwischen dem Geschlechterverhältnis oberhalb und unterhalb der Kläranlage nach deren Ausbau kontinuierlich ab. Hinsichtlich der Fekundität weiblicher Gammariden schlug sich die komplexe Mischung des Mikroschadstoff-Cocktails vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe in toxischen Effekten unterhalb der KA nieder. Im Vergleich zu Weibchen, die oberhalb der Kläranlage untersucht wurden, war der Fekunditätsindex bei Weibchen unterhalb der Kläranlage vor deren Ausbau verringert. Die Unterschiede zwischen den Fekunditätsindizes bei Weibchen ober- und unterhalb der Kläranlage waren in den Herbstprobenahmen signifikant, in Frühling und Sommer als deutlicher Trend erkennbar. Bereits zwei Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage traten diese Unterschiede nicht mehr auf und wurden bis zum Ende des Effektmonitorings im Jahr 2017 nicht wieder festgestellt. Somit wird anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit Gammariden deutlich, dass der Ausbau der Kläranlage Langwiese mit einer Pulveraktivkohlestufe zu einer Reduktion toxischer (Fekundität) und endokriner (Geschlechterverhältnis) Effekte bei Gammariden unterhalb der Kläranlage geführt hat.

- *Spiegeln sich die gewonnenen Ergebnisse auf Individualebene auch in Untersuchungen auf Ebene der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft wider?*

Auch auf Ebene der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft wurden positive Veränderungen nach dem Ausbau der Kläranlage festgestellt. Bereits zwei Jahre nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe veränderten sich die Taxazahl, die Zahl sensibler Taxa und auch der Saprobienindex an PS 2 direkt unterhalb der Kläranlage deutlich, was als Indiz für eine Verbesserung des Zustands der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft angesehen werden kann. Vier Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage wurden diese Veränderungen durch Ähnlichkeitsanalysen, die für den kompletten Datensatz durchgeführt wurden, statistisch mit signifikanten Unterschieden zwischen der Struktur der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft vor und nach dem Ausbau der Kläranlage untermauert. An Probestelle 3, 15 km flussabwärts der Kläranlage, an der auch Untersuchungen mit Gammariden durchgeführt wurden, waren vier Jahre nach dem Ausbau noch keine deutlichen Auswirkungen desselben zu erkennen. Positive Veränderungen, die direkt unterhalb der Kläranlage festgestellt wurden, schienen hier durch die Belastung mit landwirtschaftlichen Einträgen überlagert zu sein. Auf Individualebene hingegen konnten anhand von Untersuchungen mit Gammariden an dieser Probestelle positive Veränderungen durch den Ausbau der Kläranlage festgestellt werden. Auch vor dem Ausbau der Kläranlage wurde gezeigt, dass die Auswirkungen des Kläranlageneinleiters, welche sich bei Gammariden an Probestelle drei bereits negativ bemerkbar machten, nicht zu Veränderungen der Integrität des Makrozoobenthos 15 km unterhalb der Kläranlage führten. Eine Veränderung und Verringerung des Mikroschadstoff-Cocktails durch den Ausbau der Kläranlage kann also auf

Individualebene bei Gammariden anhand endokriner und toxischer Untersuchungsmethoden an dieser Probestelle festgestellt werden, spiegelt sich jedoch noch nicht in Veränderungen der makrozoobenthischen Lebensgemeinschaft wider. Demzufolge scheint die Bestimmung der Fekundität und des Geschlechterverhältnisses bei Gammariden eine gute Methode zu sein, um in Form eines Frühwarnsystems Veränderungen im Gewässer aufzeigen zu können, bevor Reaktionen in der gesamten makrozoobenthischen Lebensgemeinschaften festgestellt werden können. Zudem wird deutlich, wie wichtig es ist, Untersuchungen auf verschiedenen biologischen Ebenen durchzuführen, um Auswirkungen verschiedenster gewässerbaulicher oder sonstiger gewässerbeeinflussender Maßnahmen umfassend beurteilen zu können.

- *Lassen sich die bei Gammariden ermittelten Effekte in Zusammenhang mit den im Rahmen des Verbundprojektes erhobenen chemisch-analytischen Daten sowie mit Ergebnissen verschiedenster Wirkpotential- und Effektuntersuchungen bringen?*

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Effekte bei Gammariden lassen sich in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Verbundpartner bringen. Vor dem Ausbau der Kläranlage Langwiese konnten sowohl direkt im Kläranlagenauslauf als auch an Probestelle drei, 15 km unterhalb der Kläranlage, anhand des E-Screens (Kuch 2017a, 2017b) und des Reporter-genassays mit Mammakarzinomzelllinien und HeLa-Zelllinien (Blaha und Benisek 2017) hohe östrogene Wirkpotentiale ermittelt werden. Diese spiegeln sich im Geschlechterverhältnis bei Gammariden wider, das vor Ausbau der Kläranlage signifikant zugunsten der Weibchen verschoben war. Durch den Ausbau der Kläranlage wurde die östrogene Aktivität im Kläranlagenablauf deutlich verringert. Hefe-basierte Reporter-genassays (Yeast Estrogen Screen – YES) zeigten, dass die konventionelle Reinigung der Kläranlage zwar bereits 76 % der östrogenen Aktivität reduzieren konnte, diese nach Ausbau aber nochmal um weitere 90-93 % reduziert wurde (Giebner und Oehlmann 2017). Dieses Ergebnis wurde auch durch Ergebnisse des E-Screens unterstützt: durch Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe wurde die östrogene Aktivität im Kläranlagenablauf um $86\% \pm 5\%$ reduziert (Kuch 2017b). Auch direkt im Freiland, 15 km unterhalb der Kläranlage (PS 3) wurden deutlich geringere östrogene Potentiale ermittelt (Blaha und Benisek 2017, Kuch 2017a). Diese Veränderungen decken sich wiederum mit den vorgestellten Ergebnissen der Untersuchung des Geschlechterverhältnisses. Dieses war vier Jahre nach Ausbau der Kläranlage auch im Frühling nicht mehr signifikant zugunsten der Weibchen verschoben, was auf eine Verringerung der östrogenen Potentiale zurückgeführt werden kann.

Anhand der chemischen Analytik wurden sehr deutliche Unterschiede zwischen der Entnahmeleistung der Kläranlage vor und nach deren Ausbau sichtbar. Der Einsatz von Pulveraktivkohle führte insbesondere für Carbamazepin, Metoprolol, 1H-Benzotriazol und Diclofenac, welche als nur mäßig

abbaubaren Verbindungen eingestuft werden, zu einer deutlich besseren Entnahmeleistung von über 80 % (Scheurer et al. 2017a). Doch nicht nur im Kläranlagenablauf direkt, sondern auch in der Schussen an Probestelle drei, 15 km unterhalb der Kläranlage, konnten positive Veränderungen festgestellt werden. Anhand von 17 ausgewählten Leitparametern wurden die positiven Auswirkungen des Kläranlagenausbaus im Freiland deutlich. An Probestelle drei konnte die Summe der in der Schussen nachweisbaren Leitparameter von 3,5 µg/L auf 2,0 µg/L reduziert werden (Scheurer et al. 2017b). Da die Fekundität weiblicher Gammariden in der Schussen unterhalb der Kläranlage vor deren Ausbau signifikant verringert war, kann als eine Ursache, trotz möglichem komplexen Zusammenspiel mehrerer weiterer die Fekundität beeinflussender Faktoren, die hohe Konzentration unterschiedlichster Schadstoffe angesehen werden. Nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe, wodurch sich die Konzentration ausgewählter Schadstoffe nachweislich stark verringerte (Scheurer et al. 2017a, 2017b), war auch die Fekundität bei Weibchen unterhalb der Kläranlage nicht mehr niedriger als bei Weibchen, die flussaufwärts der Kläranlage untersucht wurden. Ein Zusammenhang mit den analysierten Mikroschadstoffkonzentrationen ist demnach sehr plausibel.

Desweiteren ließen sich die Ergebnisse der Stressproteinanalyse bei Gammariden gut in Zusammenhang mit jenen in Fischen bringen. Gammariden und Fische wurden an den Probestellen zum selben Zeitpunkt entnommen. Aufgrund der großen Variabilität der Daten konnten bei Gammariden anhand der Stressproteinanalyse vier Jahre nach Ausbau der Kläranlage keine Unterschiede zwischen den Probestellen mehr ermittelt werden. Auch die Stressproteinanalyse in Leber-, Nieren- und Kiemenproben von im Freiland gefangener Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Schneider (*Alburnoides bipunctatus*) zeigte, dass es zwischen den einzelnen Jahren signifikante Unterschiede gab (Wilhelm et al. 2017). Diese Unterschiede wurden auch bei Analyse der Gammariden festgestellt und decken sich somit hinsichtlich der Stressproteinanalyse mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Fischen.

- *Führt die Erweiterung der Kläranlage Langwiese mit einer vierten Reinigungsstufe zu positiven Veränderungen im Ökosystem der Schussen?*

Die Ergebnisse aller in den Projekten „SchussenAktiv“, „SchussenAktivplus“ und „SchussenAktivplus+“ durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich der Ausbau der Kläranlage Langwiese vier Jahre nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe sehr positiv auf das Ökosystem der Schussen ausgewirkt hat. Neben den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen mit Gammariden zeigten auch freilebende und exponierte Fische einen deutlich verbesserten Gesundheitszustand und positive Veränderungen, insbesondere bei Betrachtung der Parameter Histologie, Genotoxizität und Biotransformation. Positive Veränderungen ließen sich auch anhand verschiedener Wirkpotenzialtests

nachweisen. Breitgefächerte chemische und mikrobiologische Analysen ergaben, dass im Mittel mehr als 80 % an Spurenstoffen und mehr als drei Zehnerpotenzen an Keimen durch Inbetriebnahme der zusätzlichen Reinigungsstufe entnommen wurden (Tribskorn 2017). Die umfassenden Ergebnisse des großangelegten Verbundprojekts „SchussenAktiv*plus*“ machen deutlich, dass der Ausbau einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe eine effektive und zudem bezahlbare Maßnahme darstellt, um langfristig den nach Wasserrahmenrichtlinie geforderten „guten chemischen und ökologischen Zustand“ unserer Fließgewässer zu erreichen und in Zukunft auch zu halten.

6 Literatur

- Abbeglen C, Siegrist H (2012): Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Bundesanstalt für Umwelt, Bern, Umwelt-Wissen 1214, p. 210.
- Amann E (2003): Flohkrebse (Gammaridae) in Vorarlberg. Vorarlberger Naturschau 12, S. 65-76.
- Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermandsen IM, Bonefeld-Jørgensen EC (2002): Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179(1), p. 1-12. doi: <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9347>
- Andreï J, Pain-Devin S, Felten V, Devin S, Giambérini L, Mehennaoui K, Cambier S, Gutleb AC, Guérol F (2016): Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda). *Environmental Pollution* 208, p. 608-618. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.036>
- Besse JP, Coquery M, Lopes C, Chaumot A, Budzinski H, Labadie P, Geffard O (2013): Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: towards the determination of threshold values. *Water Research* 47(2), p. 650-660. doi: [10.1016/j.watres.2012.10.024](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024)
- Blahe L, Benisek M (2017): Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese auf das Ökosystem der Schussen: Reporterassay mit Mammakarzinomzelllinie und HeLa-Zelllinie. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard Karls Universität Tübingen, Seite 284. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: [10.15496/publikation-15721](https://doi.org/10.15496/publikation-15721).
- Blarer P, Burkhardt-Holm P (2016): Microplastics affect assimilation efficiency in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research* 23(23), p. 23522-23532. doi: [10.1007/s11356-016-7584-2](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7584-2)
- BMUB/UBA (Hrsg.) (2016): Die Wasserrahmenrichtlinie - Deutschlands Gewässer 2015. Bonn, Dessau. 143 Seiten.
- Bollache L, Gambade G, Cézilly F (2001): The effects of two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*, on pairing success in male *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49(4), p. 296-303.
- Borowsky B (1984): The Use of the Males' Gnathopods During Precopulation in Some Gammaridean Amphipods. *Crustaceana* 47(3), p. 245-250. doi: [10.1163/156854084X00504](https://doi.org/10.1163/156854084X00504)
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1), p. 248-254. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brauch H-J (2013): Organische Spurenstoffe in Gewässern. *gwf Wasser | Abwasser* (12), p. 1206-1211.
- Brehm J, Meijering MP (1996): Fließgewässerkunde – Einführung in die Ökologie der Quellen, Bäche und Flüsse. Quelle und Meyer Verlag, Wiesbaden. 3. Auflage, 302 Seiten.
- Brettschneider DJ, Misovic A, Schulte-Oehlmann U, Oetken M, Oehlmann J (2019): Detection of chemically induced ecotoxicological effects in rivers of the Nidda catchment (Hessen, Germany) and development of an ecotoxicological, Water Framework Directive-compliant assessment system. *Environmental Sciences Europe* 31(1), p. 7. doi: [10.1186/s12302-019-0190-4](https://doi.org/10.1186/s12302-019-0190-4)
- Brückner I, Kirchner K, Müller Y, Schiwy S, Klaer K, Dolny R, Wendt L, Konemann S, Pinnekamp J, Hollert H, Rosenbaum MA (2018): Status quo report on wastewater treatment plant, receiving water's biocoenosis and quality as basis for evaluation of large-scale ozonation process. *Water Sci Technol* 77(1-2), p. 337-345. doi: [10.2166/wst.2017.548](https://doi.org/10.2166/wst.2017.548)

- Buchberger A-K, Brettschneider D, Berg K, Jungmann D, Oehlmann J, Scheurer M, Oetken M (2018): Effects of metoprolol on aquatic invertebrates in artificial indoor streams. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 53(8), p. 728-739. doi: 10.1080/10934529.2018.1444964
- Bundschuh M, Hahn T, Gessner MO, Schulz R (2017): Antibiotic mixture effects on growth of the leaf-shredding stream detritivore *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 26(4), p. 547-554. doi: 10.1007/s10646-017-1787-2
- Bundschuh M, Schulz R (2011): Ozonation of secondary treated wastewater reduces ecotoxicity to *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda): are loads of (micro)pollutants responsible? *Water Research* 45(13), p. 3999-4007. doi: 10.1016/j.watres.2011.05.007
- Cézilly F, Gregoire A, Bertin A (2000): Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* 120, p. 625-630.
- Chapman JW (2007): Amphipoda: Gammaridea. In: Carlton JT (Hrsg.), *The Light and Smith Manual. Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London. Seite 545-618.
- Chaumot A, Geffard O, Armengaud J, Maltby L (2015): Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring. p. 253-280. doi: 10.1016/b978-0-12-800949-9.00011-5
- Dalhoff K, Gottardi M, Rinnan Å, Rasmussen JJ, Cedergreen N (2018): Seasonal sensitivity of *Gammarus pulex* towards the pyrethroid cypermethrin. *Chemosphere* 200, p. 632-640. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.153>
- Daughton CG, Ternes TA (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107(Suppl 6), p. 907-938. doi: 10.1289/ehp.99107s6907
- de-la-Ossa-Carretero JA, Del-Pilar-Ruso Y, Giménez-Casalduero F, Sánchez-Lizaso JL (2016): Monitoring the effects of wastewater treatment strategies. *Environmental Monitoring and Assessment* 188(2), p. 110. doi: 10.1007/s10661-016-5092-y
- De Castro-Catala N, Munoz I, Riera JL, Ford AT (2017): Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environ Pollut* 231(Pt 1), p. 406-414. doi: 10.1016/j.envpol.2017.07.088
- di Lascio A, Rossi L, Carlino P, Calizza E, Rossi D, Costantini ML (2013): Stable isotope variation in macroinvertebrates indicates anthropogenic disturbance along an urban stretch of the river Tiber (Rome, Italy). *Ecological Indicators* 28, p. 107-114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.006>
- DVGW (Hrsg.) (2015): *Arzneimittelrückstände im Wasserkreislauf; eine Bewertung aus Sicht der Trinkwasserversorgung*. DVGW Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V., Bonn.
- Eggers TO, Martens A (2001): *Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschlands*. *Lauterbornia* 42, S. 1-68.
- Europäische Union (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. *Amtsblatt Nr. L 327 vom 22/12/2000 S. 0001 - 0073*.
- Gerhardt A, Kienle C, Allan IJ, Greenwood R, Guigues N, Fouillac AM, Mills GA, Gonzalez C (2007): Biomonitoring with *Gammarus pulex* at the Meuse (NL), Aller (GER) and Rhine (F) rivers with the online Multispecies Freshwater Biomonitor. *Journal of Environmental Monitoring* 9(9), p. 979-985. doi: 10.1039/b706619h
- Gerhardt A, Koster M, Lang F, Leib V (2012): Active in Situ Biomonitoring of Pesticide Pulses Using *Gammarus* spp. in Small Tributaries of Lake Constance. *Journal of Environmental Protection* 03(07), p. 573-583. doi: 10.4236/jep.2012.37069

- Giebner S, Oehlmann J (2017): Technologiebewertung: Östrogenität - Hefe-basierter Reporterassay. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard Karls Universität Tübingen, Seite 207-209. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Gómez-Canela C, Miller TH, Bury NR, Tauler R, Barron LP (2016): Targeted metabolomics of *Gammarus pulex* following controlled exposures to selected pharmaceuticals in water. *Science of the Total Environment* 562, p. 777-788. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.181>
- Götz C, Kase R, Hollender J (2011): Mikroverunreinigungen-Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU. Eawag, Dübendorf, p. 108.
- Haase P, Sundermann A, Schindehütte K (2004): Informationstext zur Operationellen Taxaliste als Mindestanforderung an die Bestimmung von Makrozoobenthosproben aus Fließgewässern zur Umsetzung der EU-Wasserrahmenrichtlinie in Deutschland. Forschungsinstitut Senckenberg, Abteilung für Limnologie und Naturschutzforschung. www.fliessgewaesserbewertung.de/download/bestimmung
- Harth FUR, Arras C, Brettschneider DJ, Misovic A, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Oetken M (2018): Small but with big impact? Ecotoxicological effects of a municipal wastewater effluent on a small creek. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 53(13), p. 1149-1160. doi: 10.1080/10934529.2018.1530328
- Henneberg A, Bender K, Blaha L, Giebner S, Kuch B, Köhler H-R, Maier D, Oehlmann J, Richter D, Scheurer M, Schulte-Oehlmann U, Sieratowicz A, Ziebart S, Triebkorn R (2014): Are in vitro methods for the detection of endocrine potentials in the aquatic environment predictive for in vivo effects? Outcomes of the projects SchussenAktiv and SchussenAktivplus in the Lake Constance area, Germany. *PloS one* 9(6), p. e98307. doi: 10.1371/journal.pone.0098307
- Henneberg A, Triebkorn R (2015): Efficiency of advanced wastewater treatment technologies for the reduction of hormonal activity in effluents and connected surface water bodies by means of vitellogenin analyses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Environmental Sciences Europe* 27(1), p. 22. doi: 10.1186/s12302-015-0056-3
- Hering D, Meier C, Rawer-Jost C, Feld CK, Biss R, Zenker A, Sundermann A, Lohse S, Böhmer J (2004): Assessing streams in Germany with benthic invertebrates: selection of candidate metrics. *Limnologica* 34(4), p. 398-415. doi: [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(04\)80009-4](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(04)80009-4)
- Jedele K, Müller M (2017): Testsysteme an Kläranlagen und Regenüberlaufbecken. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Seite 32-77. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Jungmann D, Berg K, Dieterich A, Frank M, Gräf T, Scheurer M, Schwarz S, Siewert C, Oetken M (2017): Health effects of metoprolol in epibenthic and endobenthic invertebrates—A basis to validate future in vitro biotests for effect-based biomonitoring. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 52(3), p. 189-200. doi: 10.1080/10934529.2016.1246930
- Karaman GS, Pinkster S (1977): Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part II. *Gammarus roeseli*-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde* 47(2), p. 165 - 196.
- Könemann S, Müller Y, Tschentscher D, Krauss M, Inostroza PA, Brückner I, Pinnekamp J, Schiwy S, Hollert H (2019): Combination of In Situ Feeding Rate Experiments and Chemical Body Burden Analysis to Assess the Influence of Micropollutants in Wastewater on *Gammarus pulex*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(5), p. 883-896.
- Kuch B (2017a): Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese auf das Ökosystem der Schussen: E-Screen Assay. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares

- Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard Karls Universität Tübingen, Seite 285-292. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Kuch B (2017b): Technologiebewertung: E-Screen Assay. In: Tribskorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard Karls Universität Tübingen, Seite 210-217. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Ladewig V, Jungmann D, Köhler H-R, Schirling M, Tribskorn R, Nagel R (2006): Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50(3), p. 370-383. doi: 10.1007/s00244-005-7039-0
- Langer M, Junghans M, Spycher S, Koster M, Baumgartner C, Vermeirssen E, Werner I (2017): Hohe ökotoxikologische Risiken in Bächen. NAWA SPEZ untersucht Bäche in Gebieten mit intensiver landwirtschaftlicher Nutzung. *Aqua & Gas* 97(4), p. 58-68.
- Langmaier S (2006): Ökologische Daten zum Vorkommen von Steinfliegen-Larven (Insecta: Plecoptera) im Bundesland Salzburg, Österreich. *Mitteilungen aus dem Haus der Natur Salzburg* 17, S. 76-82.
- Lewis S, Handy R, Cordi B, Billingham Z, Depledge M (1999): Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8(5), p. 351-368.
- LUBW (2008): Bewirtschaftungsziele für Fließgewässer. Arbeitshilfe zur Erstellung der Maßnahmenprogramme im Rahmen des ersten Bewirtschaftungsplans zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (German). Landesamt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- LUBW (2009): Schussenprogramm 2008 - Erfolgskontrolle und Maßnahmeoptimierung. Abschlussbericht. Landesamt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe. 87 Seiten.
- LUBW (Hrsg.) (2010): Die Schussen: Bilanz der Belastung eines Bodenseezuflusses. Entwicklung, gegenwärtiger Zustand und Zukunftsperspektiven für die Schussen aus wasserwirtschaftlicher Sicht. LUBW Landesamt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg Karlsruhe, 1. Auflage, 105 Seiten. ISBN: 1437-0166,
- Maier D, Benisek M, Blaha L, Dondero F, Giesy JP, Köhler H-R, Richter D, Scheurer M, Tribskorn R (2016): Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132, p. 47-58. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.036
- Maier D, Blaha L, Giesy JP, Henneberg A, Köhler H-R, Kuch B, Osterauer R, Peschke K, Richter D, Scheurer M (2015): Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Research* 72, p. 127-144. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.050
- Marcogliese DJ (2005): Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology* 35(7), p. 705-716. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.01.015
- Mazurová E, Hilscherová K, Šídlová-Štěpánková T, Köhler H-R, Tribskorn R, Jungmann D, Giesy JP, Bláha L (2010): Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and in vitro effects. *Journal of Soils and Sediments* 10(3), p. 423-433. doi: 10.1007/s11368-009-0166-x
- Mehennaoui K, Georgantzopoulou A, Felten V, Andrei J, Garaud M, Cambier S, Serchi T, Pain-Devin S, Guérolde F, Audinot J-N, Giambérini L, Gutleb AC (2016): *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) as a model organism to study the effects of silver nanoparticles. *Science of the Total Environment* 566-567, p. 1649-1659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.068>
- Meijering MP, Pieper HG (1982): Die Indikatorbedeutung der Gattung *Gammarus* in Fließgewässern. *Decheniana-Beihefte* 26, S. 111-113.

- Metzger S (2019) Kommunale Abwasserbehandlung: Nachgeschaltete Pulveraktivkohlestufe im Klärwerk bindet Arzneimittelwirkstoffe, www.klaerwerkinfo.de.
- Moog O, Graf W, Janecek B, Ofenböck T (2017): Sensitive Taxa. In: Moog O and Hartmann A (Hrsg.), Fauna Aquatica Austriaca. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft Österreich, Wien.
- Morley NJ, Costa HH, Lewis JW (2010): Effects of a chemically polluted discharge on the relationship between fecundity and parasitic infections in the chub (*Leuciscus cephalus*) from a river in southern England. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58(3), p. 783-792. doi: 10.1007/s00244-009-9386-8
- Munz NA, Fu Q, Stamm C, Hollender J (2018): Internal Concentrations in Gammarids Reveal Increased Risk of Organic Micropollutants in Wastewater-Impacted Streams. Environmental Science & Technology 52(18), p. 10347-10358. doi: 10.1021/acs.est.8b03632
- Ofenböck T, Moog O, Hartmann A, Stubauer I (Hrsg.) (2010): Leitfaden zur Erhebung der Biologischen Qualitätselemente, Teil A2–Makrozoobenthos. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft.
- OGewV (2011): Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV).
- Pöckl M (1993a): Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*). Natur und Museum 123, S. 114-125.
- Pöckl M (1993b): Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers. Freshwater Biology 30(1), p. 73-91. doi: 10.1111/j.1365-2427.1993.tb00790.x
- Pöckl M (2014): Süßwasser-Amphipoden: eine Liebeserklärung? – Selbstreflexionen eines so genannten „Spezialisten“. Denisia 33, S. 369-392.
- Pöckl M, Humpesch UH (1990): Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). Freshwater Biology 23(3), p. 441-455. doi: 10.1111/j.1365-2427.1990.tb00286.x
- Rolauffs P, Hering D, Sommerhäuser M, Rödiger S, Jähniß S (Hrsg.) (2003): Entwicklung eines leitbildorientierten Saprobienindex für die biologische Fließgewässerbewertung. Umweltbundesamt, Forschungsbericht 200 24 227, UBA-FB 000366. Auflage, ISBN: Texte 11/03,
- Rollin M, Coulaud R, Danger M, Sohm B, Flayac J, Bec A, Chaumot A, Geffard O, Felten V (2018): Additive effect of calcium depletion and low resource quality on *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) life history traits. Environ Sci Pollut Res Int 25(12), p. 11264-11280. doi: 10.1007/s11356-017-9390-x
- Rösch A, Gottardi M, Vignet C, Cedergreen N, Hollender J (2017): Mechanistic Understanding of the Synergistic Potential of Azole Fungicides in the Aquatic Invertebrate *Gammarus pulex*. Environmental Science & Technology 51(21), p. 12784-12795. doi: 10.1021/acs.est.7b03088
- Sanders BM (1993): Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Critical Reviews in Toxicology 23(1), p. 49-75.
- Schellenberg A (1942): Krebstiere oder Crustacea IV: Flohkrebse oder Amphipoda. In: Dahl F (Hrsg.), Die Tierwelt Deutschlands und angrenzende Meeresteile (40). Verlag von Gustav Fischer, Jena. 252 Seiten.
- Scheurer M, Richter D, Sacher F (2017a): Spurenstoffe: Anlagenbewertung. In: Tribskorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Seite 161-181. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Scheurer M, Richter D, Sacher F (2017b): Spurenstoffe: Auswirkungen auf das Gewässer. In: Tribskorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von

- Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Seite 250-267. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Nagel R, Triebskorn R, Köhler H-R (2005): Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49(1), p. 53-61. doi: 10.1007/s00244-004-0153-6
- Schirling M, Triebskorn R, Köhler H-R (2004): Variation in stress protein levels (hsp70 and hsp90) in relation to oocyte development in *Gammarus fossarum* (Koch 1835). *Invertebrate Reproduction & Development* 45(2), p. 161-167. doi: 10.1080/07924259.2004.9652585
- Schneider I, Oehlmann J, Oetken M (2015): Impact of an estrogenic sewage treatment plant effluent on life-history traits of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Environmental Science and Health Part A Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* 50(3), p. 272-281. doi: 10.1080/10934529.2015.981114
- Schwab H (1995): Süßwassertiere: ein ökologisches Bestimmungsbuch. Ernst Klett Verlag, Stuttgart. 1. Auflage, 320 Seiten.
- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U, Wehrli B (2006): The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313(5790), p. 1072-1077.
- Schwoerbel J (1999): Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 340 Seiten.
- Seel P, Knepper TP, Gabriel S, Weber A, Haberer K (1996): Kläranlagen als Haupteintragspfad für Pflanzenschutzmittel in ein Fließgewässer: Bilanzierung der Einträge. *Vom Wasser* 86, p. 247-262.
- Shahid N, Becker JM, Krauss M, Brack W, Liess M (2018a): Adaptation of *Gammarus pulex* to agricultural insecticide contamination in streams. *Science of the Total Environment* 621, p. 479-485. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.220>
- Shahid N, Becker JM, Krauss M, Brack W, Liess M (2018b): Pesticide Body Burden of the Crustacean *Gammarus pulex* as a Measure of Toxic Pressure in Agricultural Streams. *Environmental Science & Technology* 52(14), p. 7823-7832. doi: 10.1021/acs.est.8b01751
- StMUV (Hrsg.) (2017): Gewässer in Bayern - auf dem Weg zum guten Zustand. Bewirtschaftungspläne und Maßnahmenprogramme für den Zeitraum 2016 bis 2021. Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV),
- Straub S, Hirsch PE, Burkhardt-Holm P (2017): Biodegradable and Petroleum-Based Microplastics Do Not Differ in Their Ingestion and Excretion but in Their Biological Effects in a Freshwater Invertebrate *Gammarus fossarum*. *Int J Environ Res Public Health* 14(7), doi: 10.3390/ijerph14070774
- Sures B (2008a): Environmental parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite* 15(3), p. 434-438. doi: 10.1051/parasite/2008153434
- Sures B (2008b): Host-parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology* 73(9), p. 2133-2142. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02057.x
- Sures B, Radszuweit H (2007): Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Journal of Helminthology* 81(2), p. 191-197. doi: 10.1017/S0022149X07751465
- Sutcliffe DW (1993): Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): female strategies. *Freshwater Forum* 3(1), p. 26-64.
- Tatar S, Cıkcıkoglu Yildirim N, Serdar O, Yildirim N, Ogedey A (2018): The using of *Gammarus pulex* as a biomonitor in ecological risk assessment of secondary effluent from municipal wastewater treatment plant in Tunceli,

- Turkey. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 24(3), p. 819-829. doi: 10.1080/10807039.2017.1400374
- Triebskorn R (Hrsg.) (2017): Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, 410 Seiten. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Triebskorn R, Amler K, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung RM, Kneipp S, Köhler H-R, Kraus S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J, Wurm K (2013a): SchussenAktiv^{plus}: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. Environmental Sciences Europe 25(1), p. 1-9. doi: 10.1186/2190-4715-25-2
- Triebskorn R, Blaha L, Engesser B, Güde H, Hetzenauer H, Henneberg A, Köhler H-R, Kraus S, Maier D, Peschke K, Thellmann P, Vogel H-J, Kuch B, Oehlmann J, Rault M, Suchail S, Rey P, Richter D, Sacher F, Weyhmüller M, Wurm K (2013b): SchussenAktiv–Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. Korrespondenz Wasserwirtschaft 8, p. 427-437.
- Triebskorn R, Henneberg A, Maier D, Peschke K, Wilhelm S (2017): Methoden: Gewässer und Probestellen. In: Triebskorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Seite 26-32. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.
- Triebskorn R, Hetzenauer H (2012): Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. Environmental Sciences Europe 24(1), p. 1-24. doi: 10.1186/2190-4715-24-8
- Umweltbundesamt (Hrsg.) (2017): Gewässer in Deutschland: Zustand und Bewertung. Dessau-Roßlau.
- Villa S, Di Nica V, Bellamoli F, Pescatore T, Ferrario C, Finizio A, Lencioni V (2018): Effects of a treated sewage effluent on behavioural traits in *Diamesa cinerella* and *Daphnia magna*. Journal of limnology 77(1), doi: 10.4081/jlimnol.2018.1760
- von Fumetti S, Blaurock K (2018): Effects of the herbicide Roundup(R) on the metabolic activity of *Gammarus fossarum* Koch, 1836 (Crustacea; Amphipoda). Ecotoxicology 27(9), p. 1249-1260. doi: 10.1007/s10646-018-1978-5
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2002): Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. Environmental Toxicology and Chemistry 21(2), p. 445-450. doi: 10.1002/etc.5620210230
- Weber A, Scherer C, Brennholt N, Reifferscheid G, Wagner M (2018): PET microplastics do not negatively affect the survival, development, metabolism and feeding activity of the freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. Environmental Pollution 234, p. 181-189. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.014>
- Welton JS (1979): Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Freshwater Biology 9(3), p. 263-275. doi: 10.1111/j.1365-2427.1979.tb01508.x
- Westheide W, Rieger R (2013): Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Spektrum Akademischer Verlag, München. 3. Auflage, 894 Seiten.
- Wigh A, Geffard O, Abbaci K, Francois A, Noury P, Bergé A, Vulliet E, Domenjoud B, Gonzalez-Ospina A, Bony S, Devaux A (2017): *Gammarus fossarum* as a sensitive tool to reveal residual toxicity of treated wastewater effluents. Science of the Total Environment 584-585, p. 1012-1021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.154>

Wilhelm S, Henneberg A, Triebkorn R (2017): Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese auf das Ökosystem der Schussen: Stressproteinanalysen. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Universitätsbibliothek, Seite 306-310. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.

Williams K, Green D, Pascoe D (1984) Toxicity testing with freshwater macroinvertebrates: Methods and application in environmental management, p. 81, Pergamon.

Wurm K (2017): Effekte in der Biozönose: Methoden. In: Triebkorn R (Hrsg.), Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Universitätsbibliothek, Seite 117-121. ISBN: 978-3-946552-11-6, doi: 10.15496/publikation-15721.

Zubrod JP, Baudy P, Schulz R, Bundschuh M (2014): Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquat Toxicol* 150, p. 133-143. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.002

Quellenangaben zu Logos in Abbildung 1. Alle angegebenen Links der entsprechenden Internetseiten wurden zuletzt am 15.05.2019 auf ihre Richtigkeit überprüft:

Abwasserzweckverband Mariatal: <https://www.energas-gmbh.de/wp-content/uploads/2017/07/energas-referenzen-azv.png>

Abwasserverband Unteres Schussental: <http://www.av-unteres-schussental.de/data/index.php>

BBW Biologiebüro Weyhmüller, Achberg: von Michael Weyhmüller im Rahmen des Projekts SchussenAktiv zur Verfügung gestellt, Januar 2010

Eberhard Karls Universität Tübingen: <https://fdat.escience.uni-tuebingen.de/portal/img/logo-uni-2.png>

Gemeinde Eriskirch am Bodensee: <https://www.eriskirch.de/files/media/logo/logo.png>

Gemeinde Merklingen: <http://www.merklingen.de/fileadmin/templates/images/logo.jpg>

GÖL Gewässerökologisches Labor, Starzach: von Dr. Karl Wurm im Rahmen des Projekts SchussenAktiv zur Verfügung gestellt, Januar 2010

Goethe Universität Frankfurt am Main: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/f/f0/Goethe-Logo.svg>

Hydra (Peter Rey, Institut für angewandte Hydrobiologie, Konstanz): <https://www.hydra-institute.com/de/>

Jedele und Partner GmbH, Stuttgart: https://compa.pure-bw.de/sites/default/files/styles/company_profile_logo_cropped/public/company_profile_logo/JuP_Logo_mit_Schriftzug.png?itok=miyrk6l7

KIT Karlsruher Institut für Technologie:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3a/Logo_KIT.svg/1280px-Logo_KIT.svg.png

LUBW Institut für Seenforschung, Langenargen: <https://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/standorte/langenargen>

Masaryk-Universität in Brünn, Tschechien:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/12/Logo_Masaryk_University.svg/800px-Logo_Masaryk_University.svg.png

Ökonsult Stuttgart: <http://www.oekonsult-stuttgart.de/>

Regierungspräsidium Tübingen: Regierungspräsidium Tübingen (2017): Grundwasserüberwachungsprogramm. Regionalbericht für den Regierungsbezirk Tübingen. Ergebnisse der Beprobung 2017. Deckblatt.

Steinbeis-Transferzentrum Ost-West-Kooperationen: https://stz-ost-west.de/wp-content/uploads/2017/04/STZ-Logo_web.jpg

Stadt Tettngang: <http://tettngang.de/tt/wGlobal/layout/images/logos/logo.png>

Stadt Ravensburg: <https://www.ausbildungsscout-ravensburg.de/assets/uploads/5ab95-logo.jpg>

TZW Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe: https://www.dvgw.de/medien/_processed_/5/7/csm_tzw-logo_b83e030bc1.jpg

Universität Avignon, Frankreich: http://www.ed-archmat-ejd.eu/images/avignon_imbe.png

Universität Stuttgart: https://www.beschaefigte.uni-stuttgart.de/uni-services/oeffentlichkeitsarbeit/corporate-design/cd-dateien/01_Logo/jpg/unistuttgart_logo_de.jpg

Teil II: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen

Kapitel 1: SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany

Triebskorn R, Amler K, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneber A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung J-M, Kneipp S, Köhler H-R, Kraus S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J and Wurm K

Environmental Sciences Europe 25: 2. DOI: 10.1186/2190-4715-25-2

Hohe Beteiligung an der Erarbeitung der Grundlagen für das Manuskript: Planung und Organisation der Entnahme von Gammariden und Wasserproben (limnochemische Analytik) aus dem Freiland. Beteiligung an Aufbau und Installation der Bypass-Anlagen, Mithilfe bei Fischprobenahmen in Bypässen und im Labor. Eigenanteil an der Erstellung des Manuskripts: fachlicher Teil zu Gammariden sowie komplette Manuskriptkorrektur.

Kapitel 2: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg

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

Korrespondenz Wasserwirtschaft Nr. 8: 427-436. DOI: 10.3243/kwe2013.08.001

100 % Eigenanteil an Planung und Organisation der Entnahme von Gammariden und Wasserproben (limnochemische Analytik) aus dem Freiland. Die Probenahme im Freiland sowie die Analyse der physico-chemischen Wasserparameter erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Universität Tübingen. 95 % Eigenanteil an der Bearbeitung der gesammelten Flohkrebse: Bestimmung der Art, Bestimmung des Geschlechts, Bestimmung der Fekundität. 100 % Eigenanteil an der

Bearbeitung der Stressproteinanalyse in Gammariden sowie statistischer Auswertung aller flohkrebsspezifischer Daten. Beteiligung an Aufbau und Installation der Bypass-Anlagen, Mithilfe bei Fischprobenahmen in Bypässen und im Labor.

Kapitel 3: Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen

Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Triebkorn R

Ecotoxicology and Environmental Safety 106: 115-124; DOI: 101016.j.ecoenv.2014.04.011

100 % Eigenanteil an Planung und Organisation der Entnahme von Gammariden und Wasserproben (limnochemische Analytik) aus dem Freiland. Die Probenahme im Freiland sowie die Analyse der physico-chemischen Wasserparameter erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Universität Tübingen. 95 % Eigenanteil an der Bearbeitung der gesammelten Flohkrebse: Bestimmung der Art, Bestimmung des Geschlechts, Bestimmung der Fekundität. 100 % Eigenanteil an der Bearbeitung der Stressproteinanalyse in Gammariden und der graphischen Darstellung sowie statistischer Auswertung aller flohkrebsspezifischer Daten. Die Erhebung des Makrozoobenthos wurde von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) durchgeführt. 100 % Eigenanteil bei der Erstellung der Graphen zu Ergebnissen der Makrozoobenthos-Untersuchungen. 100 % Eigenanteil bei der Erstellung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift „Ecotoxicology and Environmental Safety“. Fachliche Betreuung durch Prof. Dr. Rita Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen).

Kapitel 4: Reaktionen von Flohkrebsen und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe

Peschke K, Burmester J, Hermann M, Köhler H-R, Reitter K, Scheurer M, Wurm K und Triebkorn R

gwf - Wasser/Abwasser 157(4): 370-379

100 % Eigenanteil an Planung und Organisation der Entnahme von Gammariden und Wasserproben (limnochemische Analytik) aus dem Freiland. Die Probenahme im Freiland sowie die Analyse der physico-chemischen Wasserparameter erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Universität Tübingen. 98 % Eigenanteil an der Bearbeitung gewonnener Proben im Zeitraum vor

Ausbau der Kläranlage. Betreuung von Bachelorkandidatinnen/-kandidaten (Janne Burmester, Markus Hermann und Katharina Reitter), die im Rahmen ihrer Abschlussarbeit die gewonnenen Proben im Zeitraum nach dem Ausbau der Kläranlage bearbeitet haben. 100 % Eigenanteil bei der statistischen Auswertung aller flohkrebsspezifischer Daten sowie graphischer Darstellung der Ergebnisse. Die Erhebung des Makrozoobenthos wurde von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) durchgeführt und die chemische Analytik der entnommenen Flohkrebse erfolgte durch Dr. Marco Scheurer (TZW Karlsruhe). 100 % Eigenanteil bei Erstellung der Graphen zu Ergebnissen der Makrozoobenthos-Untersuchungen. 100 % Eigenanteil bei Erstellung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift „gwf – Wasser/Abwasser“. Fachliche Betreuung durch Prof. Dr. Rita Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen).

Kapitel 5: Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macro-invertebrates: individual and community responses

Peschke K, Capowiez Y, Köhler H-R, Wurm K and Triebkorn R

Frontiers in Environmental Science 7: 64; DOI: 10.3389/fenvs.2019.00064

100 % Eigenanteil an Planung und Organisation der Entnahme von Gammariden und Wasserproben (limnochemische Analytik) aus dem Freiland. Die Probenahme im Freiland sowie die Analyse der physico-chemischen Wasserparameter erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Universität Tübingen. 98 % Eigenanteil an der Bearbeitung gewonnener Proben im Zeitraum vor Ausbau der Kläranlage. Betreuung von Bachelorkandidatinnen/-kandidaten (Janne Burmester, Helene Eckstein, Markus Hermann, Katharina Reitter, Danina Schmidt), die im Rahmen ihrer Abschlussarbeit die gewonnenen Proben im Zeitraum nach dem Ausbau der Kläranlage bearbeitet haben. 100 % Eigenanteil bei der statistischen Auswertung aller flohkrebsspezifischer Daten sowie graphischer Darstellung der Ergebnisse. Die Erhebung des Makrozoobenthos wurde von Dr. Karl Wurm (Gewässerökologisches Labor Starzach) durchgeführt und die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch Dr. Yvan Capowiez (INRA Avignon, Frankreich). 85 % Eigenanteil bei Erstellung der Graphen zu Ergebnissen der Makrozoobenthos-Untersuchungen. 100 % Eigenanteil bei Erstellung des Manuskripts zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift „Frontiers in Environmental Science, Water and Wastewater Management“. Fachliche Betreuung durch Prof. Dr. Rita Triebkorn (Universität Tübingen) und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen).

Teil III: Wissenschaftliche Arbeiten

Kapitel 1: SchussenAktiv*plus*: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany

Rita Triebkorn^{1*}, Klaus Amler², Ludek Blaha³, Claudia Gallert⁴, Sabrina Giebner⁵, Hans Güde⁶, Anja Henneberg¹, Stefanie Hess⁷, Harald Hetzenauer⁶, Klaus Jedele⁸, Ralph-Michael Jung⁹, Sven Kneipp¹⁰, Heinz-R Köhler¹, Stefanie Kraiss¹, Bertram Kuch¹¹, Claudia Lange¹¹, Herbert Löffler⁶, Diana Maier¹, Jörg Metzger¹¹, Michael Müller⁸, Jörg Oehlmann⁵, Raphaela Osterauer¹, Katharina Peschke¹, Jürgen Raizner¹², Peter Rey¹³, Magali Rault¹⁴, Doreen Richter¹⁵, Frank Sacher¹⁵, Marco Scheurer¹⁵, Jutta Schneider-Rapp², Merav Seifan¹⁶, Markus Spieth¹⁷, Hans-Joachim Vogel¹⁸, Michael Weyhmüller¹⁹, Josef Winter⁷ and Karl Wurm²⁰

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

² Ökonsult, Gerberstr. 9, Stuttgart 70178, Germany

³ RECETOX-Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 3, Brno CZ-62500, Czech Republic

⁴ Department Microbiology and Biotechnology, University of Applied Sciences Emden Leer, Constantiaplatz 4, Emden D-26723, Germany

⁵ Department Aquatic Ecotoxicology, Goethe University Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 13, Frankfurt am Main D-60323, Germany

⁶ ISF LUBW, Baden-Württemberg State Institute for the Environment, Measurement and Nature Conservation, Institute for Lake Research, Argenweg 50/1, Langenargen D-88085, Germany

⁷ Institute of Biology for Engineers and Biotechnology of Wastewater Treatment, Karlsruhe Institute of Technology, Am Fasanengarten, Karlsruhe D-76128, Germany

⁸ JuP, Dr.-Ing. Jedele und Partner GmbH, Industriestraße 2, Stuttgart D-70565, Germany

⁹ AZV (Wastewater treatment authority) Mariatal / City of Ravensburg, Seestr.36, Ravensburg D-88214, Germany

¹⁰ Municipality of Merklingen, Hauptstraße 31, Merklingen D-89188, Germany

¹¹ Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Bandtäle 2, Stuttgart D-70569, Germany

¹² Steinbeis Transfer Center East-West Cooperation, Kaplaneigasse 8, Deggingen D-73326, Germany

¹³ Hydra-Institute, Fürstenbergstr. 25, Konstanz D-78467, Germany

¹⁴ Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse UMR 7263 CNRS-IRD, IMBE, 301 rue Baruch de Spinoza BP21239 F-84916 Avignon Cedex 09, Avignon, France

¹⁵ Water Technology Center Karlsruhe (TZW), Karlsruher Straße 84, Karlsruhe D-76139, Germany

¹⁶ Department of Plant Ecology, University of Tuebingen, Auf der Morgenstelle 3, Tuebingen D-72076, Germany

¹⁷ AV Unteres Schussental, Montfortplatz 7, Tettngang D-88069, Germany

¹⁸ Regional Commission (RP) Tübingen, Konrad-Adenauerstr. 20, Tübingen D-72072, Germany

¹⁹ BBW Biology Laboratory Achberg, Am Königsbühl 15, Achberg D-88147, Germany

²⁰ GÖL Water Ecology Laboratory Starzach, Tulpenstr. 4, Starzach D-72181, Germany

* Correspondence: rita.triebhorn@uni-tuebingen.de

Abstract

The project focuses on the efficiency of combined technologies to reduce the release of micropollutants and bacteria into surface waters via sewage treatment plants of different size and via stormwater overflow basins of different types. As a model river in a highly populated catchment area, the river Schussen and, as a control, the river Argen, two tributaries of Lake Constance, Southern Germany, are under investigation in this project. The efficiency of the different cleaning technologies is monitored by a wide range of exposure and effect analyses including chemical and microbiological techniques as well as effect studies ranging from molecules to communities.

Background

According to the European Water Framework Directive, a “good ecological and chemical status of surface waters” has to be achieved by 2015. In the context of this requirement, the release of micropollutants and pathogens into surface waters via wastewater treatment plants (WWTPs) has come into the focus of scientists as well as of politicians. Concomitantly, several research projects, as e. g. the EU project “Poseidon” [1], the Swiss project “Strategy Micropoll” [2] or long-term activities of NORMAN network (<http://www.norman-network.net/>) have investigated the efficiency of different technologies in WWTPs, as e. g. ozonation or charcoal filters, to lower concentrations of micropollutants in surface waters. The efficiency and practical suitability of these technologies and their respective advantages and disadvantages were assessed for example by Beier and colleagues [3]. Stalter and co-workers [4] and Schrank and colleagues [5] critically discuss the creation of toxic metabolites by ozonation and recommend always to combine ozonation with any type of filters, e. g. sand filters. As a major advantage of ozonation Abegglenand and colleagues [2] and Margot and colleagues [6] stress its efficiency to reduce pathogens in addition to micropollutants.

In contrast to WWTPs, less attention has been paid up to now to storm water overflow basins (SOBs) as important sources for the release of micropollutants and bacteria into surface waters [7]. In two studies, Brunner and colleagues [8] showed the efficiency of retention soil filters for the reduction of particular and dissolved material as well as for ammonia, and Waldhoff and co-workers [9] found bacteria to be reduced by up to 90%.

Up to now, an integrative approach to address simultaneously WWTP and SOBs, micropollutants and pathogens and combinations of different cleaning technologies to reduce their release into surface waters has not been realized so far which makes the project SchussenAktiv*plus* highly innovative with this respect. A further outstanding advantage of this project is, in addition, that the efficiency of the applied technologies is not only checked by means of chemical and microbiological analyses but, in

parallel, by a wide range of ecotoxicological and ecological effect studies ranging from the molecular to the community level. Based on this holistic approach it will be possible to establish causal relationships between exposure data, results from laboratory tests indicating toxic or endocrine potentials, and effect data in feral animals by means of plausibility chains as outlined by Triebkorn and colleagues [10].

As a model for a densely populated catchment area, the catchment area of the river Schussen, one major tributary of Lake Constance, is under investigation in this project. In total, 20 WWTPs and more than 100 SOBs are connected to this river. Recently, Triebkorn & Hetzenauer [11] reported on relatively high micropollutant burdens of the Schussen river compared to two other tributaries of Lake Constance, the Argen and the Seefelder Aach. Lake Constance itself is one of the most important drinking water reservoirs in Germany and furthermore serves as a popular recreation site and intensely used natural bathing freshwater. Consequently, minimizing the risk for man and the environment resulting from micropollutant and pathogen discharges into this ecosystem is of great public interest especially with respect to the precautionary principle.

Aim of the project

The project aims at providing a scientifically sound concept for an extended sewage and rainwater treatment in densely populated river catchment areas in view to reduce micropollutants and sanitarly relevant pathogens (including antibiotic-resistant bacteria) in surface waters. By a combination of chemical and microbiological analyses and effect-oriented biological studies which reflect consequences of the applied technologies for biota in the rivers from the molecular to the community level, the effectiveness of the applied technologies will be assessed. In addition, the optimization of assays that characterize exposure and biological effect is envisaged. Extrapolation of data on micropollutant and pathogen reduction to the entire catchment area of the river Schussen will result in scenarios whose potential for implementation will be critically assessed by a comprehensive cost-benefit analyses.

Key activities

Prior and after application of different sewage and rainwater treatment technologies (including e. g. combinations of ozonation with sand and charcoal filters) the release of micropollutants and bacteria (including antibiotic-resistant bacteria) is investigated in five different test systems (three WWTPs of different size and two SOBs). In parallel, the resulting reduction of toxic and endocrine potentials in effluents of the test systems, in stream water of the receiving water course, and its sediments are quantified at five different field sites at the Schussen river as well as at one control site at the river

Argen. In addition, the putative decrease of harmful potentials in freshwater species are recorded by various biological *in vitro* and *in vivo* tests. Concomitantly, real effects of the innovative cleaning technologies are traced in the ecosystem by effect analyses in different indigenous fish species and benthic invertebrates that serve as their feed (Figure 1).

In parallel to the scientific progress, results and information on their implications will be actively disseminated among the public and selectively communicated to stakeholders and policy makers.

Work packages (WPs)

WP 1a: Technological improvement of wastewater treatment plants and stormwater overflow basins

Jedele & Partner GmbH, Stuttgart takes over the technical implementation of new technology, maintenance, servicing, and optimization at the following five test systems (three WWTPs and two SOBAs).

Test system 1 WWTP Langwiese, Association for Sewage Treatment (AZV) Mariatal.

The WWTP Langwiese of the AZV Mariatal is the model for a large WWTP with about 170,000 population equivalents (PE). It will be equipped with an active charcoal filter on a large scale. The installation will be finished in spring 2013. Powdered activated carbon will be added to the main flow after the biological treatment and before the contact filter.

Test system 2 WWTP Eriskirch, Association for Sewage Treatment (AV) Unteres Schussental.

With about 40,000 PE, test system 2 is a model for a medium-sized WWTP. Here, a combination of ozonation, sand filter, and granulated activated carbon filter has been realized on a semi-industrial scale, i. e. in a partial flow of the effluent.

Test system 3 WWTP Merklingen, community of Merklingen.

In test system 3, our model for a small WWTP (2400 PE) ozonation has been combined with an existing slow sand filter on a large-scale.

Test system 4 Stormwater overflow basin Mariatal, town of Ravensburg.

Using this test system will allow investigation on a semi-industrial scale whether the separation and retention of solids can be improved by the installation of a lamella separator.

Test system 5 Stormwater overflow basin connected to a retention soil filter Tettang, town of Tettang.

In this already existing test system the efficiency of rainwater treatment with final purification by a retention soil filter is investigated.

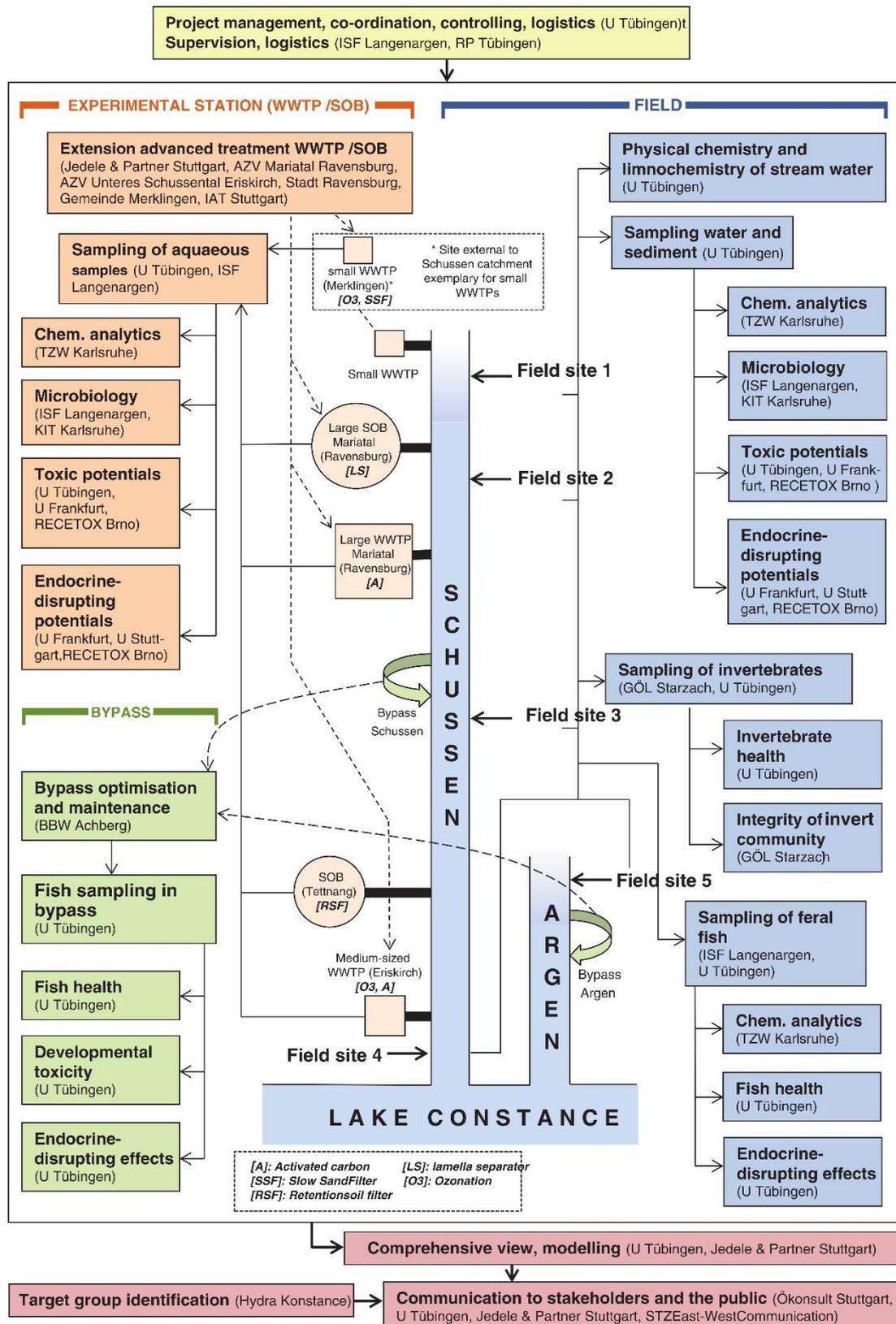


Figure 1: Summary of the project concept (WWTP: wastewater treatment plant; SOB: stormwater overflow basin)

WP 1b: Bypass systems

At the Schussen river downstream the WWTP Langwiese and, as a control, at the river Argen, two flow-through bypass systems have been established by **BBW Achberg** for active monitoring purposes. These mesocosms consist of five 250 L aquaria each flown through by 0.4 L/s of stream water. In each of the two systems, two aquaria can be heated up to 8 °C. In these semi-field test systems, embryo tests with trout and exposure experiments with adult trout and gammarids are performed.

WP 2: Chemical analyses

The Water Technology Center, Karlsruhe (TZW) is analyzing micropollutants and heavy metals in wastewater, surface water, sediments, and fish tissue samples. Furthermore, hydrochemical water parameters are regularly recorded. Micropollutants like e. g. pharmaceuticals are analyzed by gas or liquid chromatography coupled to mass spectrometry. By combining appropriate extraction and enrichment techniques during sample pre-treatment, a high selectivity and sensitivity is achieved. The analytical techniques used for solid samples are similar to those used for water samples but require a sample preparation that efficiently removes co-extracted matrix compounds. The analysis of fish tissue samples and sediments focus on more non-polar compounds (e. g. polycyclic aromatic hydrocarbons) which are more likely to accumulate in these compartments.

A total of > 150 micropollutants are analyzed in more than 75 water samples and 120 sediment and tissue samples. Additionally, some pharmaceuticals and the artificial sweetener acesulfame have been defined as indicator compounds with a constant discharge in recipient waters. To control the upgrading measures with sufficiently high resolution in time these indicator compounds are measured in 65 additional wastewater samples.

WP 3: Microbiological analyses

The Institute for Lake Research, Langenargen (ISF) determines concentrations of fecal bacteria (*E. coli* [EC] and intestinal enterococci [IE]) in water samples of the five tests systems as well as in surface water and sediments of the five field sites. In order to obtain directly colonies for further isolation, agar plate methods were preferred over MPN procedures with liquid media for determining concentrations of fecal bacteria. For EC quantification appropriately diluted samples are plated on ECD agar (Merck) [12]. In agreement with criteria applied in ISO EN 9508-32, colonies with glucuronidase and indole reaction area counted as EC. Concentrations of IE are determined according to ISO EN 7899-2 by counting colonies with positive esculin reaction of isolates grown on Slanetz- Bartley agar. Because river sediments were shown to be potentially important intermediate storage sites of fecal bacteria that can be mobilized after re-suspension at increasing water discharge [13], special attention is given to this aspect by testing growth, survival, and mobilization of fecal bacteria after re-suspension

of selected isolates. Finally, it is attempted to estimate the effect of climate changes on the loads of fecal bacteria in the field by means of simple climate scenario models.

Antibiotic resistance is one of the most serious health threats of the 21st century. For this reason, the spread of resistant microorganisms into the environment should be restricted. The contribution of the ***Institute of Biology for Engineers and Biotechnology of Wastewater, KIT Karlsruhe*** is to isolate, to identify, and to determine the percentage of strains resistant to antibiotics in species of staphylococci, enterococci, and *E. coli* that are introduced into the aqueous environment by discharge of 'purified' wastewater. It will be evaluated, whether advanced treatment technologies of municipal wastewater could reduce the risk of dissemination of microorganisms, especially of antibiotic-resistant bacteria.

Distinct selective media like mannitol salt agar and Chapman-Stone agar are used to isolate staphylococci from sewage, treated sewage, and surface waters. The isolated cultures are identified at the species level by the use of physiological tests in Micronaut-Staph®- microtiter plates. Antibiotic susceptibility to oxacillin, ciprofloxacin, erythromycin, and clindamycin is tested by the Kirby-Bauer method according to DIN 58940 [14]. The presence of the *mecA*-gene in methicillin/oxacillin-resistant staphylococci, especially in *S. aureus* (MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) is revealed by PCR and agarose-gel electrophoresis. In cooperation with ISF Langenargen, isolated fecal indicator organisms are identified and antibiotic susceptibility against β -lactam antibiotics (ESBL: extended-spectrum β -lactamase), ciprofloxacin, and sulfamethoxazol/trimethoprim are tested with *E. coli* isolates. Antibiotic susceptibility against vancomycin (VRE: vancomycin-resistant enterococci) and ampicillin tested with enterococci-isolates are used to describe the resistance pattern of environmental species. Additionally, the presence of the respective antibiotic-resistance genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *vanA-E*, *vanG*) is examined.

WP 4: Effect analyses

To assess **toxic and endocrine potentials** in water samples from the five test systems as well as in surface water and sediments of the five field sites, several laboratory tests are applied.

These include several types of *in vitro* assays (e. g. reporter gene assays using yeast and vertebrate cell lines), but also *in vivo* laboratory tests, as e. g. the Early Life Stage-test with the zebrafish *Danio rerio* or the growth inhibition tests with *Lumbriculus variegatus* or *Lemna minor*. The reporter gene bioassays are based on genetically modified cell lines, which have been stably transfected with specific reporter genes (e. g. firefly luciferase). Reporter genes are induced and translated in the presence of specifically acting compounds (e. g. estrogens, androgens etc.), and the enzymatic activity of the reporter protein is easily determined (e. g. measuring bioluminescence). The detection of antagonistic activity requires a background concentration of the agonistic reference substance and, hence, antagonistic activity in the sample leads to a reduced expression and activity of the reporter enzyme

(i.e. decrease in luminescence or color change). This battery of bioassays therefore provides a comprehensive overview of the overall toxicity of the test samples (e.g. surface water, effluent or sediment).

Toxic and endocrine effects, in contrast, are investigated *in vivo* either in feral fish (chub [*Leuciscus cephalus*], spiralin [*Alburnoides bipunctatus*]), and gammarids directly taken from the field, or in animals (trout [*Salmo trutta* f. *fario*, *Oncorhynchus mykiss*] and gammarids) exposed to the river water in the flow-through bypass systems under semi-field conditions.

Tests indicating either toxic or endocrine potentials and effects are summarized in Table 1.

Toxic potential and effects

Genotoxicity

Possible genotoxic effects of concentrated samples are determined by the **University of Frankfurt/Main** with bacterial tests like the *umu*- test and Ames fluctuation bioassay using *Salmonella typhimurium* [15, 16]. The *umu*- assay is a so-called indicator test due to the fact that it detects primary DNA damage. In contrast, the Ames micro-suspension bioassay measures base substitution and frameshift mutagenesis. In addition, the **University of Tuebingen** investigates genotoxicity *in vivo* by means of the micronucleus test in erythrocytes of fish.

Proteotoxicity

At the **University of Tuebingen**, stress proteins are under investigation in fish tissues and gammarids sampled at the Schussen and the Argen at four field sites or exposed in the bypass systems as a biomarker of toxic effect related to proteotoxicity [17]. To quantify levels of the 70 kD stress protein family (Hsp70), a quantitative immunoblotting procedure using SDS-gel electrophoresis and monoclonal antibodies in reference to total protein and an internal Hsp70 standard [18] is used. Hsp70 levels are determined in liver, kidney, gills, and gonads of two indigenous fish species, chub and spiralin, as well as in trout exposed in the bypass systems.

Dioxin-like toxicity

By **RECETOX, Brno**, dioxin-like toxicity *in vitro* is investigated using a rat hepatoma cell line H4IIE.luc, which determines dioxin-like action (generated by e.g. PCBs, dioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons etc.) by measuring luciferase activity under the control of the arylhydrocarbon receptor (AhR) [19]. In parallel, at the **University of Frankfurt/Main** agonistic activity at the aryl-hydrocarbon receptor is examined with a yeast- based bioassay [20]. *In vivo*, AhR-mediated effects are in the focus of CYP1A1 measurements in liver and gill samples of chub and trout. The EROD activity, which is photometrically determined at the **University of Tuebingen** according to [21], reflects the cytochrome P450IA1 biotransformation activity in these respective organs.

Table 1: Summary of bio-assays and biotests used in SchussenAktivplus

Indication level	Test
Toxic potentials	umu-test, Ames test (genotoxicity)
	in vitro reporter gene assays (vertebrate cells, yeasts) controlled by Ah-receptor (dioxin-like toxicity)
	GH3, RTL-W1-cell culture (cytotoxicity)
	ELS-tests with zebrafish (developmental toxicity)
	Growth inhibition test with <i>Lumbriculus variegatus</i> (developmental toxicity)
	Growth inhibition test with <i>Lemna minor</i> (phytotoxicity)
Toxic effects	Early life stage tests with trout (developmental toxicity)
	Acetylcholinesterase inhibition in the fish brain (neurotoxicity)
	Cytochrome P450IA1 (EROD) in fish liver and gills (dioxin-like toxicity)
	Histopathology of fish liver, gills, and kidney and gammarid tissues (cytotoxicity, fish and invertebrate health)
	Stress protein Hsp 70 (proteotoxicity)
	Micronucleus test in fish blood cells (genotoxicity)
	Macrozoobenthos community (community integrity)
Endocrine potentials	E-Screen (estrogenicity)
	Reporter gene assays in vitro (estrogenicity, androgenicity, anti-androgenicity)
	Reproduction test with the snail <i>Potamopyrgus variegatus</i> (estrogenicity)
Endocrine effects	Vitellogenin in juvenile and male trout (estrogenicity)
	Gonad histology of fish and gammarids,
	Gonadosomatic index (GSI) in fish (estrogenicity, androgenicity)
	Sex ratio and fecundity in gammarids (estrogenicity, androgenicity)

Phytotoxicity

As an *in vivo* toxicity test indicating phytotoxicity in samples of the five test systems, river surface water, and sediments, the **University of Frankfurt/Main** makes use of the *Lemna minor* growth inhibition test according to OECD [22].

Neurotoxicity

With respect to impact of neural function, one enzyme group of interest are cholinesterases including acetylcholinesterases (ACHE). Fish brain exhibits ACHE activity involved in the deactivation of acetylcholin at nerve endings, preventing continuous neuronal firing, which is essential for normal functioning of sensory and neuromuscular systems. Many organophosphate and carbamate pesticides are reported to be effective ACHE inhibitors [23]. Activity measurements of ACHE are carried out spectrophotometrically on fish brain extracts at the **University of Avignon** according to [24] in cooperation with the University of Tuebingen.

Cytotoxicity / tissue impairment

To evaluate the degree in reducing non-specific toxicity by the new wastewater treatment technologies, two cytotoxicity assays using vertebrate cell lines (a rat pituitary and a rainbow trout liver cell line) are applied by the **University of Frankfurt/Main**. These cell lines were chosen because of their high sensitivity and ecological relevance. *In vivo*, cytotoxicity reflected by impaired tissue

integrity is studied at the **University of Tuebingen** in feral fish (chub and spiralin) and gammarids, as well as in trout and gammarids exposed to the river water in the bypass-systems at the Schussen and Argen. In fish, the health status of liver, kidney, and gills and, in gammarids, the integrity of the hepatopancreas is described and semi-quantitatively assessed by means of a five-scaled classification protocol [25, 26]. In addition, the degree of parasitic infestation is determined in fish and gammarids.

Developmental toxicity

In order to reveal negative impacts on the development of fish and invertebrates, at the **University of Tuebingen**, early life stage (ELS) tests with brown trout (*Salmo trutta f. fario*) and zebrafish (*Danio rerio*) are conducted. Tests with trout are performed according to [27] in the two bypass-systems at the river Schussen (downstream the WWTP Langwiese) and, as a reference, at the river Argen. Aquaria in the laboratory serve as negative controls. Shortly after fertilization, trout eggs get exposed to the three systems for continuous exposure. At least every second day eggs (or rather the developing embryos inside the chorion) are examined and coagulation/mortality, heart rate, hatching, swim up, and malformations are recorded. Similar endpoints of toxicity are investigated in the laboratory tests with the zebrafish according to [28]. In order to show possible impact on the development of sediment-dwelling invertebrates, the reproduction test with the blackworm *Lumbriculus variegatus* has been implemented into the effect-based test battery. This test is conducted at the **University of Frankfurt/Main** according to OECD [29].

Community integrity

By the **Water Ecology Laboratory Starzach** the integrity of the macrozoobenthos communities of Schussen and Argen are monitored and assessed with the multi-habitat sampling method according to the EU Water Framework Directive [30]. Particular attention is paid to species residing in the sediment (e.g. oligochaetes, midge larvae) and toxicant-sensitive species, as e.g. gammarids.

Endocrine potentials and effects

RECETOX Brno determines estrogenic potentials with the human breast carcinoma cell line MVLN [31] and the cell line HeLa9903, stably transfected with a luciferase reporter gene under the control of the estrogen receptor. Androgenic and anti-androgenic potentials are investigated using reporter gene assays with the breast carcinoma cell line MDAkB [32]. At the **University of Frankfurt/Main** potentials for estrogenicity, anti-estrogenicity, androgenicity, and anti-androgenicity are detected with yeast-based bioassays [20].

At the **University of Stuttgart**, estrogenic potentials are determined by the E-screen assay, which is based on the proliferation of human breast carcinoma cells (MCF-7) in the presence of estrogen active substances in the samples. The estrogenic activity determined by the E-Screen reflects a sum

parameter over all hormonal active substances present in the samples that is expressed in concentration units of the reference substance 17 β -estradiol (17 β -estradiol equivalent concentration, EEQ). The determination limit of the test for surface waters ranges in the order of < 0.1 ng/L EEQ. The applied E-screen assay was developed by Soto and colleagues [33], optimized by Körner and co-workers [34], and modified by Schultis [35]. To determine the estrogenic activity in stream water, acidulated water samples are solid phase extracted prior to the test for their endocrine potentials *in vitro*.

As an *in vivo* laboratory test for the detection of endocrine potentials, the reproduction test with the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* is carried out at the **University of Frankfurt/Main** according to OECD [36]. In these parthenogenetically reproducing snails, offspring numbers (prior and after development of a visible shell) as well as mortality are determined after exposure to samples from the five test systems and to surface water and sediment samples of the five field sites.

To detect endocrine effects in feral fish, at the **University of Tuebingen** the egg yolk precursor protein vitellogenin is analyzed in bypass-exposed trout. Furthermore, gonads of feral fish are examined in respect to impairment of tissue integrity, presence of hermaphroditic ovaries or testes, the gonadosomatic index (GSI), and maturity. Since vitellogenin typically is produced by breeding females only, the detection of this protein in male or juvenile fish indicates the presence of estrogenically active chemicals in the environment [37, 38]. After exposure in the bypass-systems for about 140 days, blood samples of male fish or whole body homogenates of juveniles get analyzed with a vitellogenin ELISA test kit (Biosense; product number: V01004402-096). As a positive control, fish are exposed to 20 ng/L 17 α -ethinylestradiol (EE2); as a negative control they are kept in conditioned tap water. The gonad integrity as well as the maturity stages of ovaries and testes are diagnosed microscopically, and the gonadosomatic index (GSI) in trout and chub is determined according to [39].

In order to address possible endocrine effects also in invertebrates, gammarid populations from the four field sites are under investigation with respect to sex ratio, maturity, fecundity, and gonad integrity at the **University of Tuebingen**. In gammarids, these endpoints have been proven sensitive endocrine–modulated reactions [40]. To determine the fecundity, breeding females are caught from the streams, eggs and juveniles in the marsupium are counted, and the fecundity index is calculated. In addition, ovaries are fixed for histology and sections are examined microscopically to determine the maturity status of the gametes.

WP 5: Data analysis

In addition to methods of conventional correlation analysis (linear/non-linear regression, ANOVA, tests of significance), an information theory approach introduced to the biological discipline by Burnham &

Anderson [41, 42] is used by the **University of Tuebingen** to identify the relative importance of exposure data on recorded effects in biota. Its goal is to select the best explanatory variable from a large set of potential factors. In this approach, variable selection takes into account multiple competing hypotheses and allows inferences through the whole set of potential models, thus takes into account the fact that no single model (i. e., variable composition) can perfectly reflect nature. The model selection approach is based on Akaike's Information Criterion (AIC). In general, this criterion is based on the estimation of information loss when a model is used to approximate the truth [43]. Using this approach, it is possible to estimate the relative precision of several models created from the same data set. Therefore, models can be ranked according to their data fit and all single factors and interactions can be estimated and predicted by model averaging.

Calculations concerning the extrapolation of data on micropollutant and pathogen reduction to the entire catchment area will be conducted by **Jedele & Partner GmbH, Stuttgart** and **University of Tuebingen**.

WP 6: Coordination and communication

The entire project is coordinated by the **University of Tuebingen** supported by the **Regional Commission Tuebingen**. In cooperation with the University of Tuebingen **Ökonsult Stuttgart** is responsible for the identification of target groups and communication channels suitable for the publication of the project, connections to local press and information media and the organization of information events for stakeholders and the public. Major aims of the communication are (1) raising the awareness in the public for water protection and problems related to micropollutants and pathogen release into surface waters, (2) investigation of the readiness of the public to accept additional dues for this purpose, and (3) dissemination of the project's aims and results to the scientific community, stakeholders and the public.

Together with the **University of Tuebingen** and **Hydra Konstanz, Ökonsult Stuttgart** has already realized the homepage of the project (www.schussenaktivplus.de) and an information flyer which can be downloaded from the project homepage. In close cooperation with the **Steinbeis Transfer Center East-West Cooperation** a connection of SchussenAktivplus to the Danube strategy will be realized.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Rita Triebkorn who is responsible for the general design of the project wrote the introductory parts of the manuscript. The other authors contributed with specific information concerning their respective methods. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The project SchussenAktivplus is funded by the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and cofounded by the Ministry of Environment Baden-Württemberg. In addition, Jedele & Partner GmbH, Ökonsult GbR, the city of Ravensburg, the AZV Mariatal and the AV Unteres Schussental financially contribute to the project. SchussenAktivplus is connected to the BMBF action plan "Sustainable water management (NaWaM)" and is integrated in the BMBF frame programme "Research for sustainable development FONA". It is part of the the funding measure "Risk Management of Emerging Compounds and Pathogens in the Water Cycle (RiSKWa)" introduced to the public by Huckele & Track [44]. Contract period: 1/ 2012 to 12/2014, Funding number: 02WRS1281A-L.

References

1. Ternes T: Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse (POSEIDON); 2004. Final report EU 2004, [http:// poseidon.bafg.de/servlet/is/2888/](http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2888/).
2. Abegglen C, Escher B, Hollender J, Koepke S, Ort C, Peter A, Siegrist H, von Gunten U, Zimmermann S, Koch M, Niederhauser P, Schärer M, Braun C, Gälli R, Junghans M, Brocker S, Moser R, Rensch D: Ozonung von gereinigtem Abwasser. Schlussbericht Pilotversuch Regensdor: EAWAG; 2009:80.
3. Beier S, Pinnekamp J, Schröder HF, Cramer C, Mauer C, Selke D: Vergleichende Bewertung von oxidativen und adsorptiven Verfahren zur Elimination von Arzneimitteln – Praxisrelevanz und Anwendungsgrenzen. Gewässerschutz: Wasser – Abwasser, Aachen; 2009. 23/1-23/13.
4. Stalter D, Magdeburg A, Oehlmann J: Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an *in vivo* test battery. *Wat Res* 2010, 44(8):2610–2620.
5. Schrank SG, Bieling U, José HJ, Moreira RFP, Schröder HF: Generation of endocrine disruptor compounds during ozone treatment of tannery wastewater confirmed by biological effect analysis and substance specific analysis. *Wat Sci Technol* 2009, 59(1):31–38.
6. Margot J, Magnet A, Thonney D, Chevre N, De Alencastro F, Rossi L: Traitement de micropollutants dans les eaux usées. Rapport final sur les essais pilotes a la step de vidy à Lausanne. EAWAG 2011: 118. EPFL-report-163236. [http://infoscience.epfl.ch/record/163236/files/ Rapport_final_STEP_Vidy.pdf](http://infoscience.epfl.ch/record/163236/files/Rapport_final_STEP_Vidy.pdf).
7. Steinmetz H, Dittmer U: Regenwasserbehandlung gestern, heute - und morgen? Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft 2010, 204:7–14.
8. Brunner PG: Bodenfilter zur Regenwasserbehandlung im Misch- und Trennsystem. Report LFU Karlsruhe; 2002. <http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/6638/>.
9. Waldhoff A: Hygienisierung von Mischwasser in Retentionsbodenfiltern (RBF). Schriftenreihe des Fachgebietes Siedlungswasserwirtschaft. University of Kassel 2008:306.

10. Triebskorn R, Adam S, Behrens A, Beier S, Böhmer J, Braunbeck T, Casper H, Dietze U, Gernhöfer M, Honnen W, Köhler HR, Körner W, Konradt J, Lehmann R, Luckenbach T, Oberemm A, Schwaiger J, Segner H, Strmac M, Schüürmann G, Siligato S, Traunspurger W: Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The VALIMAR project. *Hum Ecol Risk Ass* 2003, 9(1):171–194.
11. Triebskorn R, Hetzenauer H: Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. (Mikroverunreinigungen in den drei Bodenseezuflüssen Argen, Schussen und Seefelder Aach - eine Literaturstudie). *Environ Sci Eur* 2011, 24:8. <http://www.enveurope.com/content/pdf/2190-4715-24-8.pdf>.
12. DIN EN ISO 9308: Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser - Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren). Berlin: Deutsches Institut für Normung e.V; 1999.
13. Bai S, Lung WS: Modeling sediment impact on the transport of fecal bacteria. *Wat Res* 2005, 39(20):5232–5240.
14. DIN 58940: Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Berlin: Deutsches Institut für Normung e.V; 2011.
15. ISO: Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *umu*-tests. ISO Test Guideline 1999, ISO/FDIS 13829.
16. ISO: Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation tests (Ames fluctuation test). ISO Test Guideline 2009, ISO/CD 11350.
17. Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V: The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett* 2003, 6:1025–1037.
18. Köhler HR, Bartussek C, Eckwert H, Farian K, Gränzer S, Knigge T, Kunz N: The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J Aquat Ecosys Stress Recov* 2001, 8:261–279.
19. Kaisarevic S, Hilscherová K, Weber R, Sundqvist KL, Tysklind M, Voncina E, Bobic S, Andric N, Pogrmic-Majkic K, Vojinovic-Miloradov M, Giesy JP, Kovacevic R: Characterization of dioxin-like contamination in soil and sediments from the “hot spot” area of petrochemical plant in Pancevo (Serbia). *Env Sci Poll Res* 2011, 18(4):677–686.
20. Wagner M, Oehlmann J: Endocrine disruptors in bottled mineral water: Total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut Res* 2009, 16:278–286.
21. Burke DM, Mayer RT: Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 1974, 2(6):583–588.
22. OECD: *Lemna* sp. growth inhibition test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 2006, 221.
23. Durieux EDH, Farver TB, Fitzgerald PS, Eder KJ, Ostrach DJ: Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiol Biochem* 2011, 37:21–29.
24. Rault M, Collange B, Mazzia C, Capowiez Y: Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biol Biochem* 2008, 40:3086–3091.
25. Triebskorn R, Telcean I, Casper H, Farkas A, Sandu C, Stan G, Colarescu G, Dori T, Köhler HR: Monitoring Pollution in River Mures, Romania, Part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Env Monitor Ass* 2008, 141(1–3):177–188.

26. Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski KU, Nagel R, Köhler HR, Triebkorn R: Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 2006, 15(2):143–156.
27. Luckenbach T, Kilian M, Triebkorn R, Oberemm A: Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *J. Aquat. Ecosys Stress Recov* 2001, 8:355–370.
28. Nagel R, Dar T: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) - a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 2002, 19:38–48.
29. OECD: Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. OECD Guideline for the Testing of Chemicals 2007, 225.
30. Meier C, Haase P, Rolauffs P, Schindehütte K, Schöll F, Sundermann A, Hering D: Methodisches Handbuch Fließgewässerbewertung zur Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern auf der Basis des Makrozoobenthos vor dem Hintergrund der EG Wasserrahmenrichtlinie; 2006. <http://www.fliessgewaesserbewertung.de>.
31. Jarosova B, Blaha L, Vrana B, Randak T, Grabic R, Giesy JP, Hilscherová K: Changes in concentrations of hydrophilic organic contaminants and of endocrine-disrupting potential downstream of small communities located adjacent to headwaters. *Env Int* 2012, 45:22–31.
32. Pavlíková N, Bláhová L, Klán P, Bathulac SR, Sklenář V, Giesy JP, Bláha L: Enantioselective effects of alpha-hexachlorocyclohexane (HCH) isomers on androgen receptor activity *in vitro*. *Chemosphere* 2012, 86(1):65–69.
33. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO: The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, 103:113–122.
34. Körner W, Hanf V, Schuller W, Kempter C, Metzger J, Hagenmaier H: Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci Total Environ* 1999, 225:33–48.
35. Schultis T: Detection of estrogenic activity of environmental samples and pure compounds using biological test systems - development and comparison of *in vitro* assays. Dissertation: University of Stuttgart; 2005.
36. OECD: Detailed review paper (DRP) on molluscs life-cycle toxicity testing. OECD Series on Testing and Assessment 2010, 121.
37. Burki R, Vermeirssen E, Körner O, Joris C, Burkhardt-Holm P, Segner H: Assessment of estrogenic exposure in brown trout (*Salmo trutta*) in a Swiss midland river: integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish, and vitellogenin mRNA and protein. *Environ Toxicol Chem* 2006, 25:2077–2086.
38. Stalter D, Magdeburg A, Weil M, Knacker T, Oehlmann J: Toxication or detoxication? *In vivo* toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Wat Res* 2010, 44:439–448.
39. Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Shimasaki Y, Honjo T: The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 2008, 87:37–46.
40. Watts MM, Pascoe D, Carroll K: Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Env Toxicol Chem* 2002, 21(2):445–450.
41. Burnham KP, Anderson DR: Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretical approach. New York: Springer; 2002.
42. Burnham KP, Anderson DR: Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods in Res* 2004, 33:261–304

43. Anderson DR, Burnham KP, Thompson WL: Null hypothesis testing: Problems, prevalence, and an alternative. *J Wildl Management* 2000, 64:912–923.
44. Huckele S, Track T: Risk Management of Emerging Compounds and Pathogens in the Water Cycle (RiSKWa). *Env Sci Eur* 2012, MS ID: 6814121638173597.

Kapitel 2: SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg

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

Korrespondenz Wasserwirtschaft Nr. 8: 427-436. DOI: 10.3243/kwe2013.08.001

Zusammenfassung

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

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

1 Einleitung

Der Eintrag von Spurenstoffen in Oberflächengewässer ist in den letzten Jahren verstärkt ins Zentrum des Interesses von Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit gerückt [1]. Die Erweiterung der Liste prioritärer Substanzen gemäß Wasserrahmenrichtlinie hat dieses Interesse in jüngster Zeit deutlich verstärkt. Einhergehend mit dem steigenden öffentlichen Interesse und dem Wissenszuwachs zur Thematik „Spurenstoffe“ hat das Land Baden-Württemberg im Jahre 2009 im Rahmen seines Konjunkturprogramms beschlossen, die Nachrüstung einiger Kläranlagen im Einzugsgebiet des Bodensees mit Aktivkohlefiltern zu fördern, um den Eintrag von Spurenstoffen in die Gewässer zu mindern. Im Vordergrund stand hierbei am Bodensee aus Vorsorgegründen das Schutzgut Trinkwasser. Mit Aktivkohlefiltern ausgestattet werden bzw. wurden innerhalb dieses Programms im Bodensee-Einzugsgebiet die Anlagen Esparsingen (Zweckverband Stockacher Aach), Emmingen-Liptingen, Kressbronn-Langenargen sowie Langwiese (Abwasserzweckverband Mariatal, Ravensburg).

Im Fokus des Projektes SchussenAktiv, das den Erfolg der weiteren Abwasserbehandlung mit Aktivkohle auf Expositions- und Wirkebene überprüfen soll, stand die Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. Diese ist das größte Klärwerk im nördlichen Bodensee-Einzugsgebiet. Es ist schon heute mit einer Sandfiltration ausgestattet und reinigt eine Abwasserfracht von 170.000 Einwohner-Werten (ca. 80.000 Einwohner). Das gereinigte Abwasser wird in die Schussen abgeschlagen, in die neben der Kläranlage Langwiese noch 17 weitere mittlere und kleine Anlagen sowie zahlreiche Regenüberlaufbecken einleiten. In der Schussen wird eine relativ große Anzahl an Spurenstoffen in zum Teil recht hohen Konzentrationen nachgewiesen [2]. Dies liegt einerseits an der dichten Besiedelung des 815 km² großen Schussen-Einzugsgebiets und den daraus resultierenden hohen Eintragsmengen, andererseits aber auch an einer vergleichsweise geringen Verdünnung des eingeleiteten Abwassers aufgrund relativ niedriger Abflüsse (MQ neun bis 13 m³/s), die mit den relativ geringen Niederschlagsmengen im nordwestlichen Bodenseegebiet zusammenhängen. Die Argen, die im Projekt als weniger belastetes Vergleichsgewässer herangezogen wird, weist beispielsweise einen mittleren Abfluss von 22-23 m³/s bei einem Einzugsgebiet von 652 km² auf.

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

Abwassertechniken zur Eliminierung von Spurenstoffen zusätzlich an zwei zusätzlichen Kläranlagen sowie an zwei Regenwasserbehandlungssystemen untersucht.

Innovativ am Forschungsansatz von SchussenAktiv ist die kombinierte Betrachtung

- (1) der Exposition mittels chemischer Analytik durch den Nachweis von Spurenstoffen im Kläranlagenablauf und im Oberflächenwasser sowie im Sediment und in Biota,
- (2) der Überprüfung von in Umweltmatrices (Kläranlagenabläufe, Oberflächenwasser oder Sediment) vorhandenen toxischen und endokrinen Wirkpotenzialen in Labortests und
- (3) der tatsächlichen Effekte in Biota aus dem Freiland bzw. solchen Organismen, die aktiv im Freiland in Bypass-Systemen exponiert wurden.

Tabelle 1: Durchgeführte Untersuchungen im Rahmen von SchussenAktiv

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

Diese Kombination erlaubt eine komplementäre und umfassende Bewertung der Belastungssituation. Während die chemische Analytik stoffspezifische Fragestellungen nach Präsenz oder Verbleib von Chemikalien in Umweltmatrices beantworteten kann, stößt sie an Grenzen, sobald das gesamte Spektrum an vorhandenen chemischen Belastungsfaktoren erfasst werden soll. Grund hierfür ist, dass die Auswahl der zu analysierenden Stoffe a priori die Anzahl potenziell im Gewässer nachweisbarer

Chemikalien bestimmt bzw. einschränkt. Zudem ist der chemische Charakter vor allem von Metaboliten und Transformationsprodukten anthropogen eingetragener Substanzen, wie sie beispielsweise bei der Ozonierung von Abwasser entstehen können, derzeit vielfach noch unbekannt, so dass diese Stoffe analytisch (noch) nicht greifbar sind. Problematisch kann auch sein, dass Stoffe in so niedrigen Konzentrationen vorliegen, dass die Nachweisgrenzen unterschritten werden. Dies ist vor allem in komplizierteren Matrices, wie Sedimenten oder Biota, der Fall. Wirkpotenzial- und Effektanalysen haben den Vorteil, dass sie über ein je nach Testsystem mehr oder weniger großes und spezifisches Spektrum an Belastungsfaktoren integrieren. Die Potenzialanalytik vermittelt hierbei ein Bild vom Belastungszustand der Umweltprobe zum Zeitpunkt der Probenahme im Sinne einer Momentaufnahme. Wirkungen bei Freilandorganismen oder bei Organismen, die aktiv im Freiland exponiert werden, übermitteln komplementär hierzu Informationen zum Belastungszustand der jeweiligen Probestelle bis zum Zeitpunkt der Beprobung im Sinne einer Langzeitaufnahme. Da alle Methoden auf zeitgleich entnommene Umweltproben angewendet wurden, können im Rahmen von SchussenAktiv Querverbindungen zwischen den Ergebnissen geknüpft und Plausibilitätsketten erstellt werden.

2 Methodik

Von 2009 bis 2011 wurden zu neun Zeitpunkten von der KA Langwiese 24h-Mischproben vom KA-Ablauf sowie zeitgleich Wasserproben, Sedimente, Fische und Flohkrebse an mehreren Probestellen an der Schussen und an der Argen (als Referenzgewässer) entnommen. Die Proben wurden für chemische Analysen von Spurenstoffen, Wirkpotenzialanalysen und Wirkuntersuchungen genutzt. Zeitgleich wurden alle Probestellen limnochemisch charakterisiert. Die Spurenstoffanalytik fand am DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe statt, limnochemische Untersuchungen wurden von der Universität Tübingen durchgeführt. Döbel (*Leuciscus cephalus*) und Schneider (*Alburnoides bipunctatus*) wurden vom Seenforschungsinstitut Langenargen durch Elektrofischung aus den Gewässern entnommen. In vom Bachwasser durchflossenen Aquarien (Bypass-Systeme) an der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese sowie an der Argen in der Umgebung von Wangen (als Referenzgewässer) wurden Bach- und Regenbogenforellen sowie Flohkrebse aktiv exponiert und Embryotests mit Regen- und Bachforelleneiern durchgeführt. Die vorliegende Publikation enthält Daten zu den Kläranlagenabläufen sowie zu den Proben, die unterhalb der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg und an der Argen gewonnen wurden. Die für Wirkpotenzial- und Wirkanalytik eingesetzten Methoden sowie die bearbeitenden Institutionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Weiterführende Informationen zur Methodik und zum Aufbau der Bypass-Systeme sind [3] zu entnehmen. Die Lage der Probestellen sowie der Bypass-Systeme sind in Abbildung 1 dargestellt.

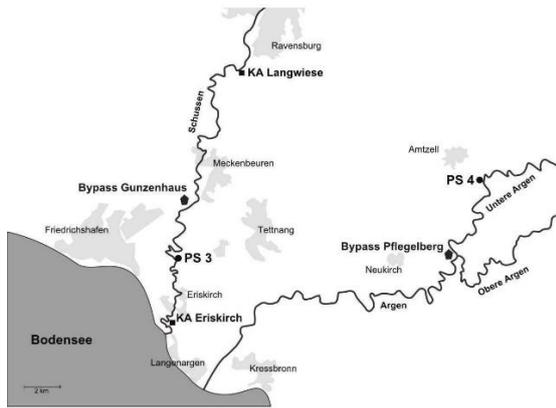


Abb. 1: Lage der Probestellen, für die Ergebnisse beschrieben werden, und der Bypass-Systeme an Schussen und Argen.

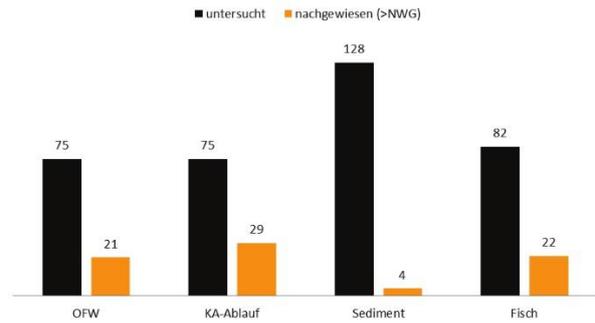


Abb. 2: Anzahl untersuchter und maximal nachgewiesener Substanzen im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser (OFW) und Sediment unterhalb der KA Langwiese sowie in unterhalb der KA Langwiese gefangenen Fischen (Döbel und Schneider).

3 Zusammenfassung und Diskussion der Resultate

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

3.1 Chemische Analysen

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

Für mehrere Stoffe (z. B. Carbamazepin, N,N-Dimethylsulfamid, Sucralose, Benzotriazol) konnte der Eintrag über die KA Langwiese als bestimmend für die Konzentration im Vorfluter festgemacht werden.

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

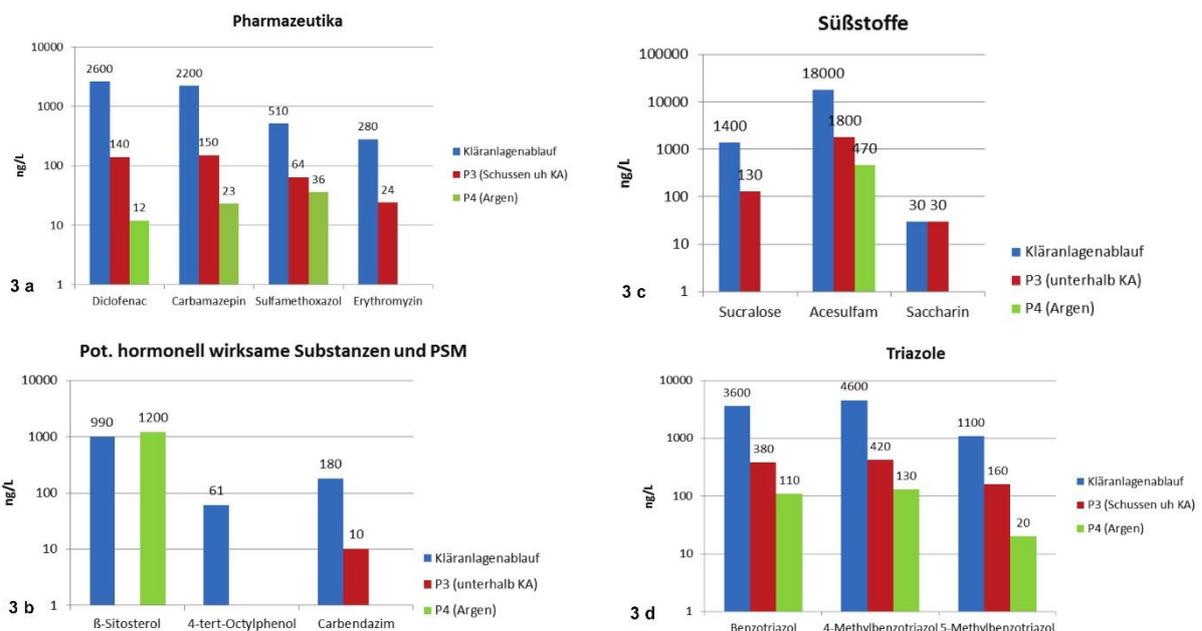


Abb. 3 a-d: Konzentrationen ausgewählter Substanzen (Maximalwerte) im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser der Schussen unterhalb der KA (P3) und in der Argen (P4).

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

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

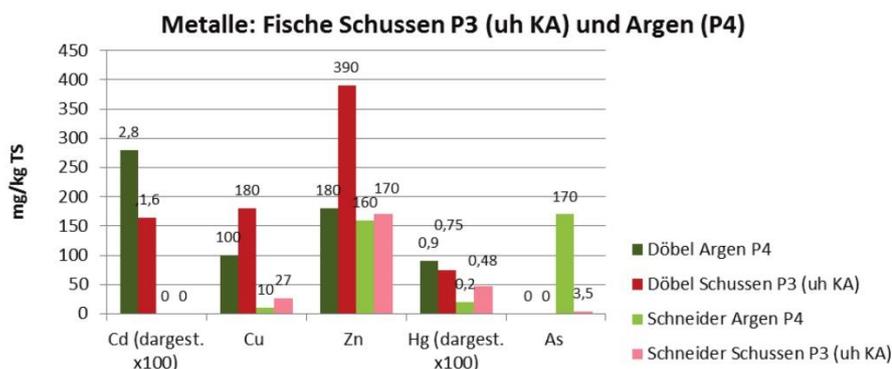


Abb. 4: Metallgehalte (Maximalwerte) in Fischen aus der Schussen unterhalb KA Langwiese (P3) und Argen (P4).

Die maximalen Konzentrationen ausgewählter persistenter Stoffe in Fischproben sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Der PCB-Gehalt (Summe 6 Indikator-PCB) im Filet der untersuchten Döbelproben liegt im Bereich der Werte, die für Döbel aus verschiedenen tschechischen Gewässern bestimmt wurden [6]. Geht man davon aus, dass die Werte bezogen auf das Frischgewicht ungefähr um den Faktor drei bis vier niedriger liegen als diejenigen bezogen auf das Trockengewicht, liegen die Werte für Döbel und Barbe aus der Schussen zwar noch unterhalb, allerdings auch für das Filet bereits im Bereich des von der EU formulierten Höchstwerts von 125 ng/g FG [7]. Werte für Fische aus relativ unbelasteten Gewässern bewegen sich laut Kuch (pers. Mitt.) im Bereich von fünf bis zehn µg/kg FG. Die Messwerte für alle im Projekt untersuchten Fischarten liegen hier deutlich höher, wobei das Filet einer zusätzlich untersuchten Barbe (*Barbus barbus*) mit einer Konzentration von ca. 100 µg/kg FG am stärksten belastet ist.

Durchschnittswerte für eine Belastung von Fischen mit DDX liegen laut Kuch (pers. Mitt.) in der Größenordnung von ca. fünf bis zehn ng/g FG. Die Konzentrationen in Schneidern und Döbeln aus der Schussen sind demnach als moderat, diejenigen in der Barbe als eher hoch zu bewerten. Allerdings liegen alle Konzentrationen für Fische aus der Schussen weit unterhalb der Höchstwerte, die in Döbeln aus tschechischen Gewässern gemessen wurden [6].

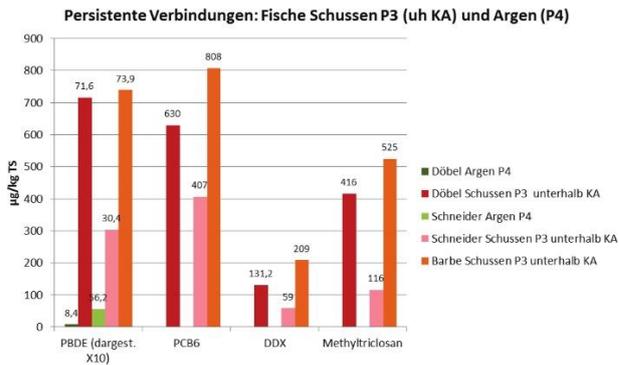


Abb. 5: Konzentrationen von persistenten Verbindungen in Fischen (Maximalwerte) aus der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese (P3) und der Argen (P4).

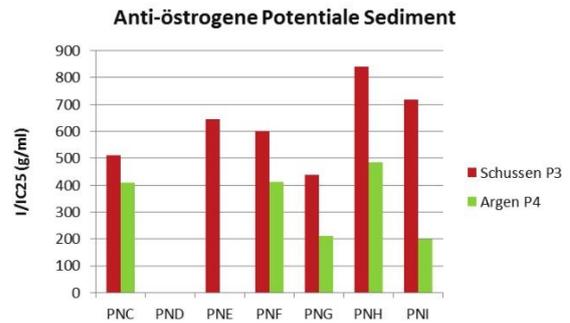


Abb. 6: Anti-östrogene Potentiale im Sediment der Schussen (unterhalb Kläranlage Langwiese) und der Argen zu 7 Probenahmezeitpunkten (PNC – PNI).

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

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

Die meisten der untersuchten endokrin wirksamen Verbindungen konnten nicht in den Geweben der untersuchten Fische nachgewiesen werden. In hohen Konzentrationen trat allerdings das Phytoöstrogen β -Sitosterol, in sehr geringen Konzentrationen 4-tert-Octylphenol in Fischen aus

Schussen und Argen auf. Die hohen Messwerte für β -Sitosterol in Fischen aus der Argen lassen sich in Zusammenhang mit den im Oberflächenwasser nachgewiesenen hohen Konzentrationen dieser Verbindung bringen (s.o.). Da das östrogene Potenzial dieses Phytoöstrogens allerdings im Vergleich zu synthetischen oder natürlichen Hormonen um den Faktor 10^4 geringer ist [14], sind von dieser Substanz ausgehende hormonelle Potenziale in Schussen und Argen als eher gering einzuschätzen.

3.2 Hormonelle und toxische Wirkpotenziale und reale Wirkungen

Ein Ziel des Projektes war es, die Relevanz der Ergebnisse aus Wirkpotenzialtests im Labor für tatsächliche Wirkungen in Organismen aus dem Freiland (oder solchen, die dort aktiv exponiert wurden) zu überprüfen. Auf Plausibilität beruhende Zusammenhänge mit möglicherweise für die Effekte verantwortlichen, im Rahmen des Projektes in den untersuchten Umweltmatrices nachgewiesenen Chemikalien wurden hergestellt.

Hormonelle Potenziale, für welche Chemikalienkonzentrationen sogar unterhalb der chemisch-analytischen Nachweisgrenzen sowie Summeneffekte verantwortlich sein können, wurden im Rahmen von SchussenAktiv mit *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen untersucht. Mit dem E-Screen-Test, der auf der durch endokrin wirksame Chemikalien induzierten vermehrten Teilung menschlicher Brustkrebszellen (MCF-7) basiert, wurde so z. B. eine östrogene Gesamtaktivität von max. 4,6 ng/L Östrogenäquivalente (EEQ) im KA-Ablauf bzw. max. 1,7 ng/L (EEQ) im Oberflächenwasser der Schussen ermittelt. Im Sediment der Schussen wurden mit Reporterassays, welche die transformierte Mammakarzinomzelllinie (MVLN) und die Zelllinie HeLa-9903 nutzen, geringe östrogene und antiöstrogene Potenziale ermittelt (Abbildung 6). Vor dem Hintergrund, dass hormonelle Effekte durch Chemikalienkonzentrationen im unteren Nanogramm-Bereich ausgelöst werden können, trägt die biologische Wirkpotenzialanalytik, wie sie beispielsweise vom E-Screen-Test oder den im Projekt eingesetzten Reporterassays geleistet wird, dazu bei, in einem Konzentrationsbereich Vorsorge treffen zu können, der mit instrumenteller Analytik (noch) nicht erfasst werden kann.

Durch die *in vivo* durchgeführten Reproduktionstests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* wurden nicht nur, wie mit den Reporterassays, in Sedimenten aus der Schussen, sondern auch in solchen aus der Argen sehr starke östrogenähnliche Potenziale nachgewiesen. Dieser Unterschied ist möglicherweise durch eine sehr viel höhere Sensitivität der im *in vivo*-Tests eingesetzten Testorganismen im Vergleich zu den im *in vitro*-Test verwendeten Zell-Linien zu erklären.

Um die Indizienkette von der Präsenz potenziell hormonell wirksamer Substanzen über endokrine Potenziale bis hin zu tatsächlichen Wirkungen bei Freilandorganismen verlängern zu können, wurden Wirkuntersuchungen an Fischen (Döbel, Schneider und Forellen) und Flohkrebse durchgeführt, die

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

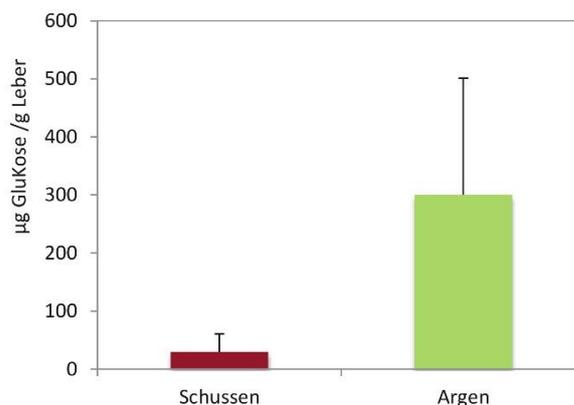


Abb. 7: Glykogengehalt in der Leber von Döbeln aus der Schussen (P3, unterhalb der Kläranlage Langwiese) und an der Argen (P4).

Bekannt ist allerdings auch, dass tolerante Individuen aus Populationen, die dauerhaft und über viele Generationen hinweg unter Schadstoffeinfluss leben, bei geringerer Körpergröße und in geringerem Alter als üblich bereits reproduzieren können, was als mikroevolutive Anpassung gedeutet wird [15]. Aus der Gruppe der von [10] und [16] als potenziell endokrin wirksam eingestuft Chemikalien wurden im Rahmen des Projektes 4-tert-Octylphenol, Bisphenol A, polybromierte Diphenylether, β -Sitosterol, Methyltriclosan, PCB, Quecksilber, Cadmium und DDX-Verbindungen in mindestens einem der untersuchten Umweltkompartimente nachgewiesen. Im Rahmen des Nachfolgeprojektes wurden zudem das Hormon Estron über der Nachweisgrenze im KA-Ablauf und im Oberflächenwasser

der Schussen unterhalb der KA sowie deutliche PFT-Konzentrationen in Fischen aus der Schussen nachgewiesen. Die Konzentrationen der sehr stark wirksamen östrogenen Verbindungen β -Estradiol bzw. 17 α -Ethinylestradiol (EE2) lagen sowohl in den Oberflächenwasserproben als auch in den Ablaufproben der KA unterhalb der Nachweisgrenze.

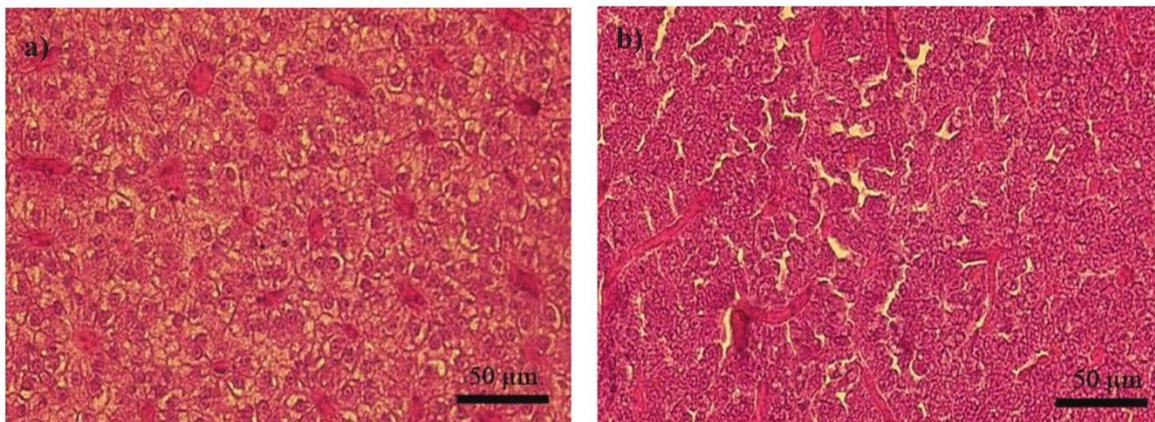


Abb. 8: Leber eines Döbels (a) aus der Argen mit Glykogenspeicher (helle Areale) und (b) aus der Schussen mit stark reduzierterm Glykogen und deutlich erweiterten Interzellularräumen.

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

Inwiefern sich auf Individualebene festgestellte Reaktionen bzw. Schädigungen bei Freilandfischen auf der Ebene der Fischpopulationen widerspiegeln, wurde im Rahmen von SchussenAktiv nicht untersucht. Allerdings liegen von anderer Seite für den Wasserkörper zwischen Mariatal (oberhalb KA Langwiese) und Mariabrunn Daten zur Bewertung des ökologischen Zustands des Gewässers auf der Basis des fischbasierten Bewertungssystems für Fließgewässer (FIBS) vor. Die Stelle „Brugg“ oberhalb von Meckenbeuren repräsentiert in diesem Wasserkörper eine Probestelle unterhalb der KA Langwiese. Der Gütezustand dieser Probestelle wurde nach FIBS als „mäßig“ eingestuft, wobei einer

der Gründe hierfür die starke Dominanz des Schneiders in diesem Teilabschnitt des Wasserkörpers (50-75 Prozent aller Fische) war (Dussling, pers. Mitteilung 23. Juli 2012). Ob dieser Befund aus einer eventuellen vergleichsweise hohen Toleranz des Schneiders gegenüber chemischen Belastungen unterhalb der KA Langwiese resultiert, wäre weitergehend zu untersuchen. Bei den histologischen Untersuchungen und Stressproteinanalysen im Rahmen von SchussenAktiv erwies sich der Schneider insgesamt als weniger empfindlich als der Döbel, die Bachforelle oder die Regenbogenforelle.

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

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

Tabelle 1: Zusammenfassende Bewertung der Relevanz der nachgewiesenen Stoffgruppen im Ablauf der KA Langwiese, im Oberflächenwasser und in Biota aus Schussen und Argen.

Stoffgruppe	KA-Ablauf	P 3 Schussen (uh KA)	Fische Schussen	Gammariden Schussen	P 4 (Argen)	Fische Argen	Relevante Stoffe
Arzneimittel							Diclofenac, Carbamazepin, Sulfamethoxazol
Phytohormone							ß-Sitosterol
PSM							Wasser: Carbendazim, DMS, Mecoprop; Biota: DDX
Süßstoffe							Acesulfam, Sucralose
Metalle							Zn, Ni, Cu, Cd
Biozide							Methytridolan
Alkylphenole							Oktylphenol
Komplexbildner							EDTA, DPTA
Flammenschutzmittel							Wasser: Tris(2-chlorpropyl)phosphat; Biota: PBDE
PCB							PCB ₁₈

Bewertung:

	in hohen Konzentrationen nachgewiesen
	regelmäßig in mittleren Konzentrationen nachgewiesen
	in geringen Konzentrationen nachgewiesen
	nicht nachgewiesen

4 Fazit und Ausblick

Als Ergebnis des Projektes SchussenAktiv lässt sich festhalten, dass es durch den kombinierten Einsatz verschiedener Methoden, die sowohl die Expositions- als auch die Effektseite abdecken, möglich war, zwar nicht im Sinne von Kausalität, wohl aber auf der Basis einer Evidenzkette die auf Plausibilitätskriterien beruht [26], Zusammenhänge zwischen (1) der Präsenz von Spurenstoffen in Umweltkompartimenten, (2) toxischen und hormonellen Potenzialen, (3) toxischen und endokrinen Effekten bei exponierten Organismen sowie (4) dem Zustand der Lebensgemeinschaft in der Schussen herzustellen. So konnte z. B. die Präsenz potenziell genotoxischer Chemikalien in den untersuchten

Umweltmatrices mit dem positiven Nachweis gentoxischer Potenziale sowie dem Auftreten gentoxischer Effekte in Blutzellen der untersuchten Fische in Verbindung gebracht werden. Die starke Variation im Nachweis östrogenartig wirkender Chemikalien spiegelte sich auch in der Variabilität der nachgewiesenen östrogenen Wirkpotenziale und Wirkungen bei Fischen und Fischnährtieren in der Schussen wieder. Die reduzierte Anzahl sensitiver Taxa unterhalb der untersuchten Kläranlage an der Schussen spricht dafür, dass sich negative Effekte bereits auf biozönotischer Ebene manifestiert haben. Ein Zusammenspiel toxischer und hormoneller Einflüsse auf die Organismen in der Schussen ist hierbei aufgrund der erzielten Resultate wahrscheinlich. Für die als Referenzgewässer ausgewählte Argen konnte gezeigt werden, dass die untersuchte Probenahmestelle zwar insgesamt als deutlich weniger belastet gelten kann als die Probenahmestellen an der Schussen, dass aber auch hier Bedarf besteht, bestimmte Expositionen (z. B. β -Sitosterol, Cadmium, Arsen, Quecksilber, Zink) und Effekte (z. B. Acetylcholinesterasehemmung bei Fischen, fehlende Abundanz von Gammariden) genauer zu betrachten um gegebenenfalls ihre Ursachen zu eruieren.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Resultate der durchgeführten Tests bzw. Untersuchungen vor dem Hintergrund, welche Endpunkte adressiert wurden (toxische/endokrine Potenziale/Wirkungen) und wie stark die Effekte ausfielen.

ANALYSEMETHODE	Ablauf KA Langwiese				P 3 (Schussen) / Bypass Gunzenhaus				P 4 (Argen) / Bypass Pflegeberg			
	toxische		endokrine		toxische		endokrine		toxische		endokrine	
	Potentiale	Wirkungen	Potentiale	Wirkungen	Potentiale	Wirkungen	Potentiale	Wirkungen	Potentiale	Wirkungen	Potentiale	Wirkungen
E-Screen	3		3				2				1	
Reporterassays Östrogenität			2				1				0/1	
Reporterassays Anti-Östrogenität			1				1				0/1	
Reporterassays Anti-Androgenität			0				1				0/1	
Reproduktionstests mit Schnecken	3		2				3				3	
Vitellogenin							2					0
Reifzustand, Geschlechterverhältnis, GSI Fische							3					0
Fertilität, Geschlechterverhältnis Gammarus							2					
Reporterassays dioxinähnl. Potentiale	1				2				1			
Reporterassays gentoxische Potentiale	1				2				0			
Mikrokerntests Fische						3				1		
Acetylcholinesterase						1				2		
Stressproteinanalysen						2				1		
Histopathologie Fische						3				2		
Embryotest Zebrafisch Labor	1				1				1			
Embryotest Forellen Bypass						2				2		
Parasitierung, Stressproteine Gammariden						1				0		
Makrozoobenthos						3						

Bewertung:

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

Für die Fortführung des Projektes über weitere drei Jahre hinweg konnten Fördermittel vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) eingeworben werden. Die Fragestellung von SchussenAktiv ist hierbei in ein erweitertes Forschungsfeld integriert und wird unter dem Namen „SchussenAktivplus“ bis Ende 2014 fortgeführt. Inhalte und Ziel dieses Projektes sind bei [3] beschrieben. Aufgrund der Fertigstellung des Ausbaus der Kläranlage Langwiese im Sommer 2013 wird

der Zustand der Schussen noch eineinhalb Jahre vor und anschließend eineinhalb Jahre nach dem Ausbau der Kläranlage untersucht.

Dank

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

Literatur

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

water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* 25, 2 (open access)

- [4] Triebkorn R., Sandu C., Telcean I., Casper H., Farkas A., Colarescu O., Dori T., Köhler H.-R. (2008): Monitoring Pollution in River Mure, Romania, Part II: Metal accumulation and histopathology. *Environmental Monitoring and Assessment* 141, 177-188
- [5] Honnen W., Rath K., Schlegel T., Schwinger A., Frahne D. (2001): Chemical analyses of water, sediment and biota in two small streams in Southwest Germany. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 195-213
- [6] Havelková M., Randak T., Blahova J., Slatinska I., Svobodová, Z. (2008): Biochemical markers for the assessment of aquatic environment contamination. *Interdisciplinary Toxicology* 1(2), 169-81
- [7] Verordnung (EG) Nr. 1259/2011 der Kommission vom 2. Dezember 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) No 1881/2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für Dioxine und Dioxin-ähnliche PCB in Lebensmitteln.
- [8] Umweltprobenbank: http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/investigations/results/analytes?analytes=10100&sampling_areas=&sampling_years=&specimen_types=10007
- [9] Leiker T.J., Abney S.R., Goodbred S.L., Rosen M.R. (2009): Identification of methyltriclosan and halogenated analogues in male common carp (*Cyprinus carpio*) from Las Vegas Bay and semipermeable membrane devices from Las Vegas Wash, Nevada. *Science of the Total Environment* 407(6), 2102-2114
- [10] Brausch J.M., Rand G.M. (2011): A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82(11), 1518-32.
- [11] Ciniglia C., Cascone C., Giudice R.L., Pinto G., Pollio A. (2005): Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 227- 32
- [12] COM 2011/876 (2012): Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 31.1.2012
- [13] Hajslová J., Pulkrabová J., Poustka J., Cajka T., Randák T (2007): Brominated flame retardants and related chlorinated persistent organic pollutants in fish from river Elbe and its main tributary Vltava. *Chemosphere* 69(8), 1195-203
- [14] Körner W., Bolz U., Triebkorn R., Schwaiger J., Negele R.-D., Marx A., Hagenmaier H. (2001): Steroid analysis and xenosteroid potentials in two small streams in Southwest Germany. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8(3/4), 215-229
- [15] Donker M.H., Zonneveld C., van Straalen N.M. (1993): Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia* 96, 316-323
- [16] Landesumweltamt Brandenburg (2010): Studien und Tagungsberichte Band 26: Endokrin wirksame Stoffe in der Umwelt – Literaturstudie zur Bedeutung dieser Stoffe im Land Brandenburg. http://www.mugv.brandenburg.de/cms/media.php/2320/lu_b26.pdf
- [17] Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. (2004): Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68(2), 141-150
- [18] Triebkorn R., Casper H., Scheil V. Schwaiger J. (2007): Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4), 1405-1416
- [19] Bull S. (2007): Review of Environmental Chemicals and Neurotoxicity. Focus on Neurological Diseases. Health Protection Agency, Chilton

- [20] EPA Health Effect Assessment of DD. EPA -540/1-86-026
- [21] Umweltbundesamt (2011): Karzinogene, mutagene, reproduktionstoxische (CMR) und andere problematische Stoffe in Produkten. Identifikation relevanter Stoffe und Erzeugnisse, Überprüfung durch Messungen, Regelungsbedarf im Chemikalienrecht. UBA-Texte 18/2011
- [22] Uhl M., Hartl W., Schar S. (2010): Überprüfung von Babyartikeln auf Schadstoffe. Umweltbundesamt Wien, Rep-0284. <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REPO284.pdf>
- [23] Anitha D., Shantha S.L., Krishnamurthy V., Vanishree R. (2008): Triclosan as a genotoxic compound for *Drosophila melanogaster*. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology 1(5), 12-161.
- [24] Lin D, Xie X, Zhou Q, Liu Y. (2012): Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. Environmental Toxicology 27(7), 385-92
- [25] PAN Europe factsheet on Carbendazim, Brussels, 2nd March 2011
- [26] Triebskorn R., Adam S., Behrens A., Beier S., Böhmer J., Braunbeck T., Casper H., Dietze U., Gernhöfer M., Honnen W., Köhler H.-R., Körner W., Konradt J., Lehmann R., Luckenbach T., Oberemm A., Schwaiger J., Segner H., Strmac M., Schüürmann G., Siligato S., Traunspurger W. (2003): Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The VALIMAR project. Human and Ecological Risk Assessment 9(1), 171-194

Autoren

Prof. Dr. Rita Triebskorn

Dipl.-Biol. Anja Henneberg

Prof. Dr. Heinz-R. Köhler

Dipl.-Geoökol. Stefanie Kraus

Dipl.-Biol. Diana Maier

Dipl.-Biol. Katharina Peschke

Dipl.-Biol. Paul Thellmann

Physiologische Ökologie der Tiere, Institut für Evolution und Ökologie

Universität Tübingen

Konrad-Adenauer-Straße 2, 72072 Tübingen

Prof. Dr. Rita Triebskorn

Steinbeis Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie

Blumenstraße 13, 72108 Rottenburg

Prof. Dr. Ludek Blaha

RECETOX-Research Centre for Toxic Compounds in the Environment

Faculty of Science Masaryk University

Kamenice 3, CZ-62500 Brno, Tschechien

Dr. Harald Hetzenauer

Dr. Hans Güde

Brigitte Engesser

ISF (Institut für Seenforschung) der LUBW (Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz

Baden-Württemberg

Argenweg 50/1, 88085 Langenargen

Dr. Bertram Kuch

ISWA (Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft)

Bandtäle 2, 70569 Stuttgart

Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Aquatische Ökotoxikologie

Goethe Universität Frankfurt

Max-von-Laue-Straße 13, 60323 Frankfurt am Main

Dr. Magali Rault

Dr. Séverine Suchail

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

UMR 7263 CNRS-IRD IMBE, 301 rue Baruch de Spinoza BP21239

F-84916 Avignon Cedex 09, Frankreich

Dipl.-Biol. Peter Rey

Hydra-Büro

Fürstenbergstraße 25, 78467 Konstanz

Dr. Doreen Richter

Dr. Frank Sacher

TZW (DVGW-Technologiezentrum Wasser)

Karlsruher Straße 84, 76139 Karlsruhe

Dipl.-Biol. Michael Weyhmüller

BBW – Biologiebüro Weyhmüller

Am Königsbühl 15, 88147 Achberg

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

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

E-Mail:

rita.triebskorn@uni-tuebingen.de bzw. stz.oekotox@gmx.de

blaha@recetox.muni.cz

Brigitte.engesser@lubw.bwl.de

anja.henneberg@googlemail.com

hans.guede@lubw.bwl.de

harald.hetzenauer@lubw.bwl.de

heinz-r.koehler@uni-tuebingen.de

stefanie.krais@uni-tuebingen.de

Bertram.Kuch@iswa.uni-stuttgart.de

dianamaier.mt@gmail.com

oehlmann@bio.uni-frankfurt.de

katharina.peschke1@googlemail.com

rault@avignon.inra.fr

p.rey@hydra-institute.com

doreen.richter@tzw.de

sacher@tzw.de

suchail@avignon.inra.fr

info@biologiebuero-weyhmueller.de

GLW.K.Wurm@t-online.de

hans-joachim.vogel@rpt.bwl.de

Kapitel 3: Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen

Katharina Peschke^{a,#}, Jonas Geburzi^a, Heinz-R. Köhler^a, Karl Wurm^b, Rita Triebkorn^{a,c}

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

^b GÖL Water Ecology Laboratory Starzach, Tulpenstr. 4, D-72181 Starzach, Germany

^c Transfer Center Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany

Corresponding author. E-mail address: katharina.peschke@uni-tuebingen.de

Ecotoxicology and Environmental Safety 106: 115-124; DOI: 101016.j.ecoenv.2014.04.011

Abstract

The present study investigates the impact of releases from waste water treatment plants and storm water overflow basins on gammarids and other macrozoobenthos. The study relates to a recent upgrading of a waste water treatment plant (Langwiese) at the Schussen river, an important tributary to Lake Constance. Samples were taken at different sites at the Schussen river upstream and downstream of a storm water overflow basin and the waste water treatment plant Langwiese and, in parallel, at the Argen river, a less polluted reference stream. We assessed the influence of water quality on the distribution of macrozoobenthos and on the health of gammarid populations by a variety of ecotoxicological methods including biomarkers prior to the expansion of the waste water treatment plant. Through histopathological studies, the impact of parasites on host tissue health was evaluated. Analyses of heat shock protein (hsp70) levels allowed us to draw conclusions about the proteotoxicity-related stress status of the organisms. Furthermore, gammarid populations from all sites were investigated in respect to sex ratio, parasitism rate, and fecundity. Macrozoobenthos community integrity was determined by means of the saprobic index and the abundance as well as by the number of taxa. In gammarids, the sex ratio was significantly shifted towards females, fecundity was significantly decreased, and the hsp70 level was significantly increased downstream of the waste water treatment plant Langwiese, compared to the upstream sampling site. Similarly, these effects could be detected downstream of three small storm water overflow basins. In the macrozoobenthos communities, the abundance of taxa, the number of taxa, the number of Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera taxa (EPT-taxa), and the number of sensitive taxa decreased downstream of the storm water overflow basin Mariatal as well as downstream of the waste water treatment plant Langwiese.

Our study showed, that waste water treatment plants and storm water overflow basins affected macroinvertebrate communities and the health of gammarids.

1. Introduction

Anthropogenic pollutants and toxicants released into the environment can easily reach aquatic ecosystems, causing short- or long-term adverse effects. Micropollutants like pesticides, pharmaceuticals, industrial chemicals, and complexing agents can be detected in the environment in very low concentrations (Daughton and Ternes, 1999; Jubeaux et al., 2012; Triebkorn et al., 2013a). They are able to induce adverse effects even at low concentration levels in exposed organisms (Brauch, 2011; Gagné et al., 2005; Ladewig et al., 2006; Schirling et al., 2005; Triebkorn et al., 2003; Triebkorn et al., 2013a). Unfortunately, conventional waste water treatment plants (WWTPs) are not or only partially able, to eliminate micropollutants during treatment processes. Hence, waste water is one of the major sources of micropollutants in aquatic ecosystems (Desbrow et al., 1998; Götz et al., 2010; Schwarzenbach et al., 2006; Seel et al., 1996). Activated carbon filtration is one possibility to eliminate micropollutants from the water cycle. However, more information is still needed about the efficiency and environmental impact of activated carbon filtration in WWTPs. The current work is integrated into the project "SchussenAktivplus", funded by the German Federal Ministry of Education and Research, which is an ecotoxicological study in two tributaries of Lake Constance, the rivers Schussen and Argen in Germany (Triebkorn et al., 2013b). At the Schussen river, the installation of an activated carbon filtration stage at the waste water treatment plant Langwiese has been completed in autumn 2013. The success of the technical improvement at this WWTP with respect to the aquatic environment will be analyzed within this integrated project.

Our part of the project focuses on assessing the overall health status of invertebrates and the distribution of macroinvertebrate taxa living in the Schussen and Argen rivers, the latter representing a less polluted tributary of Lake Constance. For numerous vertebrate species, toxic and endocrine effects caused by polluted environments have been described (Colborn and Thayer, 2000; Crain et al., 1998; Triebkorn et al., 2013a; Triebkorn et al., 2008; Vos et al., 2000). Although research efforts on toxic and endocrine effects of pollutants in invertebrates has increased during the last decade, most of the studies were largely conducted under laboratory conditions (Andersen et al., 2001; Pascoe et al., 2002; Watts et al., 2001; Watts et al., 2002). From field studies there is only little up-to-date information available about toxic and endocrine effects in gammarids caused by waste water, even though gammarids are excellent monitor organisms (Schill et al., 2002a; Schill et al., 2003; Schill and Köhler, 2004a; Schill et al., 2002b; Schirling et al., 2006; Schirling et al., 2005). Gammarids are highly important for aquatic food webs as they feed on detritus, fungal growth on decomposing plants, carrion, and small invertebrates (Brehm and Meijering, 1996; Pöckl, 1993) and act as shredders of plant

material (Schwoerbel, 1999). Since gammarid populations often reach huge numbers of individuals, they are important parts of aquatic ecosystems, particularly as nutrition for fish (Meijering and Pieper, 1982). Due to their important position in freshwater food webs, their high biomass, and their wide natural distribution, gammarids can be used as representative invertebrates of streams (Schirling et al., 2005). Furthermore, they are excellent monitor organisms, as they are widely distributed, occur in large numbers of individuals, have a relatively short generation time and high reproductive rates, and are characterized by a high sensitivity to pollutants (McCahon and Pascoe, 1988; Meijering and Pieper, 1982; Pöckl, 1993; Schirling et al., 2006; Williams et al., 1984). In the studies of Ladewig et al. (2006) and Schirling et al. (2005) two WWTPs at two small streams in Germany have been under investigation regarding toxic and endocrine effects in *Gammarus fossarum*, upstream and downstream of WWTPs at two small German streams. the Korsch (Swabia) and the Lockwitzbach (Saxonia). Gross et al. (2001) analyzed the influence of two WWTPs in the Lea river (north to London, UK) on the sexual development in *Gammarus pulex*. To date, only Bundschuh and Schulz (2011a; 2011b) have assessed the biotic effects of a novel waste water treatment technique supplementing conventional treatment. At the WWTP Wüeri, next to Zurich, CH, an ozonation stage was installed and these authors investigated the effects on the feeding rate and population size of *G. fossarum* by active monitoring (Bundschuh and Schulz, 2011a) and laboratory experiments (Bundschuh and Schulz, 2011b). In both studies, they found significantly increased feeding rates and population sizes in ozonated water compared to non-ozone treated waste water. Thus, the authors concluded, that ozonation may improve waste water quality by reducing the load of micropollutants. Yet, we want to know, if the installation of an activated carbon filtration stage will lead to positive effects with respect to the health of gammarids.

The present study demonstrates the first results of our investigations on toxic and endocrine effects in gammarids (*Gammarus pulex* and *Gammarus roeseli*) caused by waste water treatment effluent prior the installation of active carbon filtration. Different methods were used to investigate the physiological status of gammarids: (1) analyses of the 70 kD heat shock protein family (hsp70), (2) determination of sex ratio in gammarid populations, (3) evaluation of the degree of parasitism und histopathological studies of infected individuals, and (4) determination of fecundity in female gammarids.

(1) Analyses of heat shock protein (hsp70) levels allow us to draw conclusions about the overall proteotoxic impact acting on the test organisms. Molecular biomarkers are suitable to detect even small stress loads, which are permanently present. They are characterized by a high sensitivity and integrate over short periods of time (Triebkorn et al., 2013a). Heat shock proteins are among the molecular biomarkers which have been established in ecotoxicological research, and almost all organisms are able to respond to a proteotoxic stressor with the formation of heat shock proteins. Thus, the induction of heat shock proteins is not only triggered by elevated temperature but also, for

example, by heavy metal loads, other proteotoxic substances, UV radiation, and oxygen deficiency. This is why heat shock proteins are commonly regarded as stress proteins (Lewis et al., 1999; Sanders, 1993). The heat shock proteins are classified according to molecular weights. The best-investigated group of heat shock proteins is the hsp70 family (with isoforms of 66-78 kDa molecular weight).

(2) On the basis of laboratory studies with populations of *G. pulex*, Watts et al. (2002) demonstrated a shifted sex ratio towards females under the influence of 17 α -ethinyl-estradiol. Thus, the determination of the sex ratio seems to be a good method to detect possible estrogenic potential in rivers (Triebkorn et al., 2013a).

In addition to our investigations with respect to sex ratio, we analyzed the degree of parasitism in gammarids (3). Toxic substances can devitalize the immune system. As a result, diseases and parasites can spread more easily (Sures, 2008). Under toxic stress, organisms have to expend large amounts of metabolic energy for the reduction and / or elimination of toxic substances. This energy expense trade off, for example, the ability to fight against parasites. The relationship between the degree of parasitism in organisms and the pollution of their environment has been widely described (Marcogliese, 2005; Morley et al., 2010). However, changes at the genetic level may be responsible for the increased parasitism in polluted environments. Parasites usually have a shorter regeneration time and a higher reproduction rate compared to their hosts, and thereby are able to adapt more rapidly to changing environmental conditions, such as anthropogenic pollutants in aquatic systems. Thus, an increased rate of parasitized organisms in polluted environments can be expected (Bell, 1982; Van Valen, 1973). Through histopathological studies, the impact of parasites on host tissue health was evaluated.

Furthermore, gammarid populations were investigated with respect to fecundity (4), which is also used as a biomarker for aquatic pollution. However, published data about the effect of estrogens on reproduction in gammarids are controversially discussed. Laboratory studies by Watts et al. (2002) demonstrated a positive effect of 17 α -ethinylestradiol on the reproduction in *G. pulex*. But different results from further studies (Ladewig et al., 2006; Mazurová et al., 2010) confirm the assumption that the fecundity index in gammarids may be determined by a complex interaction of numerous parameters.

In addition to our investigations with gammarids, we analyzed the distribution of macrozoobenthos taxa at several sampling sites. Macrozoobenthos is widely used for water quality assessment (Adámek et al., 2010; Chessmann, 1995; Rosenberg and Resh, 1993) because it allows for examining temporal changes and integrating the effects of prolonged exposure or variable concentration of pollutants (Adámek et al., 2010). The distribution of macrozoobenthos taxa is influenced by many factors, such as organic pollution and habitat degradation (Adámek et al., 2010; Whitehurst, 1991). Berenzen et al.

(2005) and Bonzini et al. (2008) showed that pesticides affect the invertebrate community structure in the field. Macrozoobenthos is often used to determine the water quality of rivers and thus, the distribution of macroinvertebrate taxa can be used to demonstrate effects of waste water effluents. In Germany, Bunzel et al. (2013) studied the effects of waste water effluents of 59 WWTPs in Hesse on the structure of macroinvertebrate community up to 3 km downstream of the WWTPs. They concluded that waste water effluents significantly affect the structure of macroinvertebrate community. To date, there is no study which investigates the success of the installation of an activated carbon filtration stage at WWTPs with respect to the macroinvertebrate fauna.

The aim of the present study is to describe toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in the Schussen and Argen rivers prior to the application of activated carbon filtration technology at the WWTP Langwiese and sampling upstream and downstream of this WWTP allows us to assess the influence of the waste water effluent on the test organisms. Subsequent to the installation of the activated carbon filtration stage at the WWTP Langwiese at the Schussen river in October 2013, we will perform the same analyses to provide information on the success of the technological improvement at this WWTP with respect to the health of macroinvertebrates.

Table 1: Sampling sites and sampling dates. a.) Sampling sites at the Schussen and the Argen rivers. Locality name, geographical position, topography and studied organisms for each sampling site. b.) Sampling of gammarids: Sampling dates, seasons and flow conditions. WWTP = waste water treatment plant Langwiese, SOB = storm water overflow basin, MZB = macrozoobenthos.

(a)	Sampling site	Locality name	Geographical position	Topography	Studied organisms
Schussen river	Site 00	Staig	47°51'39.37"N 9°37'04.87"E	15 km upstream WWTP 12 km upstream SOB Mariatal 1.3 km downstream 3 small SOBs	Gammarids
	Site 0	Weißenuau	47°45'29.59"N 9°35'22.88"E	2.5 km upstream WWTP 150 m upstream SOB Mariatal	Gammarids MZB
	Site 1a	Weißenuau	47°40'19.57"N 9°32'06.20"E	630 m upstream WWTP 1.12 km downstream SOB Mariatal	MZB
	Site 1b		47°44'42.27"N 9°33'45.04"E	850 m downstream WWTP 3.8 km downstream SOB Mariatal	MZB
	Site 2	Lochbrücke	47°40'22.44"N 9°32'06.34"E	11 km downstream WWTP 14 km downstream SOB Mariatal	MZB
	Site 3	Oberbaumgarten	47°39'16.20"N 9°31'52.93"E	15 km downstream WWTP 18 km downstream SOB Mariatal	Gammarids MZB
	Argen	Site 5	Gohren	47°36'09.71"N 9°34'02.91"E	2.5 km to Lake Constance
(b)		Sampling dates		Seasons	Flow conditions
2010		19 April		Spring	Normal water
		29 June		Summer	High water
		19 August		Summer	Low water
		13 October		Autumn	Normal water
2011		9 May		Spring	Low water
		7 July		Summer	Low water
		2 September		Autumn	Normal water
		28 October		Autumn	Normal water
2012		3 May		Spring	Low water
		4 July		Summer	Normal water
		24 October		Autumn	Normal water

2. Materials and methods

2.1. Description of streams

Two rivers in Southern Germany were under investigation in this study. Sampling took place at these two tributaries to Lake Constance: the Schussen river and the Argen river. The Schussen river is one of the ten largest tributaries to Lake Constance. The catchment area is approximately 822 km² large and is characterized as industrial in the middle section. The average discharge rate is 11 m³/s. Due to the relatively dense urban area and the high number of inhabitants (200,000 inhabitants) within the catchment area, the river's course was greatly changed morphologically, and long distances have been straightened. The land use is dominated by arable land and specialty crops such as fruits and hops (LUBW, 2010). The WWTP Langwiese, close to Ravensburg, is one of the largest WWTPs at the Schussen river with about 170,000 population equivalents (PE). The main treatment steps in this WWTP are as follow: screen / grit channel, primary treatment, biological treatment, final clarification, activated charcoal filtration, sandfilter. The installation of an active charcoal filter was finished in autumn 2013. Some annual mean data from 2013 in the effluent: chemical oxygen demand (COD): 14 mg/l, nitrate: 7.5 mg/l and phosphate: 0.17 mg/l.

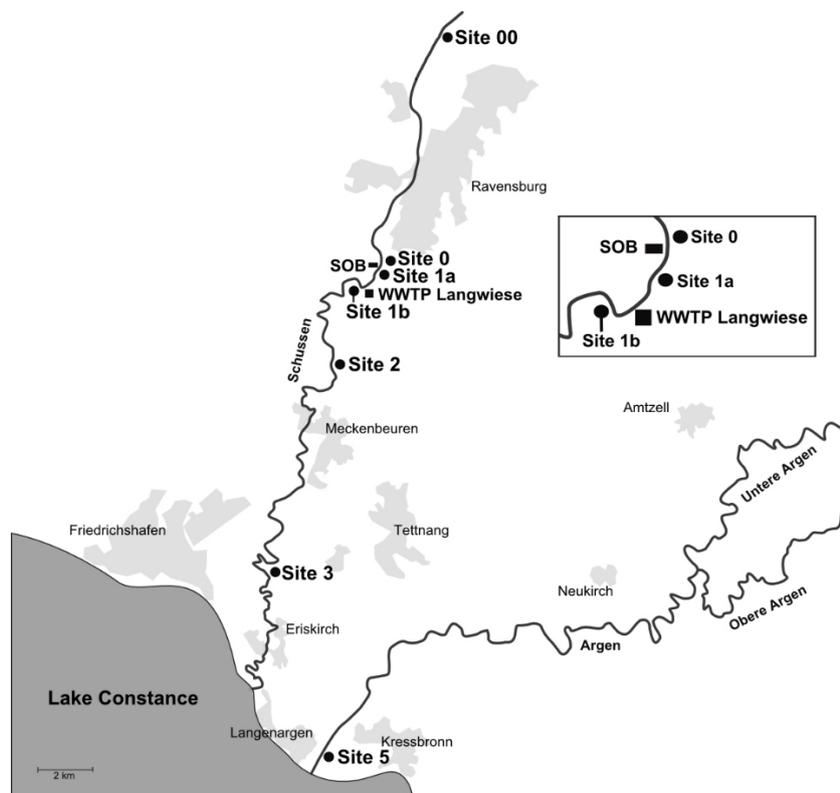


Fig. 1: Sampling sites at the Schussen and the Argen rivers, two tributaries to Lake Constance. Black border: enlarged area around the WWTP Langwiese. Gammarids were collected at Site 00, Site 0, Site 3 and Site 5. Macrozoobenthos was sampled at Site 0, Site 1a, Site 1b, Site 2 and Site 3. WWTP = waste water treatment plant. SOB = storm overflow basin. The map is based on OpenStreetMap. Map data: ©OpenStreetMap contributors, licence: <http://opendata-commons.org/licenses/dbcl/1.0/>

The Argen river is the third largest tributary to Lake Constance and is formed by the confluence of the Obere Argen and the Untere Argen rivers. The catchment area is approximately 656 km² large and the average discharge rate is about 20 m³/s. The Argen river is a subnatural river, the land use is characterized by forest and grassland in the upper stream section, whereas the lower stream section is characterized by pomiculture (apples, strawberries, cherries). Nine municipal waste water treatment plants drain into the Argen river, and the largest WWTP is near Wangen with 67,300 population equivalents (LUBW, 2010).

2.1.1. Characterization of sampling sites

To analyze the effects of the WWTP effluent on invertebrates, different sampling sites were established for investigations with gammarids and analyses of macrozoobenthos.

For our investigations with macrozoobenthos, six sampling sites were chosen at the Schussen river (Tab. 1a, Fig. 1). Due to the fact, that macrozoobenthos is nearly stationary (Langmaier et al., 2006) the distances between different sampling sites can be quite short, in contrast to the sampling sites selected for fish (see below). The six sampling sites at the Schussen river include sites upstream (Site 0, Site 1a) and downstream (Site 1b, Site 2, Site 3) of the WWTP Langwiese as well as upstream (Site 0) and downstream (Site 1a) of the storm water overflow basin (SOB) Mariatal. These sites were chosen to get information about changes in the macrozoobenthos community structure along the course of the Schussen river.

Our investigations with gammarids were performed close to the studies from the other partner within SchussenAktiv*plus*. At the end of the project we want to compare our results to results attained from diverse investigations with feral fish (i.a. histopathological studies and analysis of the stress protein Hsp70, see Triebkorn et al., 2013b). For this purpose, fish and gammarids were caught simultaneously at same sites at the Schussen river (Tab. 1a, Fig. 1). Site 0 was chosen as a sampling site upstream of the WWTP Langwiese. Site 3 was chosen as a sampling site downstream of the WWTP Langwiese so we could make sure that fish, caught at Site 3, had always stayed downstream of the WWTP Langwiese. Site 1b and Site 2 are too close to WWTP Langwiese and too close together, so that fish could have stayed both upstream and downstream of the WWTP prior to sampling. Such a situation could affect the results. For our investigations with gammarids, two additional sampling sites were chosen: Site 00 at the Schussen river and Site 5 at the Argen river. Site 00 acts as a further sampling site upstream of the WWTP Langwiese but downstream of three small storm water overflow basins. The sampling site at the Argen river (Site 5) acts as a reference site which is less polluted than the sampling sites at the Schussen river.

2.2. Investigations with gammarids

At each site, 180 gammarids were collected using a net with 1 mm mesh size. Sampling took different typical habitats of gammarids, such as macrophytes, roots, and batches of leaves into account. Gammarids from these habitats were gathered together in a single storage vessel. The required number of gammarids for each of the following investigations was taken randomly from this storage vessel. Sampling took place up to four times per year from 2010 through 2012. Thus, in addition to investigating environmental effects of the effluent of WWTP Langwiese on gammarids we were able to examine seasonal variations in population structures by sampling in springtime, summer, and autumn (Tab. 1b).

2.2.1. Rate of parasitism

To determine the degree of parasitism, 100 gammarids were randomly picked from the storage vessel at each site. As a principle, gammarids could be infected by *Acanthocephala* and, in parasitized individuals, the parasite is macroscopically visible. Parasitized gammarids show a yellow, orange or red patch at the dorsum. The identification of these parasites in fixed animals is hard to conduct because the visual appearance of the parasites fades in the fixative. Consequently, the determination of parasitism took place on site using living individuals. To investigate the effects of parasites on the internal organs, 10 parasitized gammarids were decapitated and fixed in 2% glutardialdehyde, dissolved in 0.005M cacodylate buffer, for histopathological analysis. Before embedding in Technovit (Heraeus Kulzer, Germany), the fixed samples were decalcified for 2 days in 5% trichloroacetic acid and subsequently dehydrated in a graded series of ethanol. Then each individual was cut in four series of eight sagittal sections (4 µm thickness) using a Reichert-Jung microtome (Reichert-Jung, Nußloch, Germany). One half of the sections was stained with hematoxylin eosin, the other half was stained with azure methylene blue according to Richardson et al. (1960). For each parasitized individual sections were examined using a light microscope (Axioscope 2, Zeiss, Oberkochen, Germany). In 3.1.2 we could show the first but nevertheless impressive result of the histopathological study of an infected gammarid individual. The remaining samples are currently histopathologically investigated and results will be published as soon as possible.

2.2.2. Sex ratio and distribution of species

After identification of parasites we fixed these 100 gammarids per sampling site in 2% glutardialdehyde dissolved in 0.005M cacodylate buffer. To determine the sex ratio and the distribution of species, samples were studied using a stereo microscope. The determination of the species is based on external morphological characters. In the Schussen and Argen rivers we found two different gammarid species: *G. roeseli* (Gervais, 1835) and *G. pulex* (Linné, 1758). *G. roeseli* was distinguished from *G. pulex* by the

presence of appendices in the abdominal region of the body (Pöckl, 1993). In addition, the body length, as well as the distance from the anterior margin of the cephalothorax to the posterior margin of the telson were measured for each individual. For this purpose, the gammarids were straightened out with fine forceps on graph paper under a stereoscopic microscope and were grouped into 1 mm length-classes. The sex of each individual was determined by the presence of oostegites (brood plates) for females or genital papillae for males (Welton, 1979). Gammarids with a body length smaller than 6 mm were determined as juvenile, due to the fact that the external sexual organs are not developed until 9 molts (Pöckl, 1993).

2.2.3. Fecundity

To determine the fecundity in gammarids at each sampling site, 20 breeding females were picked randomly from the storage vessel. On site, the species from was determined. Subsequently each breeding female was fixed separately in 2% glutardialdehyde, dissolved in 0.005M cacodylate buffer. The number of eggs and/or juveniles in the marsupium of breeding females is used to determine the fecundity. Using a stereoscopic microscope, the marsupium of every fixed female was opened carefully with dissecting needles and eggs and juveniles were dissected out and counted. Subsequently, the fecundity index (FI) was calculated: $FI = \text{number of eggs or juveniles} / \text{body length}$. Although two different gammarid species were studied, the fecundity indices could be grouped together according to Pöckl (1993). Despite differences in average size within these species, the fecundity is identical in equal sized females of different European *Gammarus* species (Pöckl, 1993).

2.2.4. Hsp70 analysis

For the stress protein (Hsp70) analysis in gammarids, at each site 20 praecopula pairs were picked randomly from the storage vessel. Hsp levels vary within the reproductive cycle of gammarids (Schirling et al., 2004b). However, by using praecopula pairs we ensured that the investigated individuals were in the same reproductive stage. Moreover, the sex of gammarids could be easily determined in praecopula pairs as males use their gnathopods to attach to the female during praecopulation (Borowsky, 1984). Hence, the Hsp70 level could be separately analyzed in each sex. Following Sures and Radszuweit (2007) and Sures (2008), we did not use individuals with an acanthocephalan infection that was visible by eye. An infection with acanthocephala may adversely affect stress protein expression in gammarids (Sures, 2008; Sures and Radszuweit, 2007). After determination of the species, gammarids were externally dried from free adherent water and a total of 20 females and 20 males were individually shock-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Due to the small body sizes, Hsp70 analysis was conducted using whole-body homogenates. The gammarids were individually homogenized in extraction buffer (80 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 20 mM Hepes, 2% protease inhibitor Sigma P8340, pH 7.5). The extraction buffer volume was adjusted to the

individual's size, and therefore, sex. Females were homogenized in 60 μ l, while the larger males were homogenized in 80 μ l extraction buffer. Afterwards, the homogenate was centrifuged for 12 minutes at 20,000 g at 4 °C. According to the method of Bradford (1976), the total protein concentration in the supernatant was determined. From each sample, constant amounts of total protein (80 μ g of total protein per lane) were applied to SDS-PAGE (12% acrylamide-bisacrylamid). SDS-PAGE was run for 20 min at 80 V and 120 min at 120 V. By semidry-blotting, the protein was transferred to nitrocellulose. Subsequently, the filters were blocked for 1.5 h in 50% horse serum in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) and then washed for 5 min in TBS. In the next step, a monoclonal antibody mouse anti-human Hsp70 (dilution 1:5000 in 10% horse serum/TBS; Dianova, Hamburg, Germany) was added and the filters were incubated at room temperature overnight. The next day, the filters were washed for 5 min in TBS, a secondary antibody (peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG; dilution 1:1000 in 10% horse serum/TBS; Dianova) was added and the mixture was incubated for 2 h at room temperature. Afterwards, the filters were washed again in TBS for 5 min. By using 1 mM 4-chloro(1)naphthol and 0.015% H₂O₂ in 30 mM Tris (pH 8.5, containing 6% methanol), the antibody complex was detected. The filters were dried for 2 h, using Whatman papers. Afterwards, the filters were scanned and the optical volume (gray scale values x area) of the Western blot protein bands were quantified using a densitometric image analysis system (Herolab E.A.S.Y., Germany). The protein bands were related to an internal Hsp70 standard (extracted from zebrafish *Danio rerio*), run in parallel on each gel.

2.2.5. Statistical analyses

In order to compare the different sampling sites in respect to the distribution of species and parasitism, all results obtained during the time of investigation (2010-2012) were pooled for each sampling site. Since data (distribution of species and parasitism) were not normally distributed, we used the nonparametric Wilcoxon test with Bonferroni correction regarding the distribution of species. Significant differences with respect to the rate of parasitism were checked with Fisher's Exact Test.

To compare the fecundity indices and the Hsp70 levels among the four different sampling sites, we pooled our results for spring, summer, and autumn for each sampling site. Since these data were not normally distributed, the nonparametric Wilcoxon test with Bonferroni correction was used.

Regarding the male/female ratio, significant deviation from the 1:1.5 sex ratio (according to Ladewig et al., 2006) and significant shifting towards female was checked with one-dimensional frequency test (Likelihood ratio test).

All tests were performed using the software JMP (SAS Institute Inc., version 10.0.0).

2.3. Investigations of the macrozoobenthos

The macrozoobenthos community was sampled in autumn 2010 (October, normal flow conditions) according to the multi habitat sampling-method (MHS), compliant to the EU Water Framework Directive (WFD, 2000). In this case, transects which were representative in terms of abiotic factors were chosen within each sampling site. Samples were taken proportional to their abundance. On site, the macrozoobenthos was fixed in ethanol (70%) and investigated in the laboratory. Determination of species was based on the catalogue FAUNA AQUATICA AUSTRIACA according to Meier et al. (2006) and Ofenböck et al. (2010). Subsequently, the ecologic quality of the Schussen river was determined using software ASTERICS (Version 3.1.1) and the German evaluation system PERLODES.

3. Results

3.1. Investigations on gammarids

3.1.1. Distribution of species

The distribution of gammarid species varied between Site 00, Site 0, Site 3 and Site 5. In the Argen river (Site 5) the gammarid population was completely made up of *G. pulex* whereas the gammarid population in the Schussen river (Site 00, Site 0 and Site 3) consisted of *G. pulex* and *G. roeseli* (Fig. 2a).

Sample sites at the Schussen river differed significantly in relation to the composition of gammarid population. We found significantly more *G. pulex* and fewer *G. roeseli* individuals at Site 0 in comparison to Site 00 ($p < 0.016$) and 3 ($p < 0.003$). In contrast, Site 00 was similar to Site 3 and there were no significant differences between these two sampling sites. At both sites (Site 00 and Site 0) the gammarid population consisted of more than 90% *G. roeseli* individuals.

3.1.2. Rate of parasitism

Gammarids could be infected with two acanthocephalan parasites, *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus*. The coloured cystacanths are visible through the amphipod cuticle, yellow in *P. laevis* and bright orange in *P. minutus* (Bollache et al., 2002). Since we quantified the parasitism rates per eye and could not dissect the hosts, it was not always definite if the cystacanth was coloured yellow or bright orange. Consequently, we could not distinguish the two parasites and therefore used parasitism as a sum parameter in the following analysis.

In order to find differences in the rate of parasitized individuals, we examined *G. pulex* and *G. roeseli* individuals separately. The number of parasitized *G. roeseli* individuals did not differ significantly between the three sampling sites at the Schussen river (Individuals of *G. roeseli* infected with

Acanthocephala during the entire time span (2010-2012): Site 00: 4%, Site 0: 5%, Site 3: 3%). At the Argen river (Site 5) we did not find *G. roeseli*.

In contrast to the examined *G. roeseli* individuals, there was a significant difference among the sampling sites at the Schussen river regarding parasitized *G. pulex* individuals. At Site 3 we found significantly more infected *G. pulex* individuals than at Site 00 (Fig. 2b). With respect to parasitized *G. pulex* individuals, we neither found any significant difference between all the other sampling sites at the Schussen river nor differences between the Schussen and the Argen rivers.

To investigate the effects of parasites on the internal organs, parasitized gammarids were histopathologically studied. The major part of our histopathological samples is currently under investigation. As a first result we want to show a sagittal section here to give a brief overview about the parasites dimension in infected gammarids.

The body of adult acanthocephala is slightly flattened and vermicular. The abdominal cavity for the most part comprises the reproductive organs, and a gut is absent. The resorption of nutrients takes place via the epidermis of the host's gut or via the host's coelom (Westheide and Rieger, 2004). As seen in Fig. 3, the acanthella stage can reach huge size in its host. Due to the parasites' large space requirement, the organs in the investigated host gammarid were extremely compressed which may result in a restriction of their function.

3.1.3 Sex ratio

In order to investigate the gammarids' sex ratio at each site, we examined *G. pulex* and *G. roeseli* together. We found just 31 individuals of *G. pulex* at Site 00 and just 41 individuals of *G. pulex* at Site 3 throughout the course of the study. To identify seasonal variations in the composition of the present gammarid populations, we categorized all the data and pooled them for spring, summer, and autumn, respectively. However, the number of *G. pulex* individuals at Sites 00 and 3 was insufficiently low to reliably estimate the sex ratio. Using the example of collected *G. pulex* in spring, we found just three females and two males at Site 3. Examinations on the basis of this small sampling size cannot lead to solid statements regarding the sex ratio. For this reason, we examined *G. pulex* and *G. roeseli* together as *G. spec.* For the samplings in spring, summer, and autumn (2010-2102), we determined the number of females, males, and juveniles within the whole gammarid population at each sampling site, respectively.

There were obvious temporal fluctuations in sex and age within the gammarid populations. The portion of juvenile gammarids in summer and autumn was generally higher than in spring. Regarding the number of females, a slight trend towards fewer females in autumn was obvious at many sampling

sites. Concomitantly, the number of males at several sampling sites showed a slight trend towards higher values in autumn compared to spring.

To examine potential effects on the population structure downstream of the WWTP Langwiese, we calculated the sex ratio at each site (Tab. 2). Even if rivers and streams are not or only marginally polluted, the ratio of male to female differs from 1:1. Ladewig et al. (2006) found a male to female ratio of 1:1.5 in a minor polluted stream in Germany. Based on these results, we could determine that effects were caused by the effluent of the WWTP Langwiese if the ratio of male to female would significantly deviate from a 1:1.5 ratio.

We never observed any sex ratio shift towards males during the entire time of investigation. In contrast, in spring and summer the sex ratio was significantly shifted towards females at Sites 00 and 3 (downstream WWTP). However we could not observe effects on the sex ratio in autumn. At Sites 0 and 5 sex ratio was never found to be significantly shifted towards females.

Investigations on the body length of males and females did not result in any significant differences between the sampling sites at the Schussen and Argen rivers.

Table 2: Sex ratio. Pooled data for spring, summer and autumn. Ratio of males to females.

	Spring	Summer	Autumn
Schussen Site 00	1:3.43***	1:3.16***	1:1.19
Schussen Site 0	1:1.23	1:1.79	1:1.18
Schussen Site 3	1:2.57***	1:2.42***	1:1.40
Argen Site 5	1:1.76	1:1.52	1:1.13

*** Shifting towards females with a factor significantly higher than 1.5:
 $p < 0.0001$

3.1.4. Fecundity index

According to investigations of the sex ratio and Pöckl (1993), we pooled breeding *G. pulex* and *G. roeseli* together to examine the fecundity indices (Fig. 2d).

Data showed a trend of decreasing fecundity index from spring to autumn. Furthermore, differences among the investigated sampling sites were visible: we found significantly decreased fecundity indices at sampling Site 00 and Site 3 in summer and autumn compared to Site 0. In contrast, there weren't any significant differences between the Schussen and the Argen rivers.

3.1.5. Hsp70 level

Since both investigated gammarid species differed significantly in their hsp70 levels under non-stress conditions, we had to examine both species separately. We did not find any significant difference

between males and females within the investigated species. Thus, we examined both sexes together for each species.

Regarding *G. roeseli* we did not find any significant differences between sampling sites at the Schussen river during the time of investigation. This stands in contrast to our examinations with *G. pulex* (Fig. 2c).

The hsp70 level in *G. pulex* in summer at Site 00 and Site 3 was significantly higher compared to Site 0 ($p < 0.008$). There were no differences regarding the hsp70 level in *G. pulex* between these sampling sites in autumn. Additionally, we found no significant differences between the Schussen and the Argen rivers.

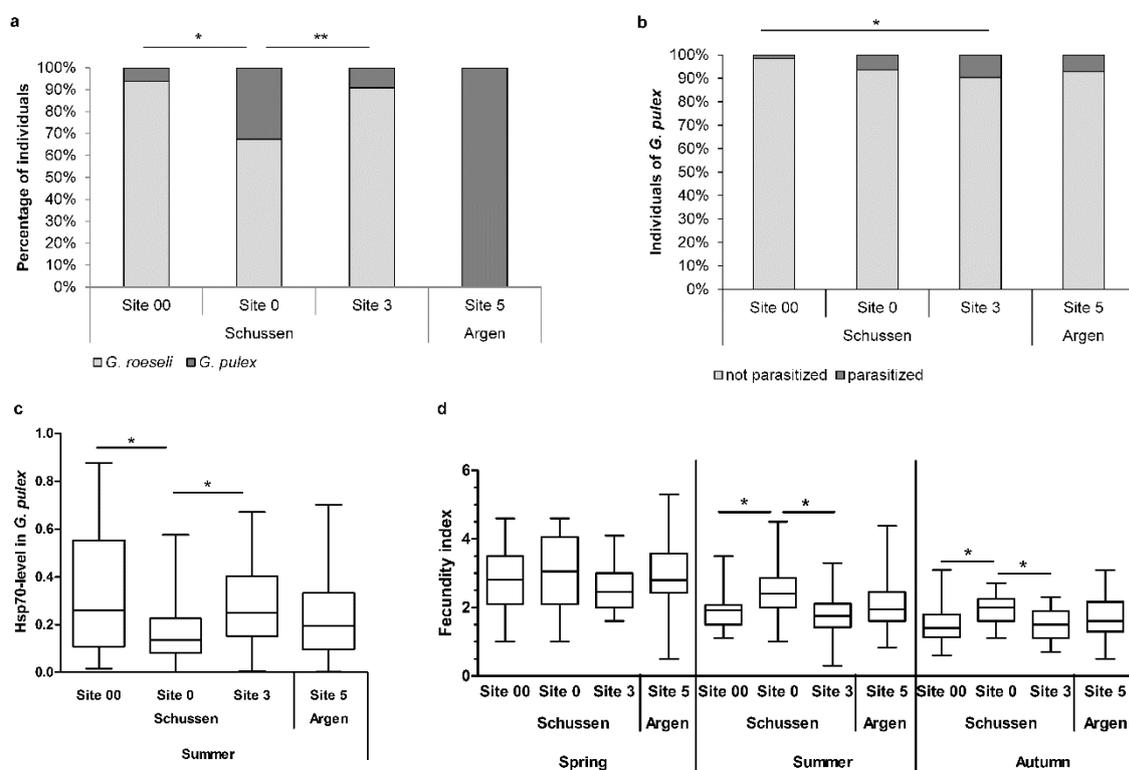


Fig. 2: Investigations with gammarids:

a.) Distribution of gammarid species. Number of individuals at each sampling site, totalized for the entire time span of investigation (2010-2012). Sample sizes: Site 00 (Staig): 600; Site 0 (Weißenau): 800; Site 3 (Oberbaumgarten): 800; Site 5 (Gohren): 800. Significant differences between sampling sites in the river Schussen: $p < 0,016$ (*); $p < 0,003$ (**).

b.) Percentage of acanthocephalan-infected and uninfected *G. pulex* individuals. Number of individuals at each sampling site totalized for the entire time span of investigation (2010-2012). Sample sizes: Site 00 (Staig): 31; Site 0 (Weißenau): 293; Site 3 (Oberbaumgarten): 41; Site 5 (Gohren): 800. Significant differences: $p < 0.05$ (*).

c.) Hsp70 levels in *G. pulex*. Pooled data for summer. Box-and-whisker-plots displaying median, minima, maxima, upper and lower quartile. Sampling size at each sampling site: Site 00 (Staig): 18; Site 0 (Weißenau): 47; Site 3 (Oberbaumgarten): 23; Site 5 (Gohren): 96. Significant differences: $p < 0,008$ (*).

d.) Fecundity index. Box-and-whisker-plots displaying median, minima, maxima, upper and lower quartile. Pooled data (2010-2012) for spring, summer, and autumn. Sampling size at each sampling site: spring: 20; summer: 80; autumn: 40. Significant differences: $p < 0.0008$ (*).

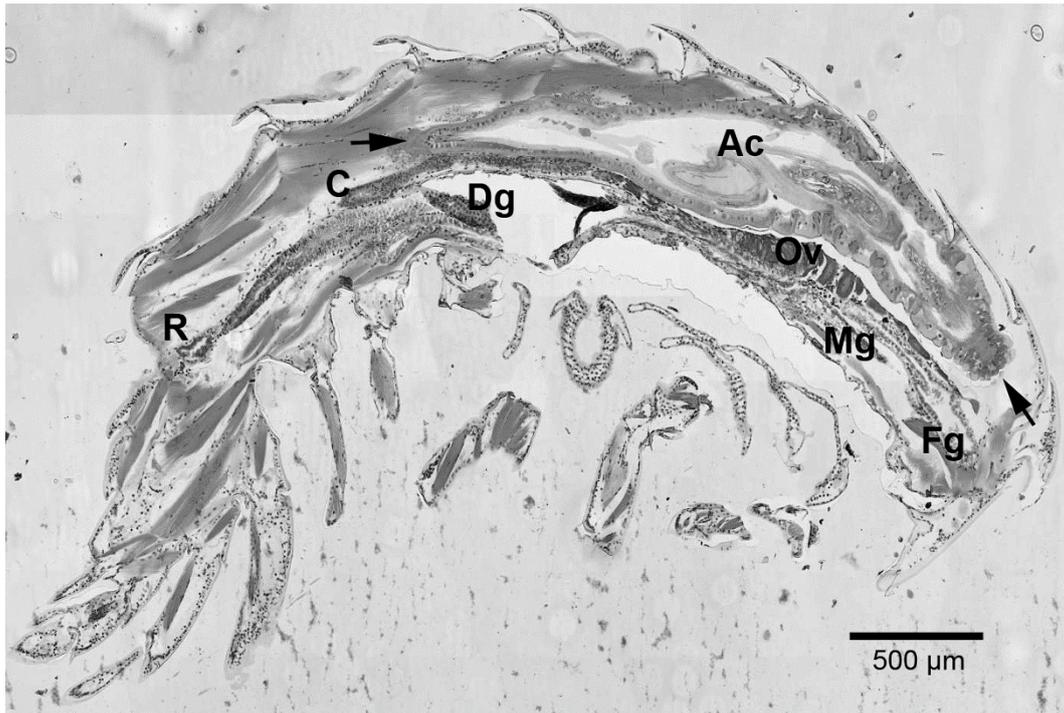


Fig. 3: Overview of the tissue from a parasitized *G. pulex* individual. Sagittal section. Ac: Acanthella, R: rectum, Mg: midgut, Dg: digestive gland, Ov: ovary, C: caecum, Fg: foregut. Arrows: Acanthella's front and back end.

3.2. Investigation of the macrozoobenthos

3.2.1. Saprobic index

By calculating the saprobic index, we could classify the investigated sampling sites at the Schussen river into water quality classes. Saprobic indices as calculated at the investigated sampling sites: Site 0: 1.88; Site 1a: 1.83; Site 1b: 1.86; Site 2: 1.9; Site 3: 1.77. The whole investigated course of the Schussen river, from Site 0 downstream of Ravensburg up to Site 3, could be classified as to be in "good condition", according to saprobity and, therefore, meets the demands of the EU Water Framework Directive (WFD). Right downstream of the WWTP Langwiese (Site 1b) we found a slight increase in the saprobic index. At both sampling sites located downstream of Site 1b (Site 2 and Site 3) we also recognized a slight enhancement of the saprobic index.

3.2.2. Number of taxa and sensitive taxa

The number of species in the examined macrozoobenthos decreased significantly at Site 1b, directly below WWTP Langwiese (Fig. 4a).

At Site 1b, right downstream of this WWTP's effluent, we counted the lowest number of macrozoobenthic taxa. Also the abundance of individuals was decreased at Site 1b, directly downstream of the WWTP Langwiese, compared to Site 0 and Site 1a. Further downstream, at Site 2 the number of taxa and individuals per m² increased again, in relation to Site 1b.

In addition, we also found a decrease in sensitive taxa at Site 1b, directly downstream of the WWTP Langwiese (Fig. 4b). The number of EPT-taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera), which are very sensitive to toxic effects, decreased at Site 1b as well. However, downstream of Site 1b at Site 2 and Site 3 we found an increased number of both sensitive taxa and EPT-taxa.

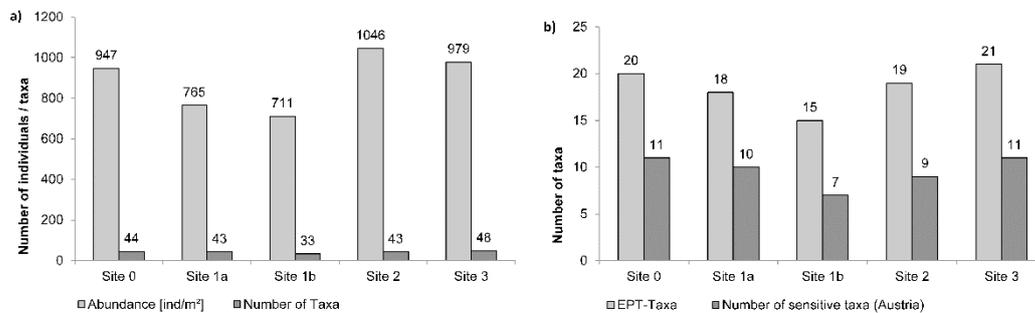


Fig. 4: Macrozoobenthos at the Schussen river in autumn 2010. a) Number of taxa and abundance of individuals. b) Number of sensitive taxa (according to assessment procedures from Austria (Meier et al., 2006; Ofenböck et al. 2010) and number of EPT-taxa (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera).

4. Discussion:

In our study we aimed at assessing the overall health status of gammarids and the distribution of macroinvertebrate taxa living in the Schussen and Argen rivers, the latter representing a less polluted tributary of Lake Constance. Sampling upstream and downstream of the WWTP Langwiese allowed us to assess the putative influence of the waste water effluent on the investigated organisms.

The increased number of juvenile individuals in the summer and autumn samples may be explained by the natural rhythm of reproduction in gammarids. Because of the falling water temperatures in later autumn, a reproductive pause begins in October which lasts until March/April (Pöckl, 1993). Gammarids reproduce during spring and summertime, which is indicated by the high proportion of praecopula in the population. Consequently, juvenile individuals were increasingly found in the samples from late summer and autumn. This fact has been earlier described by Ladewig et al. (2006). At several sampling sites the number of females decreased slightly from spring to autumn. Since the female propagation phase is very energy consumptive, increased mortality of females after the reproductive phase could be an explanation for the decrease in the number of females.

In gammarids, the determination of sex is not monofactorially affected by the gonosomes. Sutcliffe (1992) discussed polyfactorial and also external effects that regulate sex determination in gammarids. A sex determination via the release of hormones of one androgenic gland was described by Andersen et al. (1999). Hence, even in less polluted waters, variations in sex ratio of male to female of 1:1, both trends to males as well as trends to females, are expected. Ladewig et al. (2006) has found a male to

female ratio of 1:1.5 at the Lockwitzbach, a minor polluted stream in Eastern Germany. Based on the results of Ladewig et al. (2006), we could conclude that a possible burden with endocrine contaminants would exist at the investigated sampling sites if the sex ratio differed significantly from a 1:1.5 distribution towards females. When comparing the different sampling sites, the sex ratio was significantly shifted towards females at a factor higher than 1.5 at Site 00 and Site 3. Thus we concluded that there was an burden of micropollutants, possible endocrine disruptors, at sampling Site 00 and Site 3, caused by SOBs (at Site 00) and the WWTP (Site 3). In the autumn samples, there were no significant variations regarding the sex ratio. It is likely that this is due to the decreasing number of females in autumn as described above. In all significant cases of our study, the sex ratio in gammarids was shifted towards females.

The sex ratio we found in gammarid populations at the different sampling sites indicates interference by chemicals, possible endocrine disruption, at the sampling Sites 00 and 3. In the case of increased estrogenic load, Watts et al. (2002) and Mazurová et al. (2010) found increased fecundity in gammarids. However, these two studies were conducted under laboratory conditions and should not inconsiderately be applied to studies in the field. In contrast to the direct exposure to 17 α -ethinylestradiol as carried out in the laboratory studies from Watts et al. (2002) and Mazurová et al. (2010), gammarids in the field are likely exposed to a multifarious mixture of several micropollutants. Despite increased estrogenic potentials, this mixture may adversely affect gammarid fecundity in a complex way. Thus, Ladewig et al. (2006) could not determine increased fecundity in gammarids despite the broad estrogenic burden downstream of a WWTP at the Körsch river in Germany. In contrast, a putative, versatile mixture of micropollutants released by WWTPs and SOBs, in the face of estrogenic burden, can cause decreased fecundity in gammarids, as shown in our study. During summer and autumn sampling, we determined decreased fecundity in gammarids at Sites 00 and 3 compared to Site 0. Fecundity in gammarids is also influenced by the water temperature (Pöckl, 1993). On the basis of analyzed physicochemical water parameters, however we could not determine significant differences in water temperature between the sampling sites during the investigation time (data not published). Thus we can exclude that the determined significant differences regarding the fecundity index were related to the water temperature. Regarding the fecundity indices throughout the investigation at the different sampling sites, we found a trend of decreasing fecundity from spring to autumn. This effect is already described by several studies (Ladewig et al., 2006; Pöckl, 1993), and it reflects our results regarding the sex ratio and population structure during the year and corresponds to the natural rhythm of reproduction in gammarids.

Some gammarids were infected with acanthocephalan larvae. In *G. pulex* and *G. roeseli*, two acanthocephalan parasites were described: *Pomphorhynchus laevis* and *Polymorphus minutus* (Bollache et al., 2002; Sures and Radszuweit, 2007; Sures et al., 1999). For both parasites, gammarids

represent the alternate host. We found significant differences between the sampling sites at the Schussen river concerning the amount of parasitized individuals within the investigated population only in *G. pulex*. At Site 3, the sampling site furthest downstream at the Schussen river, we found significantly more parasitized *G. pulex* individuals compared to sampling Site 00, the sampling site furthest upstream at the Schussen river. Given that we found no significant differences between sampling Site 0 (upstream of the WWTP) and sampling Site 3 (downstream of the WWTP), we cannot assume that the increased number of parasitized individuals at Site 3 results solely from the WWTP. Our results rather show a trend of an increasing number of parasitized individuals downstream the Schussen river. In light of these results, we conclude that probably a broad mixture of micropollutants increases moving downstream, caused by SOBs and WWTPs effluents along the river. It is possible that the load of micropollutants at sampling Site 3 reached a composition which led to impact of the infection with acanthocephalan parasites.

Histopathological analysis of parasitized gammarids clearly show how much space the parasites require in their host. In the investigated gammarids, late acanthella and cystacanth larvae reached approximately 50% of the body length of their hosts and thereby filled a large part of the abdominal cavity. Gonads, midgut, and midgut glands were extremely squashed. Continuative histopathological studies regarding gonads and midgut in infected and uninfected gammarids are under examination and the results are not yet available.

By means of our analysis of stress protein, hsp70, in gammarids, we only found significant differences between sampling sites at the Schussen river in *G. pulex* in the summer samplings. In this context we found significant differences regarding the hsp70 level at sampling Sites 00 and 3 compared to sampling Site 0. It is known that the hsp70 induction kinetics follow an optimum curve (Eckwert et al., 1997). According to Triebkorn et al. (2013a), the load of contaminants and the estrogenic burden at Site 0 is lower than at the sampling site 3 at the Schussen river. Thus we conclude that the hsp70 level at Site 0 reflects a rather unstressed situation and the increased hsp70 level at Sites 00 and 3 reflects proteotoxic action, likely caused by the effluents of SOBs (Site 00) and the WWTP Langwiese (Site 3) as already indicated by our investigations on fecundity index and sex ratio. In the autumn samples of *G. pulex* and all the samples of *G. roeseli*, we did not find any significant differences between the sampling sites. One reason for this is, on the one hand, the relatively small sample size at some sampling sites (partly n=2 or n=3). This results from the differences in species distributions at the sampling sites. Because hsp levels vary within the reproductive cycle of gammarids (Schirling et al., 2004b) we only could use praecopula stages for stress protein analysis to be sure that the investigated gammarids were under the same developmental conditions. In autumn, based on the reproduction cycle in gammarids, there were comparatively few praecopula to find. Moreover, the analyzed data showed a very high level of variability, whereby no statistical significance could be calculated in large

part. Despite the use of uninfected gammarids, there were often no or only bands of fragmentary protein visible on the stained nitrocellulose filters which impeded the application of this biomarker in free-living gammarids.

So far, the differences regarding the distribution of gammarid species in the Schussen cannot be explained. At all sampling times we found significantly more *G. roeseli* at Site 00 and Site 3 compared to Site 0. In rivers and streams wide areas regularly exist with mixed gammarid population, composed of *G. roeseli* and *G. pulex* (Pöckl, 1993). The presence of *G. pulex* goes hand in hand with higher oxygen contents and better water quality than in areas preferential to *G. roeseli* (Schwab, 1993). On the basis of analyzed physicochemical water parameters, we could not determine significant differences in oxygen content between the sampling sites 00, 3, and 0 during the investigation time (data not published). Perhaps our further investigations after the start-up of the activated charcoal filtration stage at the WWTP Langwiese will permit more accurate conclusion regarding the distribution of species.

In contrast to the mixed population at the Schussen river, the gammarid population at the sampling site at the Argen river solely consists of *G. pulex*. Until now we could not find any gammarids in the Obere Argen nor in the Untere Argen rivers. During the investigation time in 2010 and 2011 we only found *G. fossarum* in several small tributaries to the Obere Argen and Untere Argen rivers. The reasons for these distributions are still unclear.

In addition to our study with gammarids, we performed analyses of the macrozoobenthos at several sampling sites along the Schussen river. On the basis of the determination of the saprobic index, we conclude that there are no significant water quality deficiencies or water quality problems caused by loads of easily degradable and therefore oxygen-consuming organic matter in the entire investigated section of the Schussen river between Ravensburg and Kressbronn. Directly downstream of the WWTP Langwiese (Site 1b) no significant increasing saprobic index was observed. This means that the microbiological degradable organic fraction will be substantially eliminated by the WWTP. Today, in the Schussen river some species registered in the Red List can be found. These species include stone flies like *Taeniopteryx schoenemundi* and *Perla burmeisteriana*, caddis flies like *Brachycentrus subnubilus*, and day flies like *Heptagenia sulphurea*, all of which are classified as highly endangered. In our studies of the macrozoobenthos, we observed a significant decrease in the number of species and a lower density of individuals downstream of the SOB Mariatal (Site 1a) and downstream of the WWTP Langwiese (Site 1b). In addition to hydraulic pressure, which is caused by combined overflows and storm water discharges, also slightly toxic effects affecting the macrozoobenthos cannot be excluded. Regarding the sensitive taxa within the macrozoobenthos, we determined a slightly decreased abundance downstream of the SOB Mariatal (Site 1a) and a highly decreased abundance downstream

of WWTP Langwiese (Site 1b). The EPT-taxa, which are classified as sensitive to toxic effects, were particularly affected. Beetles of the family of Elmidae, which are sensitive to pollution, were affected as well. Downstream of the WWTP Langwiese (Site 1b), only *Elmis maugetii* and *Limnius volckmari* could be found of the five Elmidae genera and species, represented in the Schussen river. *Esolus parallelepipedus*, *Riolus cupreus*, and *Oulimnius tuberculatus* no longer occurred at this sampling site. At sampling Site 2, about 10 km downstream of the WWTP Langwiese, the macrozoobenthos has largely recovered. Both the species composition and the abundance of sensitive taxa did not show significant deficits compared to the sampling site upstream of the WWTP Langwiese (Site 0). At Site 0 (upstream of the WWTP Langwiese) and Site 3 (far downstream of this WWTP) we did not observe significant differences with respect to saprobic index, abundance, number of taxa and number of sensitive taxa. It seems that WWTP effluent does not affect the composition of macrozoobenthos at this sampling site any more. Nevertheless, we found sub-organismic effects caused by WWTP effluent in gammarids, although sampling Site 3 is far downstream of the WWTP and no effects within the macrozoobenthos community were noticed. The concentration of micropollutants at this site seems to have no effect at the community level as demonstrated by our studies of macrozoobenthos. Effects of micropollutants at this site however were observable at the organism level, as indicated by our investigations with gammarids.

Our results show, that biomarkers are an important instrument for monitoring ecotoxicological effects of micropollutants. In this context, the molecular biomarkers are very sensitive and register changes at the lowest biological level. In addition, biomarkers are able to detect low-level exposure to certain contaminants, e.g. micropollutants (Holdway et al., 1995). Thus they are considered as early warning systems before communities and populations are intensely injured (Bunn, 1995). Moreover, they have the ability to show effects of contaminants in exposed organisms over time. Hence studies using biomarkers are an essential tool in water quality assessment and could prognosticate risks at higher level of biological organization, before populations are massively damaged (Triebkorn et al., 1997).

The results of our study led to the conclusion that both the distribution of macroinvertebrate taxa and the health status of gammarids at several sampling sites are affected by effluents of WWTP Langwiese and SOBs in the Schussen river. In gammarids collected downstream of the WWTP Langwiese we found decreased fecundity, increased hsp70 levels, and significantly shifted sex ratio towards females. The number and abundance of macrozoobenthic species was reduced right downstream of the WWTP Langwiese. In addition, we showed at some sampling sites that effects of micropollutants already occurred in gammarids whereas the macrozoobenthos community seemed to be unaffected. Even though ecotoxicological studies at different levels of organization may reasonably lead to different results and studies at lower organization levels (e.g. our investigations with gammarids) can possibly show effects which cannot be seen at higher organization levels (e.g. our analysis of macrozoobenthos

in the downstream part of the Schussen river), our study revealed considerable anthropogenic impact by SOBs and the WWTP Langwiese. Future investigations after the start-up of an activated charcoal filter at WWTP Langwiese will provide information on the success of the technological improvement at this WWTP with respect to the health of invertebrates.

Acknowledgements:

The authors are grateful to the MTU Umweltstiftung Bodensee for the financial support of the investigations with gammarids. Funding of the project SchussenAktiv: Ministry for Environment, Nature Conservation, and Traffic Baden-Württemberg (UVM), and the foundation „Natur und Umwelt“ of the Landesbank Baden-Württemberg (LBBW). Funding of the project SchussenAktivplus: Federal Ministry for Education and Research (BMBF), cofounded by the Ministry for Environment Baden-Württemberg. Financial contributions to the project: Jedele & Partner GmbH, Ökonsult GbR, city of Ravensburg, AZV Mariatal and AV Unteres Schussental. SchussenAktivplus is connected to the BMBF action plan “Sustainable water management (NaWaM)” and is integrated in the BMBF frame programme “Research for sustainable development FONA”. Contract period: 1/2012 to 12/2014, Funding number: 02WRS1281A. We would also like to thank the co-workers of the Animal Physiological Ecology Group of the University of Tuebingen for their excellent help in the field and their technical assistance: Katja Bader, Andreas Dieterich, Anja Henneberg, Stefanie Kraus, Diana Maier, Carolin Schultz, Simon Schwarz, Krisztina Vincze, and Mara Wolter. Many thanks go also to Jennifer Rose Kielhofer, University of Arizona, for valuable comments on the language of the manuscript.

References:

- Adámek, Z., et al., 2010. Macrozoobenthos response to environmental degradation in a heavily modified stream: Case study the Upper Elbe River, Czech Republic. *Biologia*. 65, 527-536.
- Andersen, H. R., et al., 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44, 56-61.
- Andersen, H. R., et al., 2001. Development of copepod nauplii to copepodites - a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 2821-2829.
- Bell, G., 1982. *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Berkeley.
- Berenzen, N., et al., 2005. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60, 37-46.
- Bollache, L., et al., 2002. Effects of two acanthocephalan parasites on the fecundity and pairing status of female *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Invertebrate Pathology*. 79, 102-110.
- Bonzini, S., et al., 2008. Effects of river pollution on the colonisation of artificial substrates by macrozoobenthos. *Aquatic Toxicology*. 89, 1-10.

- Borowsky, B., 1984. The use of the males' gnathopods during precopulation in some gammaridean amphipods. *Crustaceana*. 47, 245-250.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brauch, H.-J., 2011. Organische Spurenstoffe in Gewässern: Vorkommen und Bewertung. *gwf – Wasser / Abwasser* 12, 1206-1211.
- Brehm, J., Meijering, M.-P., 1996. *Fließgewässerkunde – Einführung in die Ökologie der Quellen, Bäche und Flüsse*. Quelle u. Meyer Verlag, Wiesbaden, DE.
- Bundschuh, M., Schulz, R., 2011a. Ozonation of secondary treated wastewater reduces ecotoxicity to *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda): are loads of (micro)pollutants responsible? *Water Research*. 45, 3999-4007.
- Bundschuh, M., Schulz, R., 2011b. Population response to ozone application in wastewater: an on-site microcosm study with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Ecotoxicology*. 20, 466-73.
- Bunn, S. E., 1995. Biological monitoring of water quality in Australia: Workshop summary and future directions. *Australian Journal of Ecology*. 20, 220-227.
- Bunzel, K., et al., 2013. Effects of organic pollutants from wastewater treatment plants on aquatic invertebrate communities. *Water Research*. 47, 597-606.
- Chessmann, B. C., 1995. Rapid assessment of rivers using macroinvertebrates: A procedure based on habitat-specific sampling, family level identification and a biotic index. *Australian Journal of Ecology*. 20, 122-129.
- Colborn, T., Thayer, K., 2000. Aquatic Ecosystems: Harbingers of Endocrine Disruption. *Ecological Applications*. 10, 949-957.
- Crain, D. A., et al., 1998. Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 446-452.
- Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives* 107 (Suppl.6), 907-938.
- Desbrow, C., et al., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*. 32, 1549-1558.
- Eckwert, H., et al., 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology*. 6, 259-262.
- Gagné, F., et al., 2005. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research*. 98, 89-99.
- Götz, C. W., et al., Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU. Eawag, Dübendorf, 2010.
- Gross, M. Y., et al., 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 1792-1797.
- Holdway, D. A., et al., 1995. Short review of selected fish biomarkers of xenobiotic exposure with an example using fish hepatic mixed-function oxidase. *Australian Journal of Ecology*. 20, 34-44.
- Jubeaux, G., et al., 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology*. 112-113, 72-82.

- Ladewig, V., et al., 2006. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50, 370-83.
- Langmaier, S., et al., 2006. Ökologische Daten zum Vorkommen von Steinfliegen-Larven (Insecta: Plecoptera) im Bundesland Salzburg, Österreich. *Mitteilungen Haus der Natur*. 17, 76-82.
- Lewis, S., et al., 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of Detection and Their Use as an Environmental Biomarker. *Ecotoxicology*. 8, 351-368.
- LUBW, 2010. Schussenprogramm 2008 - Erfolgskontrolle und Maßnahmeoptimierung. . LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- Marcogliese, D. J., 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal of Parasitology*. 35, 705-16.
- Mazurová, E., et al., 2010. Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and in vitro effects. *Journal of Soils and Sediments*. 10, 423-433.
- McCahon, C. P., Pascoe, D., 1988. Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere*. 17, 2471-2480.
- Meier, C., et al., 2006. Kurzdarstellungen, Bewertung Macrozoobenthos und Core Metrics. www.fliessgewaesserbewertung.de.
- Meijering, M. P. D., Pieper, H. G., 1982. Die Indikatorbedeutung der Gattung *Gammarus* in Fließgewässern. *Decheniana – Beihefte* 26, 111-113.
- Morley, N. J., et al., 2010. Effects of a chemically polluted discharge on the relationship between fecundity and parasitic infections in the chub (*Leuciscus cephalus*) from a river in southern England. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 783-92.
- Ofenböck, T., et al., 2010. Leitfaden zur Erhebung der biologischen Qualitätselemente - Teil A2 - Makrozoobenthos. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft.
- Pascoe, D., et al., 2002. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43, 56-63.
- Pöckl, M., 1993. Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flußflohkrebses (*Gammarus roeselii*), Entwicklungszyklus und Fortpflanzungskapazität. *Natur und Museum* 123, 114-125.
- Richardson, K. C., et al., 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology*. 35, 313-323.
- Rosenberg, D. M., Resh, V. H., 1993. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York.
- Sanders, B. M., 1993. Stress Proteins in Aquatic Organisms: An Environmental Perspective. *Critical Reviews in Toxicology*. 23, 49-75.
- Schill, R. O., et al., 2002a. Stress response of the amphipod, *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) to cadmium, and recovery. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*. 32.
- Schill, R. O., et al., 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *BioMetals*. 16, 391-401.
- Schill, R. O., Köhler, H.-R., 2004a. Does the environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*? *Ecotoxicology*. 13, 683-695.

- Schill, R. O., et al., 2002b. Variation in the sensitivity of different freshwater amphipod populations (*Gammarus fossarum* Koch, 1835) to different polluted stream water. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*. 32.
- Schirling, M., et al., 2006. Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*. 15, 143-56.
- Schirling, M., et al., 2005. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 49, 53-61.
- Schirling, M., et al., 2004b. Variation in stress protein levels (hsp70 and hsp90) in relation to oocyte development in *Gammarus fossarum* (Koch 1835). *Invertebrate Reproduction & Development*. 45, 161-167.
- Schwab, H., 1993. Süßwassertiere. Ein ökologisches Bestimmungsbuch - Zahlreiche, meist farbige Abbildungen, Zeichnungen und Tabellen. Ernst Klett Verlag, Stuttgart.
- Schwarzenbach, R. P., et al., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313, 1072-1077.
- Schwoerbel, J., 1999. Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Seel, P., et al., 1996. Kläranlagen als Haupteintragspfad für Pflanzenschutzmittel in ein Fließgewässer: Bilanzierung der Einträge. *Vom Wasser* 86, 247-262.
- Sures, B., 2008. Host-parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology*. 73, 2133-2142.
- Sures, B., Radszweit, H., 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *J Helminthol*. 81, 191-7.
- Sures, B., et al., 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitology Today*. 15, 16-21.
- Sutcliffe, D. W., 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes. *Freshwater Forum*. 2, 102-128.
- Triebskorn, R., et al., 2003. Establishing Causality between Pollution and Effects at Different Levels of Biological Organization: The VALIMAR Project. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 9, 171-194.
- Triebskorn, R., et al., 2013b. SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe*. 25, 1-9.
- Triebskorn, R., et al., 2013a. SchussenAktiv - Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. *Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. Korrespondenz Wasserwirtschaft*. 6, 427-436.
- Triebskorn, R., et al., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6, 57-73.
- Triebskorn, R., et al., 2008. Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*. 141, 177-88.
- Van Valen, L., 1973. „A New Evolutionary Law“. *Evolutionary Theory* 1, 1-30.
- Vos, J. G., et al., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*. 30, 71-133.

- Watts, M. M., et al., 2001. Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A - Effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquatic Toxicology*. 55, 113–126.
- Watts, M. M., et al., 2002. Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 445-450.
- Welton, J. S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biology*. 9, 263-275.
- Westheide, W., Rieger, R., 2004. Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Spektrum Akademischer Verlag München.
- WFD, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*. L 327/1 - L 372/72.
- Whitehurst, I. T., 1991. The *Gammarus*–*Asellus* ratio as an index of organic pollution. *Water Research*. 25, 333–340.
- Williams, K. A., et al., 1984. Toxicity testing with freshwater macroinvertebrates: Methods and application in environmental management. Pergamon Press, New York, US

Kapitel 4: Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe

Katharina Peschke^{a,#}, Janne Burmester^a, Markus Hermann^a, Heinz-R. Köhler^a, Katharina Reitter^a, Marco Scheurer^b, Karl Wurm^c und Rita Triebkorn^{a,d}

^a Institut für Evolution und Ökologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen

^b DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Karlsruher Straße 84, 76139 Karlsruhe

^c GÖL Gewässerökologisches Labor Starzach, Tulpenstraße 4, 72181 Starzach

^d Steinbeis Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie, Blumenstraße 13, 72108 Rottenburg

Korrespondenz-Autor: katharina.peschke@uni-tuebingen.de

gwf - Wasser/Abwasser 157(4): 370-379

Die vorgestellte Arbeit ist Teil des BMBF-Verbundprojekts „SchussenAktivplus“, das an den Bodenseezuflüssen Schussen und Argen durchgeführt wird. Die Kläranlage (KA) Langwiese bei Ravensburg, welche in die Schussen einleitet, wurde im Winter 2013 mit einer Pulveraktivkohlestufe aufgerüstet. Im hier vorgestellten Teil des Projektes wurde der Gesundheitszustand von Flohkrebse (*Gammarus spec.*) und die Integrität der Makrozoobenthosgemeinschaft an Probestellen ober- und unterhalb der KA sowie vor und nach Ausbau der KA untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Ausbau der KA mit einer Pulveraktivkohlestufe bereits 15 Monate nach Einbau positiv auf den Gesundheitszustand von Flohkrebse und die Artengemeinschaft des Makrozoobenthos auswirkt.

1. Einleitung

Spurenstoffe wie Pflanzenschutzmittel, Pharmazeutika, Haushalts- und Industriechemikalien, Komplexbildner, Metalle, perfluorierte Tenside und Flammschutzmittel [1, 2] gelangen über verschiedenste Eintragspfade in Gewässer und können diese kurz- oder langfristig negativ beeinflussen [3]. Im Oberflächenwasser liegen in Konzentrationsbereichen von ng/L bis µg/L vor [1, 2, 3, 4] und können bereits in diesen niedrigen Konzentrationen zu negativen Auswirkungen auf exponierte Organismen führen [1, 5, 6, 7]. Herkömmliche Kläranlagen sind zumeist auf die Eliminierung von Nährstoffen (Phosphat- und Nitratverbindungen) ausgelegt. In konventionellen kommunalen Kläranlagen können daher viele Mikroschadstoffe nicht oder nur teilweise eliminiert werden und gelangen mit dem gereinigten Abwasser in die Oberflächengewässer [8, 9, 10]. Die Zuschaltung einer vierten Reinigungsstufe kann den Wirkungsgrad kommunaler Kläranlagen verbessern. Eine substanz-

spezifische Elimination von z.B. hormonell wirksamen Stoffen wird beispielsweise durch eine Ozonierungsstufe erreicht [11, 12].

2. SchussenAktivplus

Die hier vorgestellten Untersuchungen sind Teil des von der Universität Tübingen koordinierten BMBF-Verbundprojekts „SchussenAktivplus: Reduktion von Mikroverunreinigungen und Keimen durch weitergehende Behandlung von Kläranlagenabläufen und Mischwasser aus Regenüberlaufbecken verschiedener Größe zur weiteren Verbesserung der Gewässerqualität des Bodenseezuflusses Schussen“. Das Projekt ist eines der im Rahmen der BMBF Fördermaßnahme RiSKWa (Risikomanagement von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf) unter dem Förderkennzeichen FKZ 02WRS1281A-L finanzierten Projekte. Die Schussen, namensgebend für das Forschungsprojekt, ist ein bedeutender Bodenseezufluss, in dessen mit 11% Siedlungsfläche dicht besiedeltem Einzugsgebiet das Projekt durchgeführt wird. Die Siedlungsentwässerung erfolgt über 19 kommunale Kläranlagen. Im Naturschutzgebiet „Eriskircher Ried“, welches ein bedeutendes Schutzgut darstellt, mündet die Schussen in den Bodensee. Als Trinkwasserreservoir und Naherholungsgebiet spielt der Bodensee eine wichtige Rolle. Infolgedessen ist die Spurenstoff- und Keimbelastung in der Schussen von großer Bedeutung für den Schutz des Ökosystems und der menschlichen Gesundheit.

Am Forschungsprojekt SchussenAktivplus sind 21 Partner/innen aus Wissenschaft, freier Wirtschaft und öffentlicher Hand beteiligt, welche anhand vielfältiger Methoden neuartige Technologien in Hinblick auf deren Effizienz zur Abwasser- und Mischwasserreinigung untersuchten. In fünf unterschiedlichen Versuchsanlagen wurde die Eignung verschiedener zur Reinigung von Abwasser und Mischwasserentlastungen (Ozonierung, granuliert Aktivkohle, Pulveraktivkohle, Sandfiltration, Retentionsbodenfilter, Lamellenklärer) zur Reduktion von Spurenstoffen, von nicht-resistenten und resistenten Keimen sowie toxischen und hormonellen Wirkpotentialen in Ab- und Mischwasserproben, Oberflächenwasser und Sedimenten beurteilt. Begleitend zum Ausbau der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg mit einer Pulveraktivkohlestufe wurde untersucht, ob sich der Gesundheitszustand von Fischnährtieren und Fischen in der Schussen durch den Einsatz der vierten Reinigungsstufe verbessert. Die uni- und multivariate Analyse der Ergebnisse sowie eine Kosten-Nutzenabschätzung der möglichen Belastungsminderung stellt ein weiteres Projektziel dar.

An der Schussenmündung bot die Kläranlage Eriskirch als Versuchskläranlage die Möglichkeit, Wasserproben der einzelnen Behandlungsschritte (Ozonierung; Ozonierung mit nachgeschalteter Sandfiltration; Ozonierung mit nachgeschalteter granuliert Aktivkohle; reine granuliert Aktivkohle; Ozonierung mit nachgeschalteter granulierter Aktivkohle und Sandfiltration) zu analysieren, um die Effektivität der jeweiligen Reinigungsschritte zu bewerten. Einerseits wurde gezeigt, welche Belastungen vorhanden sind: Hierzu wurden Spurenstoffe sowie die Menge nicht-resistenter und

resistenter Keime in Wasserproben bestimmt. Andererseits wurden in parallel entnommenen Wasserproben toxische und hormonelle Effektpotentiale auf verschiedenen biologischen Organisationsebenen nachgewiesen.

Als Erfolgskontrolle des Ausbaus der Kläranlage Langwiese, AZV Mariatal, Ravensburg, wurden auch im Freiland, direkt im Ökosystem, Untersuchungen durchgeführt. Die Kläranlage Langwiese ist mit 170.000 Einwohnerwerten das größte Klärwerk im nördlichen Einzugsgebiet. Im Herbst 2013 wurde hier als vierte Reinigungsstufe eine Pulveraktivkohlestufe in Betrieb genommen.

Anhand einer Effekt-bezogenen "Vorher-Nachher-Studie" wurde überprüft, ob sich die Verminderung an Spurenstoffen durch Pulveraktivkohle in einer Verbesserung des Gesundheitszustandes von Fischen in der Schussen widerspiegelt. Um genaue Aussagen über Ursachen und Wirkungen bei den zu untersuchenden Organismen treffen zu können, wurde ein zeitlicher (vor und nach Ausbau der Kläranlage) und räumlicher (oberhalb und unterhalb der Kläranlage) Gradient untersucht. Die Fische (Schneider und Döbel) wurden zum einen über passives Monitoring (Befischung) direkt dem Gewässer entnommen, zum anderen konnten Tiere (Regenbogen- und Bachforellen) in Durchflussequarien (Bypass) und Käfigen im Gewässer direkt exponiert werden (Aktives Monitoring). Als Referenzgewässer, in dem deutlich weniger Spurenstoffe nachgewiesen werden konnten [13], diente die Argen. Um ein ganzheitliches Bild zu erlangen, wurden auch im Freiland Wasser- und Sedimentproben ober- und unterhalb der Kläranlage entnommen und auf Spurenstoffe und (resistente) Indikatorbakterien hin untersucht. Parallel wurden auch mit diesen Proben Wirkpotentialtests durchgeführt. Als Kernbotschaften lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1. Die vierte Reinigungsstufe in Kläranlagen und der untersuchte Retentionsbodenfilter bei der Regenwasserbehandlung vermindern Spurenstoffe, Keime und toxische bzw. hormonelle Wirkpotentiale im Abwasser deutlich, wobei Spurenstoffe stoffspezifisch zwischen 80 und 90 Prozent, Keime um zwei bis drei Zehnerpotenzen von den einzelnen Technologien reduziert werden. Am effizientesten ist die Kombination von Ozon und einer nachgeschalteten Filtration über granulierten Aktivkohle (GAK). Die Anwendung pulverisierter Aktivkohle (PAK) in einer eigenständigen Adsorptionsstufe mit nachfolgender Flockungsfiltration ist ebenfalls sehr gut geeignet. Die Reinigungsleistung des Retentionsbodenfilters entspricht derjenigen einer biologischen Stufe in kommunalen Kläranlagen.
2. Alle untersuchten Reinigungstechniken haben Vor- und Nachteile. Welche Technologie vor Ort die beste Lösung ist, muss im Einzelfall unter den gegebenen spezifischen Bedingungen abgeklärt werden. Kombinationen mit Ozon reduzieren Stoffkonzentrationen, z.B. von Carbamazepin und Diclofenac deutlich sowie resistente und nicht-resistente Indikatorkeime um mehr als drei

Zehnerpotenzen. Für Keime kann dadurch der Badegewässergrenzwert, für Diclofenac die anvisierte UQN unterschritten werden. Bei der Ozonanwendung können jedoch Transformationsprodukte gebildet werden, die eine biologisch aktive Nachreinigung erfordern (Filtration, GAK Filtration). Die desinfizierende Wirkung des Ozons ist offenbar bei den resistenten Keimen nicht so effektiv. Da die Anwendung von Ozon die Anzahl von Keimen jedoch wesentlich besser eliminiert als Pulveraktivkohle, empfiehlt sich der Einsatz von Ozon bei Badegewässern, die durch Kläranlagenabläufe beeinflusst werden. Durch Pulveraktivkohle in Kombination mit einem Sandfilter werden Stoffe wie Benzotriazol oder Metoprolol sehr effektiv eliminiert, Enterokokken lassen sich unter den Grenzwert der Badegewässerrichtlinie reduzieren. Beim Einsatz dieser Technologie ist die Verfügbarkeit und die Qualität der Kohle ein Kriterium, das mit zu beachten ist. Allerdings sind Risiken die, wie bei der Ozonierung, mit der Bildung von Transformationsprodukten verbunden sind, auszuschließen.

3. Der Aufwand für zusätzliche Reinigungsstufen in Kläranlagen führt zu einer moderaten finanziellen Belastung (etwa zehn Euro Mehrkosten pro Jahr) des einzelnen Bürgers.
4. Die Pulveraktivkohlestufe in der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg zeigte bereits nach kurzer Zeit positive Auswirkungen auf das Ökosystem der Schussen. Nach einjährigem Betrieb der PAK-Stufe ließen sich Verbesserungen im Gesundheitszustand der Gewässerorganismen plausibel mit dem Ausbau der Kläranlage korrelieren. Bei Fischen traten weniger Gewebeschäden, weniger gentoxische Effekte und eine geringere Aktivität von Entgiftungsenzymen auf. Zudem erhöhte sich der Schlupferfolg von Forellenlarven. Dagegen sank die Mortalität von Eiern und Larven.

Auch bei wirbellosen Tieren war ein deutlicher Erfolg des Ausbaus der Kläranlage zu beobachten. In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse zum Gesundheitszustand von Flohkrebse (Gammariden) und zu Güteindices basierend auf der Zusammensetzung der Makrozoobenthosgemeinschaft (alle wirbellosen Gewässerorganismen, die sich am Gewässergrund oder an der Gewässervegetation aufhalten und mit bloßem Auge erkennbar sind) in Schussen und Argen vorgestellt.

3. Probenahmen

Zum Nachweis toxischer und hormoneller Wirkungen in Flohkrebse sowie der Erfassung der Makrozoobenthosgemeinschaft wurden an Probestellen an der Schussen, ober- und unterhalb der Kläranlage Langwiese bei Ravensburg sowie an Probestellen an der Argen (Abb. 1) in regelmäßigen Abständen Proben entnommen (Tab. 1). Die Untersuchungen nach Ausbau der Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe laufen weiterhin und die hier vorgestellten Ergebnisse der Untersuchungen zum

Untersuchungszeitraum nach Ausbau der Kläranlage beinhalten die Probenahmen aus Frühling, Sommer und Herbst 2014 sowie aus Frühling 2015.

Tabelle 1: Angaben zur Probenahme von Gammariden und Makrozoobenthos. Zeitpunkte, entnommene Organismen und Wasserstand für den Untersuchungszeitraum vor (2010–2013) und nach (2014–2015) Ausbau der Kläranlage. KA = Kläranlage, MZB = Makrozoobenthos, MW = Mittelwasser, NW = Niedrigwasser, HW = Hochwasser

	Jahreszeit	Datum	Entnahme von	Wasserstand	
Vor Ausbau KA	2010	Frühling	19. April	Gammariden	MW
		Sommer	29. Juni	Gammariden	HW
			19. August	Gammariden	NW
		Herbst	13. Oktober	Gammariden	MW
	2011	Frühling	9. Mai	Gammariden	NW
		Sommer	7. Juli	Gammariden	NW
		Herbst	2. September	Gammariden	MW
			28. Oktober	Gammariden	MW
	2012	Frühling	3. Mai	Gammariden	NW
			29. April	MZB	NW
		Sommer	4. Juli	Gammariden	MW
		Herbst	6. Oktober	MZB	MW
	24. Oktober		Gammariden	MW	
	2013	Frühling	20. Mai	MZB	MW
Herbst		9. Oktober	MZB	MW	
Nach Ausbau KA	2014	Frühling	11. April	MZB	MW
			21. Mai	Gammariden	MW
	Sommer	1. Juli	Gammariden	MW	
	Herbst	2. Oktober	Gammariden	MW	
		4. Oktober	MZB	MW	
	2015	Frühling	30. Mai	Gammariden	HW

4. Mikroschadstoffmonitoring mit Vertretern der Gattung *Gammarus*

Da Populationen von Gammariden oft enorme Individuenzahlen erreichen, bilden sie vor allem für Fische eine bedeutende Nahrungsquelle [14]. Aufgrund ihrer bedeutenden Stellung in limnischen Nahrungsnetzen, ihrer hohen Biomasse und ihrer weiten natürlichen Verbreitung stellen Gammariden bedeutende Stellvertreter der Invertebratenfauna eines Fließgewässers dar [6]. Als Monitororganismen sind sie hervorragend geeignet, da durch ihre weite Verbreitung und große Individuenzahl eine Entnahme größerer Stichproben als ökologisch unproblematisch anzusehen ist [15]. Zudem reagieren Flohkrebse sehr sensibel auf Beeinträchtigungen der Gewässergüte und gewässerbauliche Maßnahmen sowie auf verschiedene Umweltstressoren [16, 17] und zeichnen sich mit einer hohen Sensitivität gegenüber Schadstoffen aus [14]. Wegen ihrer relativ kurzen Generationszeit und der hohen Reproduktionsrate sind Gammariden außerdem für chronische Tests und Untersuchungen auf Populationsebene geeignet [18].

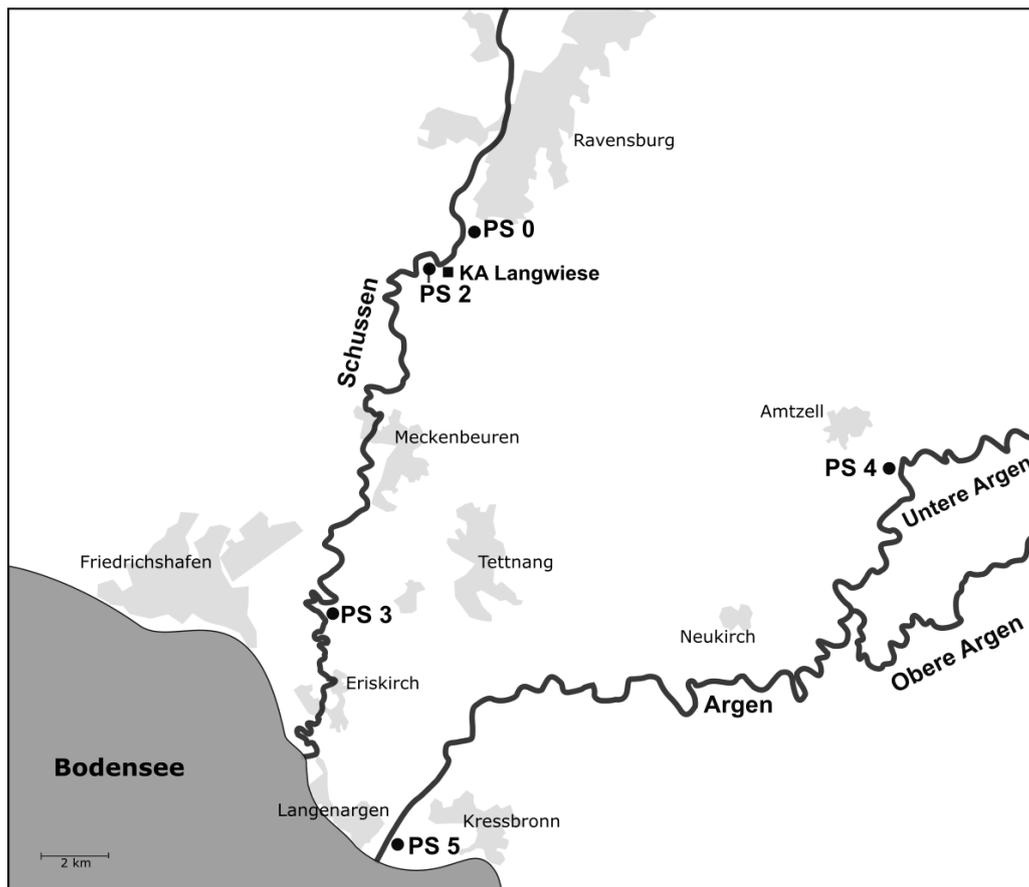


Bild 1: Probestellen an Schussen und Argen, an denen Invertebraten untersucht wurden. PS 0 = Probestelle 2,5 km oberhalb der Kläranlage (KA) Langwiese (N47°45'29,59", O9°35'22,88"), PS 2 = Probestelle 850 m unterhalb der KA Langwiese (N47°44'42,27", O9°33'45,04"), PS 3 = Probestelle 15 km unterhalb der Kläranlage Langwiese (N47°39'16,20", O9°31'52,93"), PS 4 (N47°44'20,46", O9°53'42,78") und PS 5 (N47°36'09,71", O9°34'01,91") = Probestellen am Referenzgewässer Argen. Gammariden wurden an den Probestellen PS 0, PS 3 und PS 5 entnommen. Ergebnisse der Untersuchung der Makrozoobenthosgemeinschaft werden im Folgenden für die Probestellen PS 0, PS 2 und PS 4 vorgestellt. KA = Kläranlage, PS = Probestelle. Karte: © OpenStreetMap contributors, licence: <http://opendata-commons.org/licences/dbcl/1.0/>

Um die Auswirkungen von über eine Kläranlage ins Gewässer eingetragenen Spurenstoffen auf den Gesundheitszustand von Invertebraten nachzuweisen, wurde an den Bodenseezuflüssen Schussen und Argen ein Effektmonitoring mit Flohkrebse (Gattung *Gammarus*) durchgeführt. Hierzu wurden in der Schussen ober- und unterhalb der Kläranlage sowie vor und nach Ausbau der Anlage mit einer Pulveraktivkohlestufe Proben entnommen. Eine Untersuchungsstelle an der Argen ermöglicht den Vergleich mit einem weniger belasteten Gewässer. An allen Probestellen wurden populationsökologische und biochemische Untersuchungen mit Gammariden durchgeführt. In den Tieren wurden zusätzlich ausgewählte Spurenstoffe nachgewiesen. Vor Ausbau der Kläranlage wurden in Gammariden unterhalb der Kläranlage höhere Konzentrationen an perfluorierten Tensiden und polybromierten Diphenylethern nachgewiesen als in Gammariden an Probestelle 0, oberhalb der Kläranlage. Hinsichtlich aller anderen ermittelten Spurenstoffe, beispielsweise Arzneimittel, Süßstoffe und Schwermetalle, konnten keine Unterschiede zwischen den Probestellen ober- und unterhalb der

Kläranlage festgestellt werden. Alle ausgewählten Spurenstoffe waren allerdings in Gammariden an allen Probestellen an Schussen und Argen nachweisbar. Die chemische Analytik der Spurenstoffe in Gammariden zum Zeitpunkt nach Ausbau der Kläranlage dauert noch an, und Ergebnisse liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Untersuchungen des Geschlechterverhältnisses und der Fekundität der Weibchen zeigten die Auswirkungen östrogen wirksamer und allgemein toxischer Substanzen auf die Flohkrebpopulationen. Ergebnisse zur Induktion von Hitzeschockproteinen (Hsp70) lassen Rückschlüsse auf den allgemeinen Stresszustand des Testorganismus zu.

Durch diese Kombination mehrerer chemisch-analytischer und ökotoxikologischer Untersuchungsmethoden ist es möglich, eine Aussage über den Belastungszustand des Untersuchungsgewässers vor und nach dem Kläranlagenausbau zu treffen, und die Auswirkung der Pulveraktivkohlestufe auf die in der Schussen lebenden Fischnährtiere abzuschätzen.

4.1 Stressproteinanalyse Hsp70

Biochemische Biomarker sind sehr sensitiv und integrieren Schadstoffeinflüsse über relativ kurze Zeiträume (Stunden bis Tage). Sie eignen sich insbesondere zum Nachweis geringerer, chronischer Belastungen, welche permanent vorhanden sind [1, 2].

Fast alle Organismen, vom Bakterium bis zum Menschen, sind in der Lage auf einen Stressor, wie beispielsweise eine Temperaturerhöhung, mit vermehrter Bildung sogenannter Hitzeschockproteinen (heat-shock proteins, Hsp70) zu reagieren. Tritt eine Stresssituation auf (z.B. Temperaturbelastung, Schwermetallbelastung, toxische Substanzen, UV-Strahlung und Sauerstoffmangel), die Proteinschädigungen zur Folge hat, werden Stressproteine induziert, binden an falsch gefaltete Proteine, und es findet eine erneute gezielte Faltung statt [19, 20]. Eine Erhöhung des Hsp70-Levels lässt somit einen Rückschluss auch auf Schadstoffbelastung zu. Zur Ermittlung des Stressproteinlevels der einzelnen Flohkrebse wurden an jeder Probestelle 20 Präkopula-Paare (bestehend aus einem Weibchen und einem Männchen) gesammelt. Hierdurch wurde sichergestellt, dass sich alle zu untersuchenden Individuen im gleichen Entwicklungsstadium befanden und sich dadurch nicht in ihrem entwicklungsbedingten Stressprotein-Grundlevel voneinander unterscheiden. In der Schussen treten Mischpopulationen aus *Gammarus pulex* und *Gammarus roeseli* auf. Da die Verteilung der zwei Arten an den verschiedenen Probestellen der Schussen jedoch sehr variiert (PS 0: *G. pulex* 29%, *G. roeseli* 71%; PS 3: *G. pulex* 91%, *G. roeseli* 9%) und an der Argen nur *G. pulex* vorkommt, wurden in allen hier vorgestellten Untersuchungen die Analysen beide Arten zusammengeführt, um die Probestellen miteinander vergleichen zu können. Vor Ort wurde jedes Individuum einzeln in flüssigem Stickstoff (-183 °C) schockgefroren. Zur quantitativen Bestimmung der Stressproteinlevel wurde nach

der in Peschke et al. [21] beschriebenen Methode vorgegangen. Durch den Vergleich mit einem bei jedem Assay parallel analysierten Standard konnte der Hsp70-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt werden.

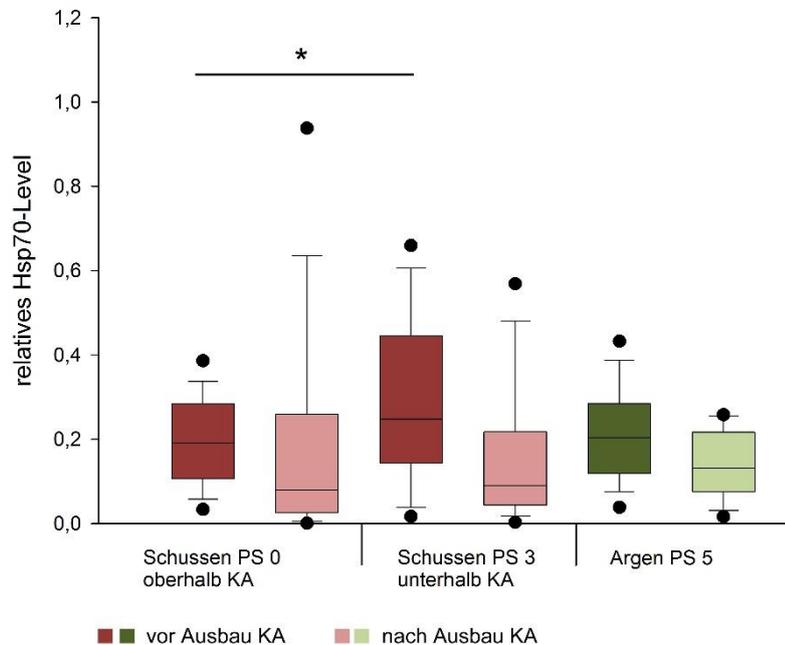


Bild 2: Relatives Hsp70-Level in Gammariden im Frühling an Probestellen ober- (PS 0) und unterhalb (PS 3) der Kläranlage (KA) Langwiese sowie am Referenzgewässer Argen (PS 5) zu Zeitpunkten vor (2010–2012) und nach (2014–2015) dem Ausbau der Kläranlage Langwiese. KA = Kläranlage, PS = Probestelle. Darstellung in Box-Whisker-Plots mit Median, obere und untere Quartile sowie obere und untere Whisker. Innerhalb der Whiskergrenzen liegen 95 % der Daten, Ausreißer sind durch einen schwarzen Punkt dargestellt. Signifikanz: $p < 0,008$

Anhand der Stressproteinanalyse in Gammariden konnten bereits positive Auswirkungen der Pulveraktivkohlestufe nachgewiesen werden. Zur besseren Veranschaulichung sind in Abb. 2 die Ergebnisse der Stressproteinanalyse in Gammariden im Frühling vor und nach Ausbau der Kläranlage dargestellt. Diese ergab zu Beprobungszeitpunkten im Frühling vor Ausbau der Kläranlage Langwiese einen signifikant höheren Stressproteinlevel in Individuen unterhalb der Kläranlage im Vergleich zur Probestelle oberhalb der Kläranlage Langwiese. Dies deutet auf das Vorkommen von Substanzen mit proteotoxischer Wirkung unterhalb der Kläranlage zu Zeitpunkten vor Ausbau der Kläranlage hin. Im Beprobungszeitraum im Frühling nach Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe war der Hsp70-Level in Individuen unterhalb der Kläranlage nicht mehr signifikant erhöht, was auf eine Reduktion ebenjener proteotoxischer Substanzen durch die Pulveraktivkohlestufe hindeutet.

4.2 Geschlechterverhältnis

Anhand von Laborstudien mit Flohkrebpopulationen konnten Watts et al. [22] nachweisen, dass sich das Geschlechterverhältnis von *Gammarus pulex* unter dem Einfluss von 17α -Ethinylöstradiol

zugunsten der Weibchen verschiebt. Die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses scheint somit eine gute Methode zu sein, um in Fließgewässern mögliche östrogene Potentiale nachzuweisen [1, 2]. Zur Bestimmung des Geschlechterverhältnisses wurden an jeder Probestelle 100 Gammariden randomisiert gesammelt, in 2% Glutaraldehyd (gelöst in 0,005 M Cacodylatpuffer, pH 7,4) fixiert und bis zur weiteren Verwendung gekühlt aufbewahrt. Im Labor wurden nach der Vermessung der einzelnen Individuen die Art und das Geschlecht bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen ermittelt. Männchen sind an zwei Penispapillen am siebten Peraeon-Segment erkennbar (Abb. 3A). Weibliche Flohkrebse weisen am ersten bis vierten Peraeon-Segment vier Paar Brutlamellen (Oostegite) (Abb. 3B) auf. Intersex-Individuen sind durch das Auftreten beider äußerer Geschlechtsmerkmale bestimmbar. Erst nach etwa 9-10 Häutungen (bei einer Körperlänge zwischen 6 und 9 mm) erreichen die Gammariden ihre Geschlechtsreife [15]. Davor können die Flohkrebse nur als juvenil bestimmt werden, da die äußeren Geschlechtsorgane noch nicht ausgeprägt sind.

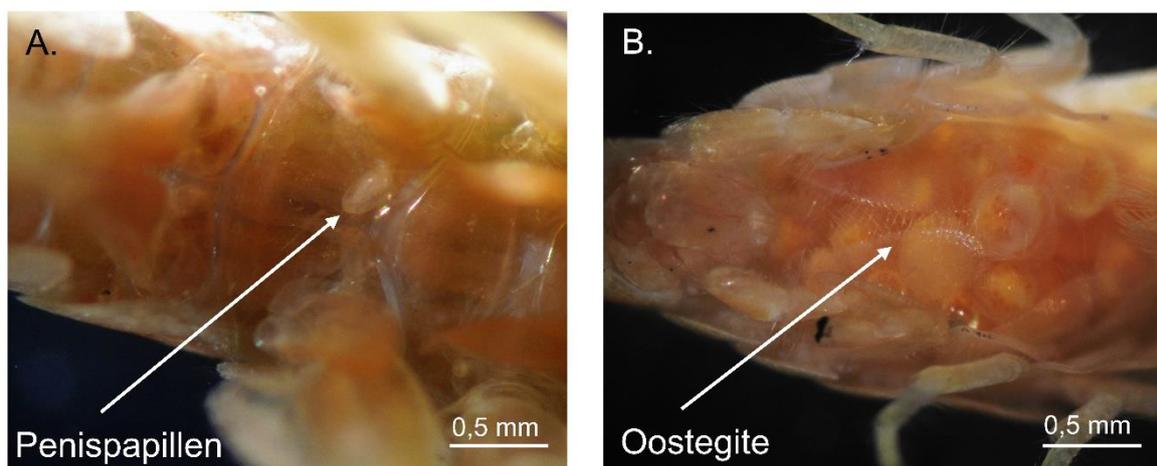


Bild 3: Äußere Geschlechtsmerkmale von *Gammarus pulex*. A: Männchen mit Penisapillen. B: Weibchen mit Oostegite (Brutlamellen) und mit Eiern gefülltes Marsupium (Brutraum).

Das Geschlechterverhältnis in Gammaridenpopulationen kann auch unter normalen Bedingungen, also in eher unbelasteten Flüssen, von einer 1:1 Verteilung der Männchen zu Weibchen, abweichen. Untersuchungen von Ladewig et al. [5] zeigten, dass das Verhältnis von Männchen zu Weibchen bei Gammariden in einem geringfügig belasteten Fluss 1:1,5 betrug. Basierend auf diesen Ergebnissen kann eine signifikante Abweichung des Verhältnisses von Männchen zu Weibchen von 1:1,5 auf Effekte, die durch den Einleiter der Kläranlage Langwiese verursacht werden, hindeuten.

Innerhalb des Untersuchungszeitraumes war das Geschlechterverhältnis, egal an welcher Probestelle, nie signifikant zugunsten der Männchen verschoben (Tab.2). Unterhalb der Kläranlage Langwiese war

das Geschlechterverhältnis vor Inbetriebnahme der Pulveraktivkohlestufe im Frühling und Sommer signifikant zugunsten der Weibchen verschoben. Dies deutet auf mögliche hormonell wirksame Substanzen flussabwärts des Kläranlageneinleiters hin. Untersuchungen nach Ausbau der Kläranlage zeigten unterhalb der Kläranlage nur noch im Frühling eine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Weibchen. Möglicherweise wirken sich Pestizide, die im Frühjahr verstärkt eingesetzt werden und auch hormonell wirken können, auf das Geschlechterverhältnis aus.

Tabelle 2: Geschlechterverhältnis bei Gammariden im Frühling, Sommer und Herbst ober- und unterhalb der Kläranlage (KA) Langwiese, zu Zeitpunkten vor (2010–2012) und nach Ausbau (2014–2015) der KA. Signifikante Abweichungen von einer hypothetischen 1 : 1,5 Verteilung zugunsten der Weibchen. Maximum Likelihood Ratio: *** - $p \leq 0,001$

		Vor Ausbau	Nach Ausbau
Frühling	Oberhalb KA	1:1,23	1:1,45
	Unterhalb KA	1:2,57 ***	1:3,17 ***
Sommer	Oberhalb KA	1:1,79	1:1,56
	Unterhalb KA	1:2,42 ***	1:1,79
Herbst	Oberhalb KA	1:1,18	1:0,85
	Unterhalb KA	1:1,40	1:0,69

4.3 Fekundität

Veröffentlichte Daten unterschiedlichster Studien zu den Effekten von Östrogenen und Xenoöstrogenen auf die Reproduktion von Flohkrebse werden noch kontrovers diskutiert. Watts et al. [22] zeigten im Labor eine positive Wirkung von 17α -Ethinylöstradiol auf die Reproduktionsleistung von *Gammarus pulex*. Dagegen bestärkten die Ergebnisse weiterer Studien [5, 23] vor allem im Freiland die Annahme, dass der Fekunditätsindex in Gammariden eher von einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Faktoren bestimmt wird.

Zur Bestimmung der Fekundität wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen an jeder Probestelle 20 brütende Weibchen dem Gewässer entnommen und einzeln in 2% Glutardialdehyd (gelöst in 0,005 M Cacodylatpuffer, pH 7,4) fixiert. Im Labor wurde die Länge und Art eines jeden Weibchens ermittelt. Als Maß für die Fekundität wurde die Anzahl der im Marsupium eines brütenden Weibchens vorhandenen Eier und/oder Jungtiere verwendet. Unter einem Stereomikroskop wurde das Marsupium der brütenden Weibchen vorsichtig mit einer Federstahlpinzette geöffnet. Eier und Jungtiere wurden herauspräpariert und gezählt. Anschließend wurde der Fekunditätsindex (FI) berechnet (FI = Anzahl Eier bzw. Juvenile / Körperlänge).

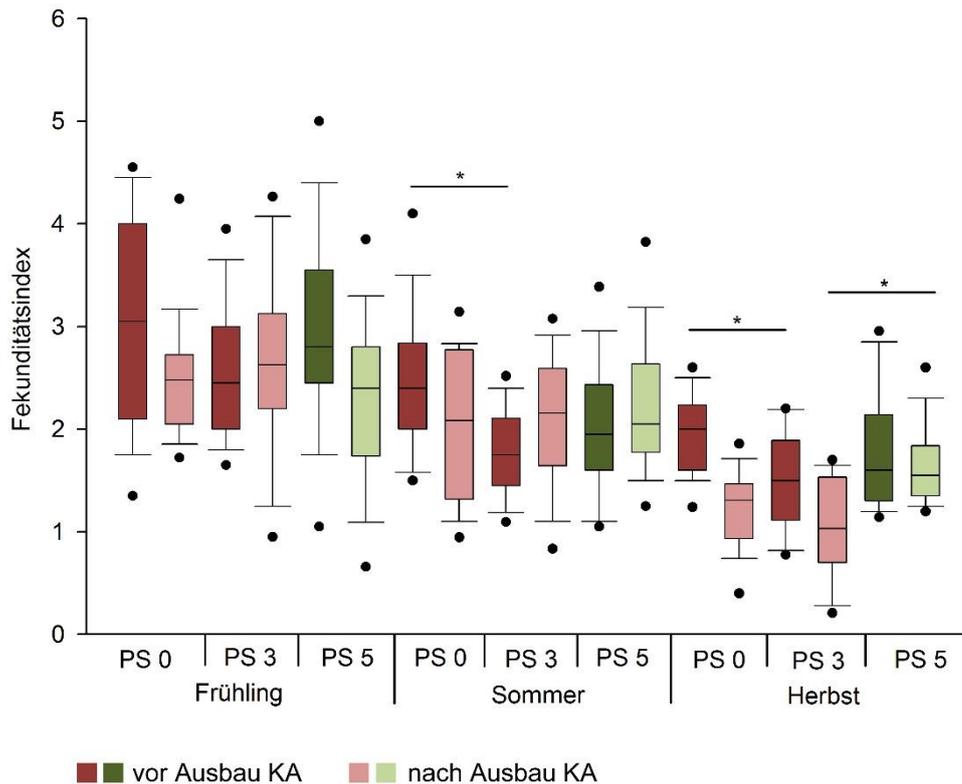


Bild 4: Fekunditätsindex brütender Weibchen im Frühling, Sommer und Herbst an den Probestellen ober- (PS 0) und unterhalb (PS 3) der Kläranlage (KA) Langwiese an der Schussen sowie am Referenzgewässer Argen (PS 5), zu Zeitpunkten vor (2010–2012) und nach Ausbau (2014–2015) der Kläranlage Langwiese. KA = Kläranlage, PS = Probestelle. Darstellung in Box-Whisker-Plots mit Median, obere und untere Quartile sowie obere und untere Whisker. Innerhalb der Whiskergrenzen liegen 95 % der Daten, Ausreißer sind durch einen schwarzen Punkt dargestellt. Signifikanz: $p < 0,0008$ (*)

Die Ergebnisse deuten auf einen Trend zu abnehmender Fekundität von Frühjahr zu Sommer hin (Abb. 4). Dies entspricht dem natürlichen Reproduktionszyklus und wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [5, 15]. Der Fekunditätsindex brütender Weibchen in den Sommermonaten vor Ausbau der Kläranlage war unterhalb der Kläranlage Langwiese signifikant niedriger als oberhalb. In der Studie von Watts et al. [22] wurde eine erhöhte Fekundität in Zusammenhang mit hormonell wirksamen Substanzen diskutiert. Die niedrigeren Werte unterhalb der Kläranlage, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, stehen deshalb wahrscheinlich weniger mit hormonell wirksamen als mit zusätzlich toxischen Einflüssen im Zusammenhang. Diese wurden durch den Ausbau der Kläranlage reduziert, so dass zwischen den Probestellen ober- und unterhalb der Kläranlage keine signifikanten Unterschiede mehr auftraten. Im Probenahmezeitraum nach Ausbau der Kläranlage traten im Herbst signifikant höhere Fekunditätsindizes in brütenden Weibchen an der Argen auf im Vergleich zur Probestelle 3 unterhalb der Kläranlage. Dies deutet auf geringere toxische Wirkungen in der Argen hin.

5. Untersuchungen des Makrozoobenthos

Um Auswirkungen des Kläranlagenausbaus mit Pulveraktivkohle auch auf Populationsebene beurteilen zu können, wurden Untersuchungen des Makrozoobenthos an den verschiedenen Probestellen durchgeführt, wobei die nach Wasserrahmenrichtlinie anerkannten Methoden verwendet wurden [24, 25, 26]. Durch diese Untersuchungsmethode können Veränderungen im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Zudem integriert das Makrozoobenthos Effekte einer längerfristigen Exposition gegenüber schwankenden Konzentrationen von Schadstoffen [24]. Die Verteilung der Taxa innerhalb des Makrozoobenthos wird von vielen Faktoren, wie beispielsweise organischen Schadstoffen und der Verschlechterung des Habitats beeinflusst. Daher ist die Bestimmung der Artenverteilung des Makrozoobenthos als Untersuchungsmethode zur Beurteilung der Effekte von Kläranlagen- oder Regenüberlaufbeckeneinleitern gut geeignet.

Das Makrozoobenthos wurde an den Untersuchungsstellen flächenbezogen nach dem Multi-Habitat-Sampling-Verfahren (nach Wasserrahmenrichtlinie, 2000) aufgenommen. Dabei wurden Abschnitte im Bereich der Untersuchungsstellen ausgewählt, die hinsichtlich der abiotischen Faktoren für eine längere Fließgewässerstrecke der Schussen repräsentativ sind. Die anschließende Beprobung der Habitate erfolgte proportional zu ihrem Vorkommen an der jeweiligen Probestelle.

Es wurde eine Lebendsortierung der Probe im Gelände durchgeführt und die Proben in 70% Ethanol fixiert. Die anschließende taxonomische Bestimmung im Labor wurde mindestens bis zum Niveau der operationellen Taxaliste vorgenommen.

Die ökologische Qualität der Schussen wurde mit Hilfe der Bewertungssoftware ASTERICS (Version 3.1.1) einschließlich des deutschen Bewertungssystems PERLODES ermittelt.

5.1 Anzahl der Taxa

Die Taxa innerhalb des Makrozoobenthos waren in der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese vor Ausbau der KA und im Referenzgewässer, der Argen, mit annähernd gleicher Anzahl vertreten (Abb. 5). Zwischen den Frühjahr- und Herbstprobenahmen traten keine großen Unterschiede auf. Nach Ausbau der Kläranlage war die Taxazahl an der Schussen unterhalb der Kläranlage Langwiese im Frühjahr als auch im Herbst im Vergleich zu Probenahmen vor dem Ausbau deutlich erhöht. Im Referenzgewässer Argen erniedrigte sich die Anzahl der Taxa nach Zeitpunkt des Kläranlagenausbaus in der Schussen. Vermutlich sind hierfür jahresspezifische Schwankungen verantwortlich, möglich ist aber auch eine Verschlechterung des Gewässerzustandes an der Argen. Dies kann jedoch erst durch weitere Probenahmen verifiziert werden.

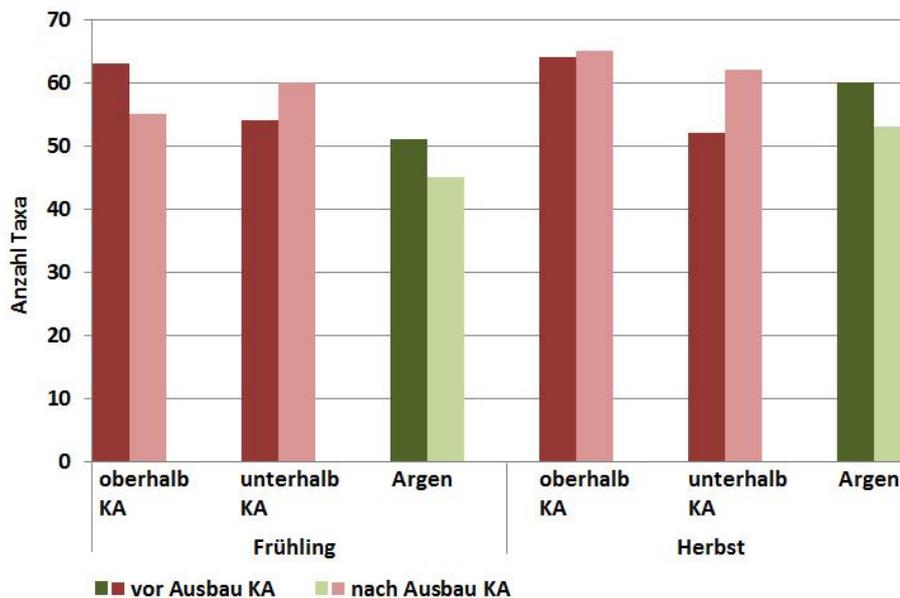


Bild 5: Taxazahl des Makrozoobenthos in der Schussen ober- und unterhalb der Kläranlage (KA) Langwiese und im Referenzgewässer, der Argen. Werte für Frühjahr und Herbst, jeweils vor (Mittelwert aus 2012 und 2013) und nach Ausbau (2014) der Kläranlage.

5.2 Saprobienindex

Die Berechnung des Saprobienindex (nach DIN 38410) ist das am häufigsten angewandte Bewertungsverfahren für Fließgewässer in Deutschland und bildet die Grundlage für die Ermittlung der Gewässergüte. Anhand des Saprobiensystems kann die organische Belastung von Fließgewässern ermittelt werden. Ein hoher Saprobienindex weist auf organische Belastung hin, während bei sinkender organischer Belastung auch der Saprobienindex niedriger wird. Durch Eintrag organischer Substanzen kann es durch unterschiedliche Prozesse zu einem Sauerstoffdefizit im Gewässerabschnitt kommen. Im betroffenen Abschnitt können dann lediglich die Arten überleben, die an sauerstoffarme Verhältnisse angepasst sind. Entlang der Fließstrecke können organische Substanzen aber auch wieder abgebaut werden, das Sauerstoffdefizit reduziert sich und es können wieder anspruchsvollere Arten im Gewässer überleben. Einzelnen Arten des Makrozoobenthos werden „Saprobiewerte“ zugeordnet, die ein Maß für den Sauerstoffbedarf der jeweiligen Art darstellen und damit in ihrem gewichteten Mittel die Sauerstoffverhältnisse in einem Gewässerabschnitt indizieren. Somit kann die organische Belastung, der die Artengemeinschaft ausgesetzt ist, ermittelt werden [27]. Die Zuschaltung einer vierten Reinigungsstufe kann den CSB Wert (Chemischer Sauerstoffbedarf, beschreibt die Menge an Sauerstoff, welche zur Oxidation der gesamten organischen Stoffe im Wasser verbraucht wird) im Kläranlagenablauf deutlich verringern, organische Verbindungen können über eine Aktivkohlefilterung entnommen werden. Dies spiegelt sich in einer geringeren organischen Belastung des Gewässers und der Artengemeinschaft wider [28].

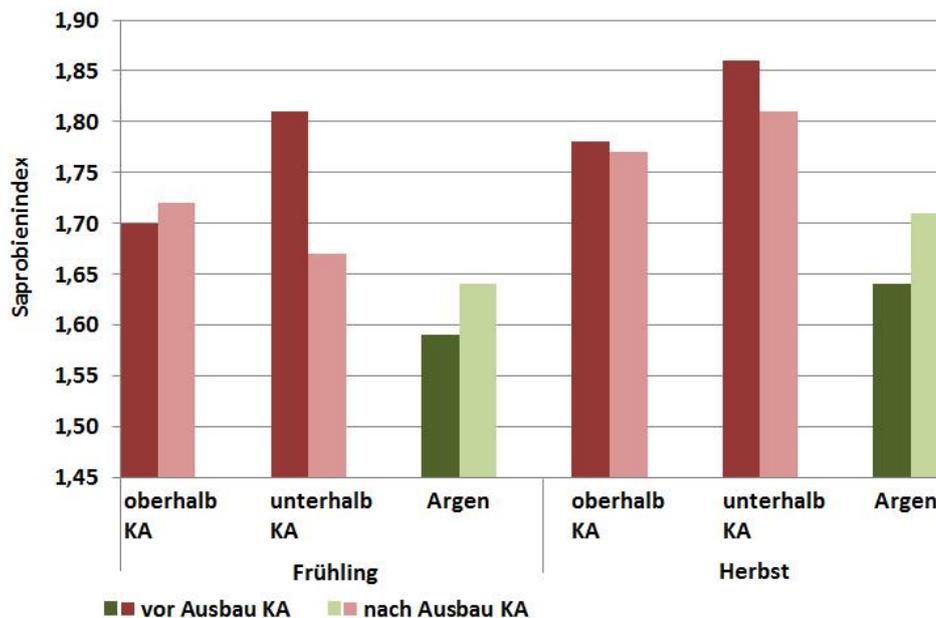


Bild 6: Saprobienindex in der Schussen ober- und unterhalb der Kläranlage (KA) Langwiese und im Referenzgewässer, der Argen. Werte für Frühjahr und Herbst, jeweils vor (Mittelwert aus 2012 und 2013) und nach Ausbau (2014) der Kläranlage.

Der Saprobienindex war zu allen Probenahmezeitpunkten sowohl vor als auch nach Ausbau der Kläranlage an der Schussen höher als im Referenzgewässer Argen (Abb. 6). Nach Inbetriebnahme des Aktivkohlfilters war der Saprobienindex in der Schussen unterhalb der Kläranlage im Frühjahr deutlich und im Herbst leicht niedriger als vor dem Ausbau der Kläranlage. Dies war am Referenzgewässer Argen nicht der Fall.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass sowohl die Verteilung der Taxa innerhalb des Makrozoobenthos als auch der Gesundheitszustand von Gammariden durch die Kläranlage Langwiese bei Ravensburg vor deren Ausbau mit einer Pulveraktivkohlestufe negativ beeinflusst wurde. Hinweise auf mögliche Wirkungen hormonell wirksamer Substanzen lieferten die Untersuchungen zum Geschlechterverhältnis bei Gammariden. Die Resultate zur Fekundität der Weibchen sprechen zudem für den Einfluss nicht nur hormonell wirksamer, sondern auch vor allem toxischer Substanzen, die sich negativ auf die Fruchtbarkeit weiblicher Gammariden vor Ausbau der Kläranlage ausgewirkt haben. Hinweise hierauf erbrachten auch Untersuchungen an Fischen, bei denen vor allem gentoxische und dioxinähnliche Wirkungen von Bedeutung sind [29]. Stressproteinanalysen gaben Hinweise auf proteotoxisch wirkende Substanzen, die unterhalb der Kläranlage wirkten. Nach Ausbau der Kläranlage kam es zu einer deutlichen Verbesserung des Gesundheitszustandes der Gammariden. Dieser Effekt auf Individualebene spiegelt sich auf biozönotischer Ebene wider: Der verbesserte Saprobienindex und die höheren Taxazahlen in der

Schussen unterhalb der Kläranlage weisen auf einen positiven Einfluss des KA-Ausbaus auf die Gewässerbiozönose hin.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Erweiterung der Kläranlage um eine Pulveraktivkohlestufe positiv auf die wirbellosen Gewässerorganismen ausgewirkt hat. Diese Ergebnisse stellen nur einen kleinen Aspekt des großen Verbundprojekts SchussenAktivplus dar, werden jedoch durch umfangreiche Untersuchungen der Projektpartner/innen bestätigt, die in vielen weiteren Veröffentlichungen auf www.schussenaktivplus.de eingesehen werden können. Die im Projekt gewonnenen Ergebnisse sind schon jetzt von großer Bedeutung für das Ökosystem der Schussen sowie für den Bodensee als Trinkwasserreservoir und Naturschutzgebiet.

Da der Untersuchungszeitraum nach Inbetriebnahme der vierten Reinigungsstufe jedoch erst ca. zwei Jahre umfasst, können jahresspezifische Schwankungen innerhalb der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Daher ist die Weiterführung der Untersuchungen nötig, um die bisher gewonnenen Aussagen zu untermauern.

Literatur

- [1] Triebskorn, R., Bláha, L., Engesser, B., Güde, H., Hetzenauer, H., Henneberg, A., Köhler, H.-R., Kraus, S., Maier, D., Peschke, K., Thellmann, P., Vogel, H.-J., Kuch, B., Oehlmann, J., Rault, M., Suchail, S., Rey, P., Richter, D., Sacher, F., Weyhmüller, M., und Wurm, K.: SchussenAktiv - Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. Korrespondenz Wasserwirtschaft (2013), Heft Nr. 8, S. 427-436.
- [2] Triebskorn, R., Amler, K., Bláha, L., Gallert, C., Giebner, S., Güde, H., Henneberg, A., Hess, S., Hetzenauer, H., Jedele, K., Jung, R.-M., Kneipp, S., Köhler, H.-R., Kraus, S., Kuch, B., Lange, C., Löffler, H., Maier, D., Metzger, J., Müller, M., Oehlmann, J., Osterauer, R., Peschke, K., Raizner, J., Rey, P., Rault, M., Richter, D., Sacher, F., Scheurer, M., Schneider-Rapp, J., Seifan, M., Spieth, M., Vogel, H.-J., Weyhmüller, M., Winter, J., and Wurm, K.: SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. Environmental Sciences Europe. 25 (2013), p. 1-9.
- [3] Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A. and Geffard, O.: Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquatic Toxicology 112-113 (2012), p. 72-82.
- [4] Daughton, C. G. and Ternes, T. A.: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. Environmental Health Perspectives 107 (1999) (Suppl.6), p. 907-938.
- [5] Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Schirling, M., Triebskorn, R. and Nagel, R.: Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50 (2006), p. 370-383.
- [6] Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R. and Köhler, H.-R.: Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluence, temporal variability and spatial

- aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49 (2005), p. 53-61.
- [7] Triebkorn, R., Adam, S., Behrens, A., Beier, S., Böhmer, J., Braunbeck, T., Casper, H., Dietze, U., Gernhöfer, M., Honnen, W., Köhler, H.-R., Körner, W., Konradt, J., Lehmann, R., Luckenbach, T., Oberemm, A., Schwaiger, J., Segner, H., Strmac, M., Schüürmann, G., Siligato, S. and Traunspurger, W.: Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The VALIMAR project. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 9 (2003), p. 171-194.
- [8] Götz, C. W., Kase, R. und Hollender, J.: Mikroverunreinigungen – Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU (2010). Eawag, Dübendorf.
- [9] Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, A., von Gunten, U. and Wehrli, B.: The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313 (2006), p. 1072-1077.
- [10] Seel, P., Knepper, T. P., Gabriel, S., Weber, A. und Haberer, K.: Kläranlagen als Haupteintragspfad für Pflanzenschutzmittel in ein Fließgewässer: Bilanzierung der Einträge. *Vom Wasser* 86 (1996), p. 247-262.
- [11] Vieno, N. M., Härkki, H., Tuhkanen, T. and Kronberg, L.: Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot scale drinking water treatment plant. *Environmental Science and Technology* 14 (2007), p. 5077-5084.
- [12] UBA, 2015. Position // März 2015: Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern: Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge. <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/organische-mikroverunreinigungen-in-gewaessern>
- [13] Triebkorn, R. und Hetzenauer, H.: Mikroverunreinigungen in den drei Bodenseezuflüssen Argen, Schussen und Seefelder Aach – eine Literaturstudie. *Environmental Sciences Europe* 24 (2012), No. 8, p. 1-24.
- [14] Meijering, M. P. D. und Pieper, H. G.: Die Indikatorbedeutung der Gattung *Gammarus* in Fließgewässern. *Decheniana – Beihefte* 26 (1982), S. 111-113.
- [15] Pöckl, M.: Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*), Entwicklungszyklus und Fortpflanzungskapazität. *Natur und Museum* 123 (1993), S. 114-125.
- [16] Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.-U., Nagel, R., Köhler, H.-R. and Triebkorn, R.: Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*. 15 (2006), p. 143-56.
- [17] Williams, K. A., Green, D. W. and Pascoe, D.: Toxicity testing with freshwater macroinvertebrates: Methods and application in environmental management. In: Pascoe, D., Edwards, R.W. (Hrsg.). *Freshwater Biological Monitoring*. Pergamon Press (1984), New York, p. 81-91.
- [18] McCahon, C. P. and Pascoe, D.: Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere*. 17 (1988), p. 2471-2480.
- [19] Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z. and Depledge, M. H.: Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*. 8 (1999), p. 351-368.
- [20] Sanders, B. M.: Stress Proteins in Aquatic Organisms: An Environmental Perspective. *Critical Reviews in Toxicology*. 23 (1993), p. 49-75.
- [21] Peschke, K., Geburzi, J., Köhler, H.-R., Wurm, K. and Triebkorn, R.: Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106 (2014): p. 115-125.

- [22] Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K.: Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (2002), p. 445-450.
- [23] Mazurová, E., Hilscherová, K., Sidlová-Stepanková, T., Köhler, H.-R., Tribskorn, R., Jungmann, D., Giesy, J. P. and Bláha, L.: Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and in vitro effects. *Journal of Soils and Sediments*. 10 (2010), p. 423-433.
- [24] Adámek, Z., Orendt, C., Wolfram, G. and Sychra, J.: Macrozoobenthos response to environmental degradation in a heavily modified stream: Case study the Upper Elbe River, Czech Republic. *Biologia*. 65 (2010), p. 527-536.
- [25] Chessmann, B. C.: Rapid assessment of rivers using macroinvertebrates: A procedure based on habitat-specific sampling, family level identification and a biotic index. *Australian Journal of Ecology*. 20 (1995), p. 122-129.
- [26] Rosenberg, D. M. and Resh, V. H.: *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall (1993), New York.
- [27] Rolaufts, P., Hering, D., Sommerhäuser, M., Jähnig, S. und Rödiger, S.: Entwicklung eines leitbildorientierten Saprobienindex für die biologische Fließgewässerbewertung. *Umweltbundesamt Texte 11/03* (2003). Forschungsbericht 200 24 227.
- [28] <http://www.klaerwerk.info/Abwasserreinigung/Kommunale-Abwasserbehandlung-Nachgeschaltete-Pulveraktivkohlestufe-im-Klaerwerk-bindet-Arzneimittelwirkstoffe> Bericht von Dipl.-Ing.(FH) Steffen Metzger. Stand: 22.09.2015
- [29] Maier, D., Bláha, L., Giesy, J. P., Henneberg, A., Köhler, H.-R., Kuch, B., Osterauer, R., Peschke, K., Richter, D., Scheurer, M. and Tribskorn, R.: Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediment with effects in fishes. *Water Research* 72 (2015), p. 127-144.

Kapitel 5: Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macro-invertebrates: individual and community responses

Katharina Peschke^{1,*}, Yvan Capowiez², Heinz-R. Köhler¹, Karl Wurm³, Rita Triebskorn^{1,4}

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

²INRA, UMR 1114, EMMAH, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

³GÖL Water Ecology Laboratory Starzach, Tulpenstr. 4, D-72181 Starzach, Germany

⁴Transfer Center Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany

*Correspondence: Katharina Peschke, katharina.peschke@uni-tuebingen.de

Frontiers in Environmental Science 7: 64; DOI: 10.3389/fenvs.2019.00064

Abstract

In the present study we investigated the efficiency of additional wastewater treatment based on powdered activated carbon and its benefit for the ecosystem of a connected river system in the catchment area of Lake Constance, Southern Germany. We focused on the overall health status of gammarids and the integrity of the macrozoobenthic community. Samples were taken up- and downstream of a wastewater treatment plant (WWTP), as well as before and after its upgrading. The investigations showed that both sex ratio and fecundity of gammarids, as well as the macrozoobenthic community were affected by the effluent prior to the WWTP upgrade. After the upgrade, gammarids from the downstream site did not differ any longer from those collected upstream of the WWTP with respect to the investigated health parameters. Furthermore, the overall number of taxa and, particularly, the number of sensitive taxa within the macrozoobenthic community downstream of the WWTP increased considerably. Therefore, we conclude that the additional treatment with powdered activated carbon was highly efficient to improve invertebrate health and community integrity.

1 Introduction

During the last decades, the occurrence of micropollutants including ingredients of, e.g., pharmaceuticals, pesticides or personal care products [1] in aquatic environments and their potential impact on biota has become a worldwide issue of scientific and public concern. Although their concentrations range only between a few ng/L to several µg/L [1-3], they have been reported to be responsible for adverse effects in exposed aquatic organisms [4-9]. Effluents from wastewater treatment plants (WWTPs) are known as major point sources for the release of micropollutants into

the water cycle [8, 10]. This is due to the fact that municipal WWTPs have mainly been designed to eliminate particular matter and nutrients, whereas the removal of micropollutants was not in the particular focus in the past. As a consequence, the removal of micropollutants is often insufficient or even completely lacking [2]. One possibility to improve micropollutants reduction in WWTPs is an upgrade with additional treatment steps like ozonation or activated carbon [4, 11-13].

In the present study, the influence of a WWTP upgrade with an additional purification step on the macroinvertebrate community was investigated. The study was conducted in the area of Lake Constance, Southern Germany, which serves as a major drinking water reservoir. The focus was on two major tributaries of Lake Constance: the river Schussen as a model stream located in a densely populated catchment area, and the river Argen representing a less anthropogenically influenced reference stream [14]. At the Schussen, the largest WWTP (Langwiese, AZV Mariatal) which treats about 50% of the wastewater of the catchment area has been upgraded with an additional powdered activated carbon stage in September 2013. Chemical analyses of more than 150 micropollutants showed that the additional powdered activated carbon stage was highly efficient in reducing the concentrations of micropollutants in the effluent and also in the surface water downstream the WWTP [15].

The present study focuses on assessing the overall health status of gammarids abundant in the two streams and the integrity of the macrozoobenthic community in the Schussen prior and subsequent to the WWTP upgrade and, in parallel, in the Argen as a control river which was not influenced by this measure. In the first part of our study we investigated the health of gammarids as important representatives of freshwater ecosystems [6]. Due to their diverse diet (detritus, aufwuchs, carrion, and small invertebrates), their broad distribution, high biomass, short generation time, and high productive rates, gammarids are highly important for aquatic ecosystems [16, 17], also acting as shredders of plant material [18]. Furthermore, they are an important part of aquatic food webs, particularly as food sources for fish [19]. As gammarids are known for their high sensitivity to pollutants, they are regarded as suitable monitoring organisms for ecotoxicological studies [4-6]. In the present study, we used different methods to investigate the physiological status of gammarids from the biochemical to the individual level: analyses of the heat shock protein Hsp70 level, determination of fecundity in females, sex ratio in gammarid populations, and distribution of different gammarid species at the sampling sites. These analyses contributed to an evaluation of potential toxic and endocrine effects caused by the WWTP effluent. Although numerous studies already have focused on gammarids as indicators for adverse ecosystem effects caused by WWTP effluents [5-7, 20-22], until now, investigations using gammarids in the context of a WWTP upgrade are still very rare. Only two studies from Bundschuh and Schulz [4, 23] deal with the effects of an additional ozonation-based treatment step on gammarids with respect to alterations in feeding rates and population sizes. In these

studies, the authors concluded that ozonation is an appropriate tool that contributed to the improvement of gammarid health in wastewater influenced rivers and streams. With our study, we further investigated the efficiency of activated carbon in eliminating micropollutants on the basis of gammarid health prior to and after the WWTP upgrade.

Furthermore, we extended our view to the entire macrozoobenthic community which is commonly assessed in the context of the European Water Framework Directive (WFD) [24]. Although the composition of macrozoobenthic communities can be influenced by numerous stressors including, e.g., pesticides or organic pollutants [25-27], there is, to the best of our knowledge, no study which has investigated the success of an additional powdered activated carbon treatment step with respect to the macroinvertebrate fauna, until now. Thus, the objective of the current work is to evaluate the impact of a WWTP upgrade on both individual health of gammarids and, in addition, the integrity of the macroinvertebrate community.

2 Materials and methods

2.1 Location and description of sampling sites

The study was conducted at the Schussen river, a major tributary to Lake Constance in Southern Germany, which is influenced by effluents of 20 WWTPs and more than 100 stormwater overflow basins (SOBs) [3]. The focus of the study was on the WWTP Langwiese (N47° 44' 53.22", E9° 34' 35.49"), one of the major WWTPs connected to the Schussen river and upgraded with a powdered activated carbon stage in September 2013. Location and sampling sites are shown in Figure 1. Sampling sites S 0, S 1, S 2, and S 3 were located at the Schussen river. S 0 (N47° 45' 29.59", E9° 35' 22.88") was located 2.5 km upstream of the WWTP Langwiese as well as 150 m upstream of the SOB Mariatal, S 1 (N47° 40' 19.57", E9° 32' 06.20") was situated 1.12 km downstream of the SOB Mariatal and 630 m upstream of the WWTP, S 2 (N47° 44' 42.27", E9° 33' 45.04") was located 850 m downstream of the WWTP and S 3 (N47° 39' 16.20", E9° 31' 52.93") was located 15 km downstream of the WWTP. Sampling sites S 4 (N47° 44' 20.46", E9° 53' 42.78") and S 5 (N47° 36' 09.71", E9° 34' 01.91") were situated at the Argen river. This river served as a less polluted reference site [14]. Sampling of gammarids took place at S 0, S 3, and S 5, whereas the macrozoobenthic community was investigated at sites S 0, S 1, S 2, S 3, and S 4. As the results obtained for the gammarid investigations should be comparable to results gained from diverse analyses with feral fish conducted by other partners within the project our study was embedded in (SchussenAktivplus) [3, 12, 28-30], fish and gammarids were caught simultaneously at the same sites at the Schussen river, at sites S 0 and S 3. S 0 was chosen as a sampling site upstream of the WWTP. In order to make sure that fish, caught downstream of the WWTP, did not have migrate upstream the WWTP, sampling of fish exclusively took place 15 km downstream of the WWTP (S 3).

We refrained from sampling site S 2, because it was too close to the WWTP allowing fish to migrate up- and downstream of this site. In contrast, macrozoobenthos is almost stationary [31, 32], hence, short distances between different sampling sites is not an issue. Thus, to get information on changes within the macrozoobenthic community along the course of the Schussen with higher spatial resolution, two additional sampling sites were included: S 1 was downstream of the SOB but upstream of the WWTP, whereas S 2 was 850 m downstream of the WWTP.

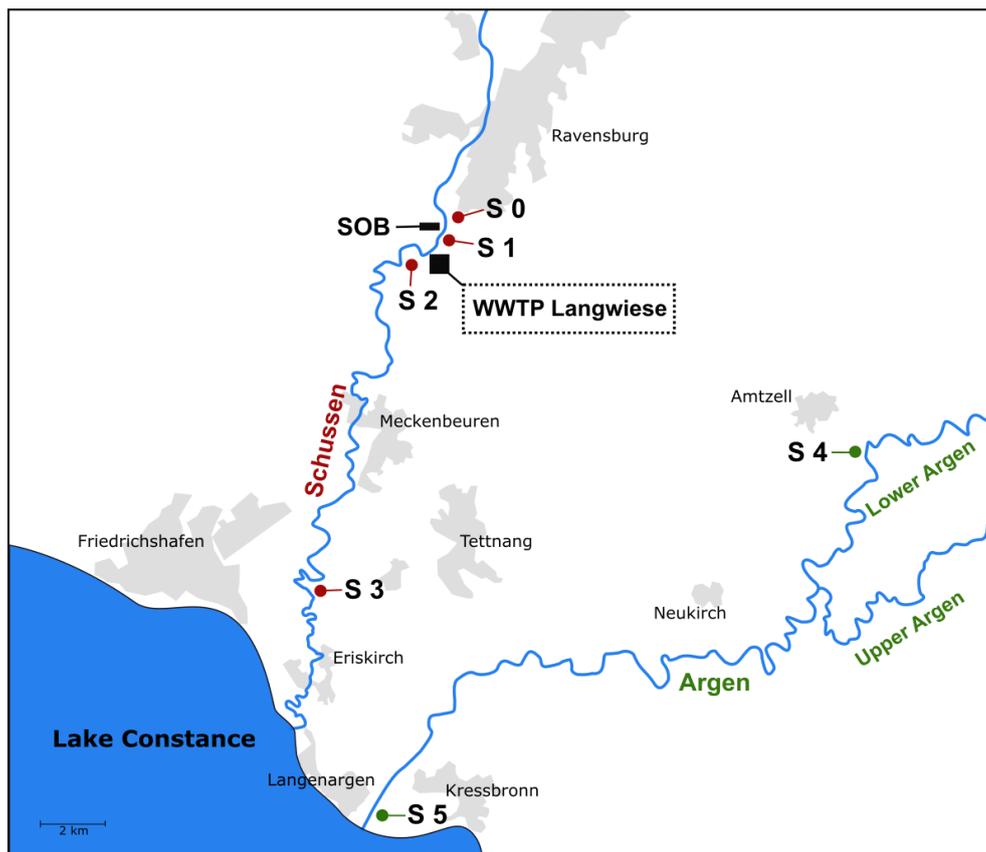


Figure 1: Sampling sites at the Schussen and the Argen river, two tributaries to Lake Constance. Gammarids were collected at sampling sites S 0, S 3, and S 5. Macrozoobenthos was sampled at sampling sites S 0, S 1, S 2, S 3, and S 4. WWTP: wastewater treatment plant Langwiese (AZV Mariatal). SOB: stormwater overflow basin Mariatal. For exact coordinates of sampling sites see chapter 2.1. The map is based on OpenStreetMap. Map data: ©OpenStreetMap contributors, license: (<http://opendatacommons.org/licenses/dbcl/1.0/>).

2.2 Studies with gammarids

The gammarid studies were conducted prior to and after the WWTP upgrade with a powdered activated carbon stage. At each site, animals were sampled up to four times per year resulting in a large data set which enabled the differentiation between effluent-dependent effects on the one hand, and seasonal or annual influences on the other hand. Prior to the WWTP upgrade, samples were collected in 2010 (April 19, June 29, August 19), 2011 (May 9, July 7, September 2, October 28), and 2012 (May 3, July 4, October 24). After the upgrade, gammarids were sampled in 2014 (May 21, July

1, October 2), 2015 (May 30, August 12), 2016 (May 3), and 2017 (May 18). Gammarids were pick-sampled at typical habitats such as roots, macrophytes and conglomerations of leaves. Using a conventional sieve (mesh size 1 mm), 180 gammarids were collected at each site and sampling occasion and were stored together in a container. For each of the following investigations, the required number of gammarids was randomly taken from this container.

2.2.1 Distribution of species and sex ratio

For species and sex determination, 100 gammarids per site were chemically fixed with 2% glutardialdehyde (dissolved in 0.005 M cacodylate buffer) and examined under a stereomicroscope. Based on external morphological characteristics, the two gammarid species (*Gammarus roeseli* and *Gammarus pulex*), abundant in the Schussen and Argen rivers, could be distinguished. In *G. roeseli*, the carapax in the abdominal dorsal region of the body shows spine-like processes, while *G. pulex* does not show such morphological features [17]. The sex of each individual was determined based on secondary sexual characteristics. Thus, female gammarids were characterized by four pairs of oostegites (brood plates) and males by two genital papillae on the ventral body side [33]. Since external sexual organs are not developed until the ninth molt, small gammarids (body length < 6 mm) were determined as “juvenile” [17].

2.2.2 Fecundity

For determination of the fecundity, per site twenty breeding females were randomly selected from the sample container. Each breeding female was fixed separately in 2% glutardialdehyde (dissolved in 0.005 M cacodylate buffer) and examined using a stereomicroscope. The species of every breeding female was determined and the body length (distance from the anterior margin of the cephalothorax to the posterior margin of the telson) was measured on graph paper. Using dissecting needles, the marsupium was opened gently, and eggs and juveniles were retrieved and counted. Afterwards, the fecundity index (FI) was calculated as follows: $FI = \text{number of eggs or juveniles} / \text{body length of breeding female}$ [34, 35].

2.2.3 Hsp70 quantification

For the quantification of stress proteins (Hsp70), per sampling site twenty praecopula pairs (one male and one female gammarid) were picked randomly from the sample container. The exclusive use of praecopula pairs overcomes the problem of varying Hsp70 levels in different reproductive stages [22]. In addition, the sex of the gammarids could easily be determined in the praecopula stage, since the males always hold the top position [36]. Consequently, the Hsp70 level was analyzed in each sex separately. According to Sures and Radszuweit [37] and Sures [38] who found adversely affected stress protein expression in gammarids infected with Acanthocephala, we only used visibly uninfected

gammarids. Analyses of Hsp70 level were carried out as described by Peschke et al. [39]. Analyses were conducted in whole body homogenates, and the determination of the total protein content of the samples was carried out according to Bradford [40]. SDS-PAGE was run to separate standard amounts of total protein. By semi-dry blotting, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. After two steps of antibody incubation (first: mouse anti-human hsp70 monoclonal antibody; second: goat anti-mouse IgG (H+L) antibody, both: Dianova, Hamburg, Germany), the Hsp70-antibody-complex was visualized using chloronaphtol. After digitalization, the optical volume (gray scale values x area) of the protein bands was quantified by densitometric image analysis (Image Studio Lite, 4.0.21, LI-COR Inc.). An internal standard, serving as a reference, was run in parallel on each gel.

2.3 Integrity of the macrozoobenthic community

Alike the investigations on gammarids, the macrozoobenthic community was studied prior to and after the WWTP upgrade. Prior to the upgrading, the macrozoobenthic organisms were sampled in 2012 (April 29, October 6) and 2013 (May 20, October 9). After the upgrade, samples were collected in 2014 (April 11, October 4), 2015 (June 11, October 3), and 2016 (July 9, October 8). On site, the macrozoobenthic organisms were collected by means of the multi habitat sampling method according to the protocol of the European Water Framework Directive 2000/60/EC [24], using a Surber Sampler with a mesh size of 500 µm. After sampling, macrozoobenthic individuals were fixed in 80% ethanol. Subsequently, taxonomic determination in the laboratory was accomplished at least up to the level of the operational taxa list for German rivers [41]. The ecological quality of the two rivers was determined by means of the evaluation software ASTERICS (AQEM/STAR Ecological River Classification System 4.04) including the German system PERLODES.

2.4 Data analyses and statistics

Gammarid species distribution: The differences among data for the different sampling sites were analyzed by a chi-squared test (Fisher's exact test following a sequential Bonferroni-Holm correction). The statistical significance level was set to $p < 0.05$.

Sex ratio: The ratio of male to female gammarids was calculated for each sampling site. Each ratio was analyzed for a significant deviation from a 1:1.5 ratio using a Likelihood-ratio χ^2 test following a sequential Bonferroni-Holm correction. The statistical significance level was set to $p < 0.05$. This procedure is based on investigations of Ladewig et al. [5] who reported the ratio of male to female gammarids differs from 1:1 in clean or only marginally polluted rivers and streams and showed a male to female ratio of 1:1.5 in a minor polluted stream in Germany. Based on these results, we assigned effects to be caused by the effluent of the WWTP in cases of significant deviation from a male to female ratio of 1:1.5 in favor of females. In a next step, the difference between the sex ratio at site S 0

upstream of the WWTP and site S 3 downstream of the WWTP was calculated as $\Delta S3-S0$. By using TableCurve 2D (Systat Software Inc.) non-linear regression analysis was conducted for the $\Delta S3-S0$ data prior to and after the WWTP upgrade.

Fecundity: Following Pöckl [17], data obtained for breeding females of different species from the same site were pooled. In order to show differences between the sampling sites, the entire data set was statistically analyzed as follows: The data set was checked for normal distribution and homogeneity of variances. If both criteria were met, data from different sampling sites were compared with a one-way ANOVA linked to a Tukey-Kramer post hoc test. In case of normal distribution with inhomogeneous variances, a non-parametric Welch's t-test followed by a sequential Bonferroni-Holm correction was applied. If data were not normally distributed but variances were homogenous, a Kruskal-Wallis test with a Steel-Dwass post hoc test was performed. The statistical significance level was set to $p < 0.05$.

Hsp70: Differences between data for the respective sampling sites were statistically analyzed as described above for the fecundity data.

All statistical analyses were conducted using the software JMP (SAS Institute Inc., version 14.0.0).

Integrity of the macrozoobenthic community: To determine potential effects of the WWTP's upgrade, we performed ANOSIM (analysis of similarities) using the Bray-Curtis dissimilarity measure on square root transformed data. ANOSIM were conducted on datasets either including or omitting data from sampling site S 4 (Argen river, reference stream). In order to show the results in a graphical way, we performed NMDS (non-metric multidimensional scaling). Both methods were conducted using R (version 3.5.2).

3 Results and discussion

3.1 Studies with gammarids

3.1.1 Species distribution

Distribution of gammarid species varied between sites S 0 (upstream of the WWTP) and S 3 (downstream of the WWTP) within the Schussen river, as well as between the rivers Schussen and Argen. In the Argen river (S 5) only *G. pulex* was found within the time of investigation (Figure 2). In contrast, two gammarid species, *G. pulex* and *G. roeseli*, were collected in the Schussen river. The distribution of species differed significantly between sampling sites upstream and downstream of the WWTP. At S 0 (upstream of the WWTP), significantly more *G. pulex* and fewer *G. roeseli* were present compared to S 3 (downstream of the WWTP). This held true for the investigation time prior to the WWTP upgrade, as well as subsequent to it. In general, both gammarid species prefer slowly running

waters [42] but *G. pulex* is more dominant in habitats with higher flow rates like in upper stream or spring sections [43]. Thus, the dominance of *G. roeseli* at sampling site S 3 at the Schussen could be due to the rivers' morphology as the investigated sampling site is located at the lower section of the Schussen. In the Argen, the presence of *G. pulex* likely goes hand in hand with better water quality [42]. Given that there were no changes in species distribution downstream of the WWTP after the upgrade compared to the prior situation, we conclude that the effluent did not directly influence the occurrence of gammarid species at this sampling site.

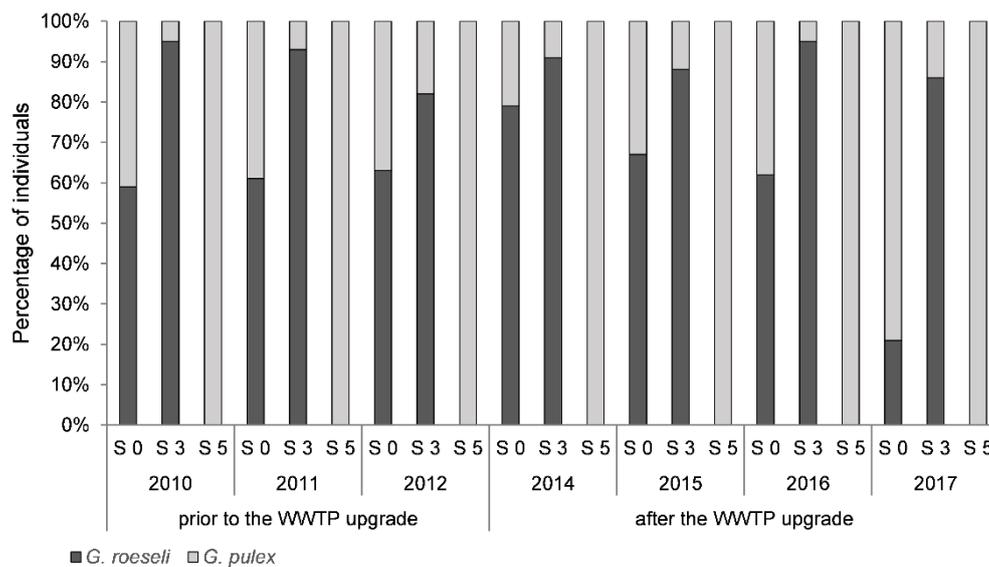


Figure 2: Distribution of gammarid species prior to (2010-2012) and after (2014-2017) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Sampling sites at the Schussen river: S 0 upstream of the WWTP, S 3 downstream of the WWTP. Sampling site S 4 at the river Argen. Number of individuals at each sampling site is totalized for every year under investigation. Sample sizes in 2010, 2011, 2012, and 2014 at every sampling site: 300. Sample sizes in 2015: 200 at each sampling site. Sample sizes in 2016 and 2017 at each sampling site: 100. Statistically analyzed: Fisher's exact test following sequential Bonferroni correction. Significant differences: 2010 S0-S3 ($p=0.0001$), 2011 S0-S3 ($p=0.0001$), 2015 S0-S3 ($p=0.0004$), 2016 S0-S3 ($p=0.0001$), 2017 S0-S3 ($p=0.0001$). S0 2017 significantly different to S0 in 2016, 2015, 2014, 2012, 2011, and 2010 with every $p=0.0001$ (not marked in the graph).

3.1.2 Sex ratio

Due to unequal frequency of gammarid species distribution, *G. pulex* and *G. roeseli* were examined together as *G. spec* for calculating the sex ratio. The number of *G. pulex* at S 3 was too low to reliably determine the sex ratio in this species separately. As a compromise, we examined *G. pulex* and *G. roeseli* together as *G. spec*. In order to examine potential effects of the WWTP effluent on the population structure at the downstream site, the ratio of male to female gammarids for each sampling site was calculated (Table 1). Studies from Ladewig et al. [5] showed a male to female ratio of 1:1.5 in a minor polluted stream in Eastern Germany. As well, Welton [33] showed in her study that the sex ratio in gammarid populations in a minor polluted stream was not fixed to a ratio of 1:1 (male/female).

According to Ladewig et al. [5] she also determined shifted sex ratio in favor of females [33]. Based on these results, the sex ratio in general should be regarded as to be affected whenever the ratio of male to female gammarids significantly differs from a 1:1.5 ratio towards females. Prior to the WWTP upgrade, we found a significantly shifted sex ratio towards females at S 3 (downstream of the WWTP) in spring 2010, 2011, and 2012, as well as in summer 2010. Subsequently to the upgrade, the sex ratio at S 3 was significantly shifted towards females in spring 2014 and 2015, only. However, in spring 2016 and 2017, three and four years after the upgrading, the sex ratio was not shifted towards more females downstream of the WWTP anymore.

Table 1: Ratio of male to female gammarids in spring, summer, and autumn prior to (2010-2012) and after (2014-2017) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Sampling sites at the Schussen river: S 0 upstream of the WWTP, S 3 downstream of the WWTP. Sampling site S 4 at the river Argen. Statistically analyzed for shifted ratio towards females (= more than ratio of 1:1.5): Likelihood-ratio χ^2 test following a sequential Bonferroni-Holm correction. Significant shifts towards females are marked in bold and with asterisks. Spring: S 3 2010 $p=0.0185$, S 3 2011 $p=0.0100$, S 3 2012 $p=0.0041$, S 3 2014 $p=0.0009$, S 3 2015 $p=0.0377$. Summer: S 3 2010 $p=0.0001$.

	Spring			Summer			Autumn		
	S 0	S 3	S 5	S 0	S 3	S 5	S 0	S 3	S 5
2010	1:1.04	1:2.52*	1:1.16	1:1.54	1:4.00*	1:1.39	1:1.04	1:1.66	1:1.17
2011	1:1.45	1:2.63*	1:2.81	1:2.25	1:1.87	1:1.71	1:1.26	1:1.33	1:1.24
2012	1:1.21	1:2.27*	1:1.78	1:1.73	1:1.46	1:1.67	1:1.16	1:1.51	1:1.20
-----WWTP upgrade-----									
2014	1:1.45	1:3.17*	1:0.96	1:1.56	1:1.79	1:0.60	1:0.85	1:0.96	1:0.32
2015	1:1.13	1:2.33*	1:1.08	1:0.83	1:0.92	1:0.38			
2016	1:0.94	1:2.23	1:1.00						
2017	1:0.80	1:1.82	1:0.28						

The presence of xenoestrogens can lead to a shifted sex ratio towards more females, as shown by Watts et al. [44] in laboratory studies. After 100 days of exposure to 100 ng/L 17 α -ethinylestradiol, the sex ratio in evenly distributed populations (1:1) switched to a 1:2.7 ratio (males to females) [44]. On the basis of an E-Screen cell proliferation assay, Kuch [45] detected 0,4 ng/L EEQ (estradiol equivalent concentration) at sampling site S 3 in the Schussen river downstream of the WWTP prior to the upgrade. Even though this concentration is much lower than the ethinylestradiol concentration used by Watts et al. [44], it has to be taken into account that gammarids sampled in the field are permanently exposed to xenohormones. Therefore, even lower ethinylestradiol concentrations might have resulted in the shifted sex ratio towards more females downstream of the WWTP (S 3) prior to the upgrade. Flow channel experiments from Schneider et al. [7] have shown corresponding effects regarding the sex ratio in gammarids. Using four flow channel systems, they exposed individuals of

G. pulex to different concentrations of a WWTP effluent over a period of 30 days. They observed a shift in the sex ratio in favor of females with increasing wastewater concentrations [7].

In the Schussen river, after the upgrade of the WWTP, E-screen assays showed significantly lower EEQs at field sites downstream of the WWTP compared to the situation prior to the upgrade [45]. Furthermore, determination of EEQs in wastewater samples from WWTP Langwiese taken subsequently to several cleansing steps showed a reduction of EEQs of $86 \% \pm 5 \%$ after powdered activated carbon and flocculation filtration compared to the secondary clarifying step [45]. Consequently, the reduction of EEQs in the WWTP effluent led to lower EEQs at the sampling sites downstream of the WWTP, which is mirrored in the sex ratio of feral gammarid populations.

In order to visualize differences between the sampling sites S 3 and S 0 with respect to the sex ratio, a non-linear regression analysis using a Fourier polynomial 7×2 ($r^2=0.98$) was performed (Figure 3). Prior to the WWTP upgrade, large deltas between S 3 and S 0 were found, particularly in spring and early summer. At those time points, the sex ratios at S 3 showed a stronger shift in favor of females compared to S 0. However, also after the upgrade deltas between S 3 and S 0 were found in spring. This might be due to the fact that sampling site S 3 is not only influenced by the WWTP effluent but also by agricultural activities. To the best of our knowledge, agricultural practices and the use of pesticides have not changed during the period of our investigations in the area of S 3. Therefore, also pesticides with estrogenic potential and which are mostly used in spring may have influenced females at S 3 in spring and early summer. However, due to reduced EEQs in the effluent [8] the differences with respect to the sex ratio between S 3 and S 0 continuously decreased after the WWTP upgrade. Thus, it is very likely that differences between S 3 and S 0 regarding the sex ratio in spring and early summer after the WWTP upgrade are mainly caused by pesticide application in springtime.

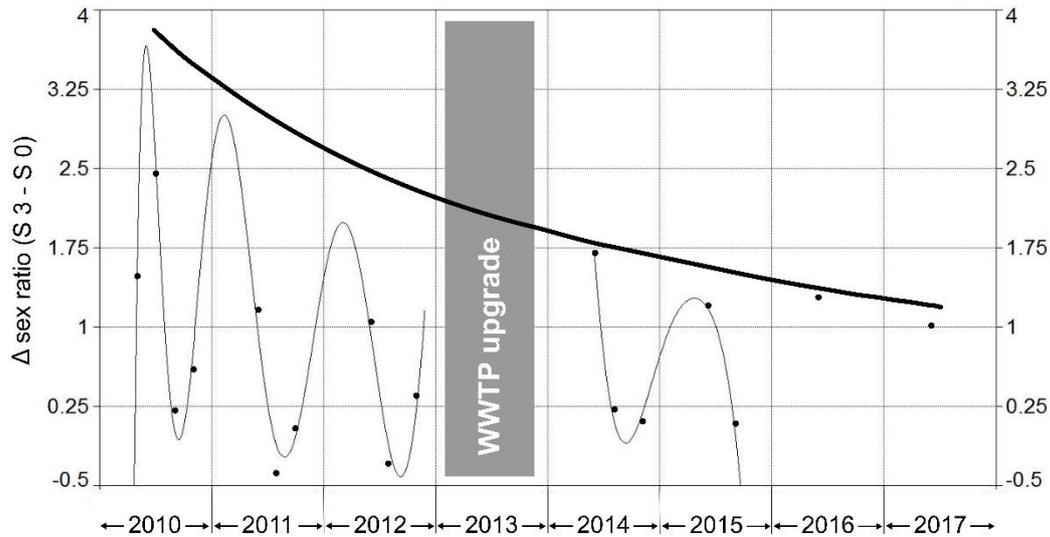


Figure 3: Differences between sex ratio at sampling site S 3 (downstream of the WWTP) and S 0 (upstream of the WWTP) prior to (2010-2012) and after (2014-2017) the upgrade. Non-linear regression analysis by Fourier series polynomial 7x2 ($r^2=0.98$).

3.1.3 Fecundity

Pöckl [17] showed that the fecundity index in equally sized females of different European *Gammarus* species is almost identical which allowed us to pool data obtained for *G. pulex* and *G. roeseli* in respect to calculate fecundity indices.

Prior to the WWTP upgrade, fecundity indices in breeding females of autumn samples were significantly lower at S 3 (downstream of the WWTP) compared to the upper site S 0 in 2010, 2011, and 2012 (Figure 4). In autumn 2014, after the WWTP upgrade, the fecundity index downstream of the WWTP did not differ from the upstream sampling site any more. The same pattern was observed in spring and summer samples. Despite lacking significance, a distinct trend towards decreased fecundity indices downstream of the WWTP (S 3) compared to the upper site was detected. As observed for the autumn samples, these differences did not longer occur after the WWTP upgrade.

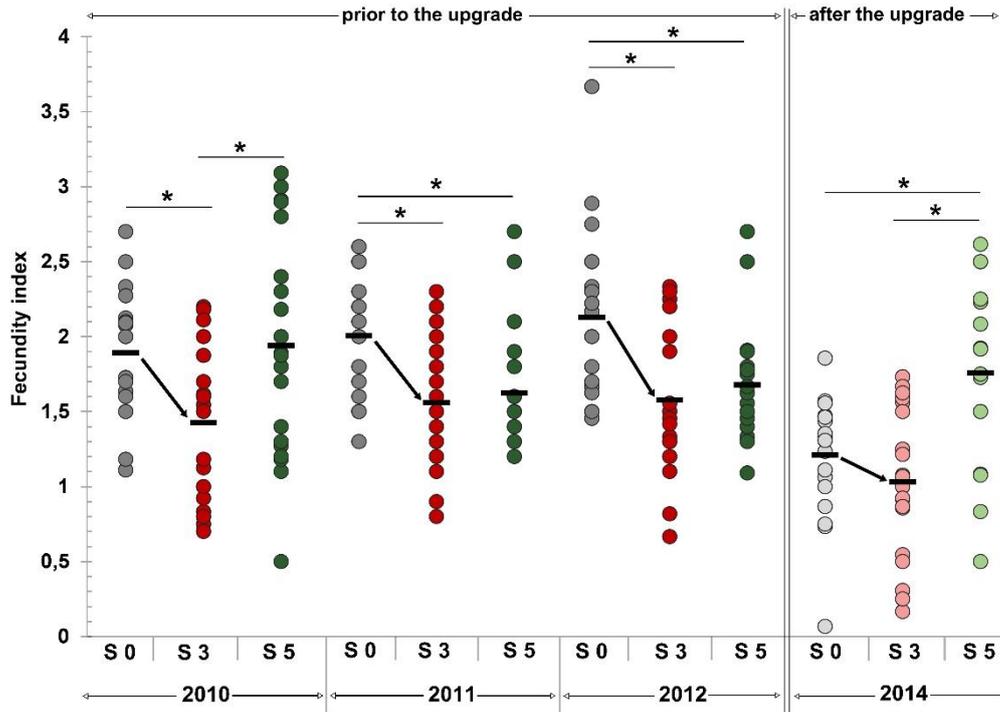


Figure 4: Fecundity index of female gammarids in autumn prior to (2010-2012, dark colors) and after (2014, light colors) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Arithmetic mean is graphed as black bar. Sampling sites at the Schussen river in grey colors: S 0 upstream of the WWTP, and in red colors: S 3 downstream of the WWTP. Sampling site S 4 at the Argen river in green colors. Sampling sizes: At each sampling site per year $n = 20$ breeding females. Statistically analyzed via Welch's t-test followed by sequential Bonferroni-Holm correction. Significant differences marked with asterisks: 2010 S 0-S 3 $p=0.0034$, S 3-S 5 $p=0.0149$; 2011 S 0-S 3 $p=0.0027$, S 0-S 5 $p=0.0067$; 2012 S 0-S 3 $p=0.0025$, S 0-S 5 $p=0.0066$; 2014 S 0-S 5 $p=0.0023$, S 3-S 5 $p=0.0022$. Furthermore, fecundity indices at S0 in 2010, 2011, and 2012 were significantly higher compared to S 0 in 2014 ($p=0.0125$, $p=0.0125$, $p=0.0120$) (not marked in the graph). Same was true for fecundity indices at S 3 in 2010, 2011, and 2012 compared to S 3 in 2014 ($p=0.0207$, $p=0.0012$, $p=0.0014$) (not marked in the graph).

Regarding the comparison of sampling sites at the Schussen river to S 5 at the Argen, differences with respect to the fecundity index in breeding females were obvious. In 2010, the fecundity index at S 3 at the Schussen was significantly lower compared to S 5 at the Argen. In 2011 and 2012, no differences occurred between S 3 and S 5 but the fecundity indices at S 5 were found to be significantly lower compared to S 0. Investigations in 2014 after the upgrade showed a significantly higher fecundity index at S 5 at the Argen river in comparison to both sampling sites at the Schussen. These results are corroborated by physico-chemical data for the respective sampling sites prior to and after the WWTP upgrade which have been assessed according to the protocol of the European Water Framework Directive 2000/60/EC [24]. With respect to this, the water quality of the Argen can be classified as 'very good' whereas the water quality of the Schussen has to be classified as 'good' [30, 46]. Also micropollutant analyses conducted in parallel showed that the Argen river is less polluted with chemicals than the Schussen, but, however, cannot be classified as completely 'unpolluted' [47, 48]. Diverging differences in fecundity indices between Schussen and Argen as observed in our study can also be seen as further indicators for the need to investigate the Argen river more in-depth as already recommended by Triebkorn et al. [48]. However, the results obtained for the Argen river in this study

can be used to detect inter-annual variation in the entire area and, thus, are mandatory for the interpretation of temporal differences between the sampling sites at the Schussen river. Prior to the WWTP upgrade (2010, 2011, and 2012), fecundity indices at S 0, as well as at S 3 were significantly higher compared to the situation in 2014 after the WWTP upgrade. This was not the case for the reference river, Argen, which excludes general annual effects in 2014. The lower values obtained for the two sites at the Schussen river therefore must be attributed to Schussen-specific impacts of unknown origin.

Despite the presence of endocrine disrupting chemicals [7, 44, 49], fecundity in gammarids is also influenced by the water temperature [17]. Within the project SchussenAktiv*plus*, at all investigated sampling sites limnological parameters were measured at every sampling time point. There were no significant differences in water temperature between the sampling sites, neither prior to nor subsequent to the WWTP upgrade [46]. Gammarids in the field are likely exposed to a multifarious mixture of micropollutants. This mixture might adversely affect gammarid fecundity in a complex way and might possibly overwhelm potential endocrine effects by unspecific toxicity.

However, it is remarkable that, prior to the upgrade, the fecundity of gammarids at S 3 repeatedly was significantly lower than at the upstream site S 0 which suggests a toxic impact of the WWTP effluent on this parameter until 2012. By upgrading the WWTP, toxic loads presumably were reduced which resulted in comparably similar fecundity indices upstream and downstream of the WWTP.

3.1.4 Hsp70 level

Data for Hsp70 in general were highly variable and, thus, no statistically significant differences between the sampling sites were detected. At most, data showed a trend towards higher Hsp70 levels in gammarids from S 3 (downstream of the WWTP) compared to those from S 0 (upstream of the WWTP) and S 5 (Argen river), as well as trends to differences in Hsp70 levels depending on the year of investigation. These trends were independent of the season and visible prior and subsequent to the WWTP upgrade. This finding was corroborated by results obtained for feral fish in these rivers [50]. Also for them, annual variation but no significant spatial effects have been recorded.

3.2 Integrity of the macrozoobenthic community

3.2.1 Number of taxa and sensitive taxa

The number of taxa differed between the sampling sites as well as between the situation prior and subsequent to the WWTP upgrade (Figure 5). Prior to the upgrade, a decrease in the number of taxa along the course of the river Schussen from S 0 to S 3 was detected in autumn. The number of taxa at sampling sites downstream of the WWTP (S 2 and S 3) was lower than upstream of the WWTP (S 0)

and downstream of the SOB (S 1). The lowest number of macrozoobenthic taxa was recorded at S 3, 15 km downstream of the WWTP. After the WWTP upgrade, the number of taxa at S 0, S 1 and S 3 was lower than prior to the upgrade, same was true for sampling site S 4 at the river Argen. This might be due to annual effects. However, at site S 2 directly downstream of the WWTP the taxa number increased after the WWTP upgrade.

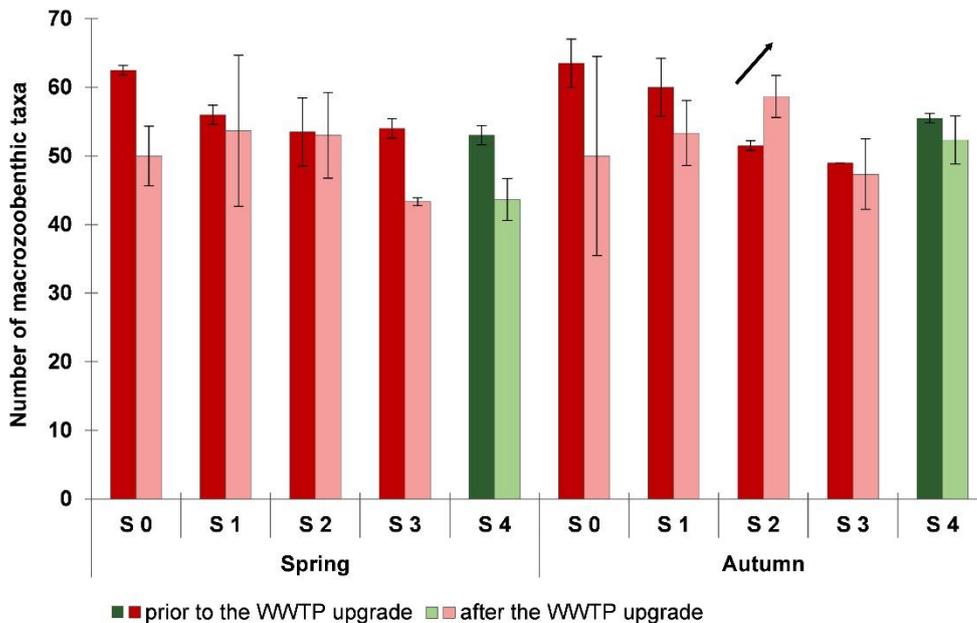


Figure 5: Number of macrozoobenthic taxa in spring and autumn prior to (2012 and 2013, dark colors) and after (2014, 2015, and 2016; light colors) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Data are shown as arithmetic means and standard deviations. Data for the sampling sites at the Schussen river are shown in red colors: S 0 upstream of the WWTP and upstream of the stormwater overflow basin (SOB) Mariatal, S 1 upstream of the WWTP and downstream of the SOB, S 2 directly downstream of the WWTP, S 3 15 km downstream of the WWTP; data for the sampling site S 4 at the Argen river are shown in green colors.

Data for the macrozoobenthic community were analyzed in addition with respect to responses of taxa particularly sensitive to toxic effects according to Fauna Aquatica Austriaca [51]. These include several ephemeropteran and plecopteran taxa, but also riffle beetles (Elmidae) like *Elmis* sp., *Esolus* sp. and *Riolus* sp. [51, 52].

The number of sensitive taxa varied largely in terms of space and time at the Schussen river (Figure 6). Prior to the WWTP upgrade, less sensitive taxa were found downstream of the SOB (S 1) and downstream of the WWTP (S 2) compared to the upper sampling site (S 0). The lowest number of sensitive taxa was found at sampling site S 2, directly downstream of the WWTP, the highest at sampling site upstream of the WWTP (S 0) and at the river Argen (S 5). After the WWTP upgrade, the number of sensitive taxa at S 0 and S 4 was lower compared to the situation prior to the upgrade. This might be due to annual effects. But the number of sensitive taxa at S 2 directly downstream of the WWTP increased considerably after the upgrade.

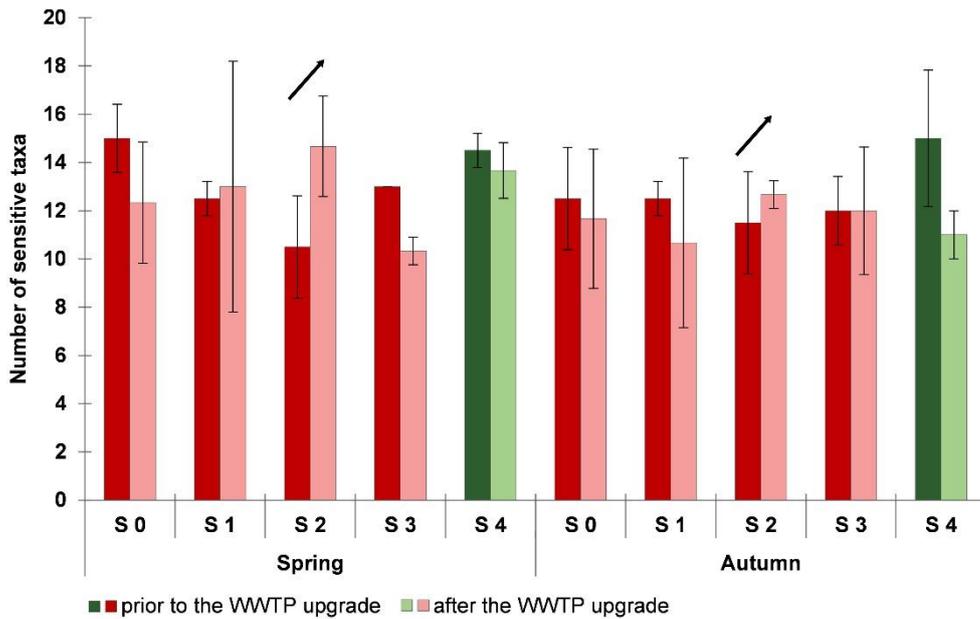


Figure 6: Number of sensitive taxa in spring and autumn prior to (2012 and 2013, dark colors) and after (2014, 2015, and 2016; light colors) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Data are shown as arithmetic means and standard deviations. Data for the sampling sites at the Schussen river are shown in red colors: S 0 upstream of the WWTP and upstream of the stormwater overflow basin (SOB) Mariatal, S 1 upstream of the WWTP and downstream of the SOB, S 2 directly downstream of the WWTP, S 3 15 km downstream of the WWTP; data for the sampling site S 4 at the Argen river are shown in green colors.

The data generated by ANOSIM for the whole community and the sensitive taxa datasets corroborated these results. Regarding the ANOSIM including sampling site S 4 (Argen river) differences between the river Argen (S 4) and the Schussen river (S 0, S 1, S 2 and S 3) with respect to the entire macrozoobenthic community became obvious (Figure 7a). The comparison of the community structure prior vs. subsequent to the upgrade of the WWTP showed significant differences (ANOSIM, p -value = 0.014; R statistic = 0.11) (Figure 7b). Furthermore, performing ANOSIM solely for the river Schussen (excluding sampling site S 4, Figure 7c) the difference between the situations prior to and after the upgrade of the WWTP became much more significant indicating that the effect of the upgrade was more pronounced than the natural variations observed for the river Argen dataset (S 4).

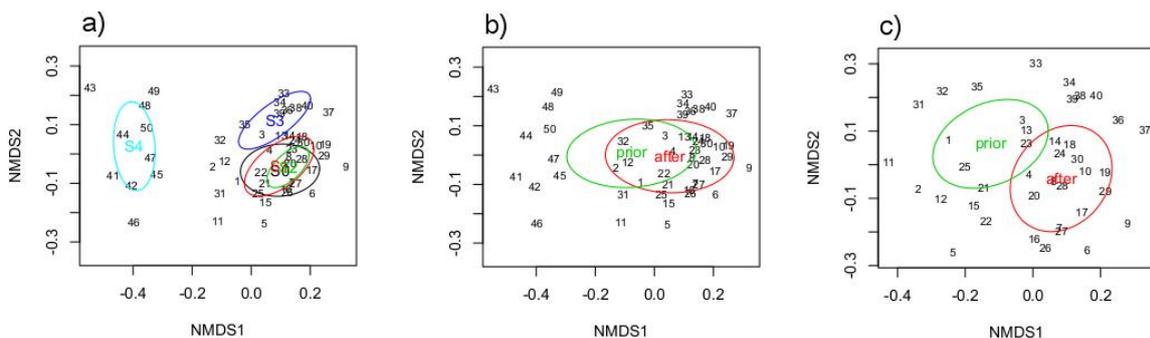


Fig 7: NMDS (non-metric multidimensional scaling) for the dataset of the whole macrozoobenthic community. 7a): difference between the river Schussen (S 0, S 1, S 2 and S 3) and the river Argen (S 4). 7b): NMDS including S 4 (Argen). Significant difference between the datasets prior to and after the upgrade of the WWTP. ANOSIM: p-value = 0.014; R statistic = 0.11. 7c): NMDS for the river Schussen solely (excluding S 4). Significant difference between the datasets prior to and after the upgrade of the WWTP. ANOSIM: p-value = 0.001; R statistic = 0.37.

For plecopteran taxa, highly increased abundances at S 2 downstream of the WWTP after the WWTP upgrade became evident. The number of individuals of *Perla abdominalis*, *Protonemura* sp., and *Leuctra fusca* was almost doubled in comparison to the situation prior to the WWTP upgrade. Moreover, the highly sensitive *Perla marginata* was detected for the first time at sampling sites downstream of the WWTP after the WWTP upgrade. Also the number of riffle beetles (Elmidae) of the genus *Elmis*, *Esolus*, and *Riolus* increased notably at sampling sites downstream of the WWTP after the WWTP upgrade. In addition, *Brachycentrus subnubilus* (Trichoptera), as well as *Epeorus assimilis*, *Heptagenia longicauda*, and *Heptagenia sulphorea* (Ephemeroptera) were detected more frequently than prior to the upgrading. The occurrence of 'new' taxa downstream of the WWTP after the upgrade and the increase of macrozoobenthic taxa, which was detected in every year subsequently to the upgrade, showed that the upgrade of the WWTP led to considerably positive changes in the integrity of the macrozoobenthic community. The current abundances of these 'new' taxa, however, were still too low for calculating statistical differences. However, based on the observed changes that appeared within a rather short period of time, we can assume that ongoing alterations regarding the distribution of sensitive species can be statistically undermined within the next few years.

3.2.2 Saprobic index

Between 2012 and 2016, prior to as well as after the WWTP upgrade, the saprobic index at all sampling sites in the Schussen river was classified as "good" (range of 1.6 to 2.1, according to WFD [24]) (Figure 8). The saprobic index at S 4 at the Argen river was lower compared to the river Schussen, hence, the water quality, in terms of nutrients, at the Argen river was comparatively better than at the river Schussen.

Prior to the WWTP upgrade, the saprobic indices in the Schussen increased along the course of the river from site S 0 upstream of the WWTP to sites S 1 downstream of the SOB and, further on, to site S 2 directly downstream of the WWTP. Subsequently to the WWTP upgrade, the saprobic index decreased between S 1 and S 2 and, furthermore, became lower at S 2 after the upgrade compared to the prior situation.

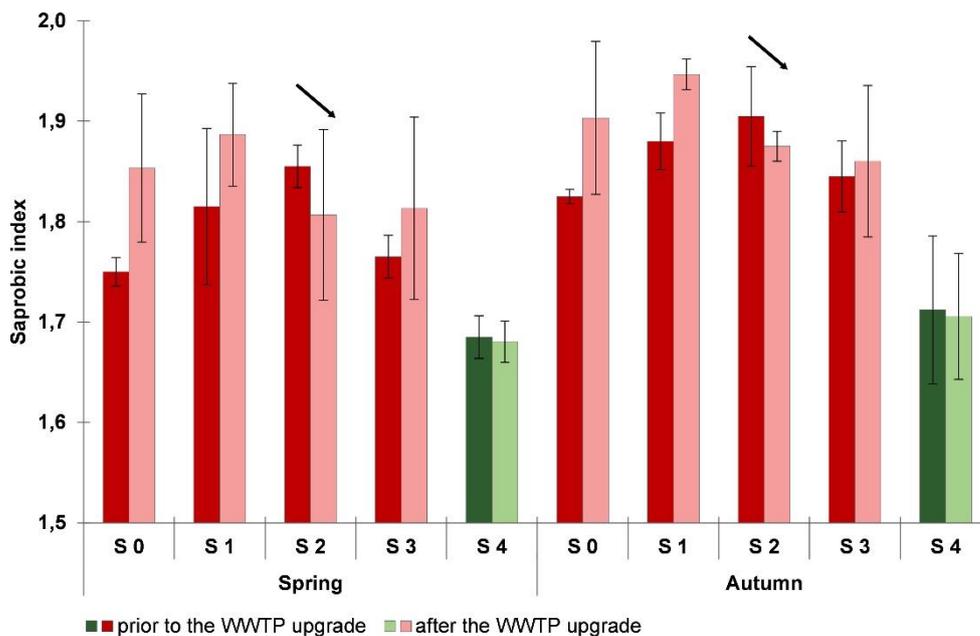


Figure 8: Saprobic index in spring and autumn prior to (2012 and 2013, dark colors) and after (2014, 2015, and 2016; light colors) the wastewater treatment plant (WWTP) upgrade. Data are shown as arithmetic means and standard deviations. Data for the sampling sites at the Schussen river are shown in red colors: S 0 upstream of the WWTP and upstream of the stormwater overflow basin (SOB) Mariatal, S 1 upstream of the WWTP and downstream of the SOB, S 2 directly downstream of the WWTP, S 3 15 km downstream of the WWTP; data for the sampling site S 4 at the Argen river are shown in green colors.

Changes in the saprobic index are caused by changes in the abundance of several macrozoobenthic taxa. As previously discussed, the number of sensitive taxa increased downstream of the WWTP after the upgrading. In contrast, the abundance of taxa which were classified as saprobic taxa and benefit from organic matter, like the leech *Erpobdella octoculata* or the sludge worm *Tubifex sp.*, decreased downstream of the WWTP after the upgrade. This indicates a slight reduction of organic substances caused by upgrading of the WWTP.

Positive changes detected for sampling site S 2 did not apply to sampling site S 3 15 km downstream of the WWTP. Subsequently to the WWTP upgrade, the saprobic index did not substantially differ from the situation prior to the expansion. The area around sampling site S 3 is characterized by intensive cultivation farming of hops and fruits, whereas around S 2 the agricultural use is rather moderate. In addition, the stream Schwarzach enters the river Schussen between S 2 and S 3. The catchment area of this tributary to the Schussen is characterized by large areas dominated by the cultivation of special crops. The abundance of sensitive species which are included in the calculation of the saprobic index can be affected by pesticides. Therefore, pesticides may induce changes with respect to the saprobic index. Sampling site S 3 might be influenced by pesticide runoff and/or manure from agricultural use which potentially has overwhelmed the positive changes achieved at sampling site S 2 by the WWTP upgrade.

4 Conclusion

Our investigations on gammarids showed that the sex ratio of gammarids sampled in the river Schussen downstream of the WWTP was significantly shifted towards females in spring and summer before the WWTP had been upgraded. Furthermore, the fecundity index of breeding females downstream of the WWTP was lower than at the upstream site. After the installation of the additional purification step, the situation has considerably changed. Fecundity indices of breeding females have been found to be comparably similar upstream and downstream of the WWTP. Three and four years after the upgrading, changes concerning the sex ratio in gammarids became obvious: the sex ratio in the gammarid population residing downstream of the WWTP was no longer shifted in favor of females. Concomitant chemical analyses [15, 47] have revealed such substances to be eliminated by the additional treatment step which could have caused these effects. Our investigations of the macrozoobenthic community integrity mirrored the changes found in our studies with gammarids. Prior to the upgrading, the total number of macrozoobenthic taxa and the number of sensitive taxa had been found to be lower downstream of the WWTP than upstream of it. After the installation of the additional treatment step, a distinctive increase of the total number of taxa and the number of sensitive taxa was apparent at the sampling site downstream of the WWTP. Therefore, the upgrade with the powdered activated carbon step was shown to be highly efficient in reducing the toxicity of the WWTP effluent and, thus, to restore invertebrate health and improve the macrozoobenthos community integrity within a rather short period of time, and, consequently, to sustainably protect aquatic ecosystems

5 Author Contributions

KP: sampling and analysis of gammarids, writing the manuscript; YC: statistical analysis of macrozoobenthic dataset; H-RK: feedback and support to analysis and draft manuscript; KW: sampling of macrozoobenthos; RT: project leader of the project SchussenAktivplus, feedback and support to analysis, major revisions on draft manuscript.

6 Funding

Studies with gammarids were funded by the MTU Umweltstiftung Bodensee. The first part of the project, SchussenAktiv (2010-2012), was funded by the Ministry for Environment, Nature Conservation and Transport Baden-Württemberg (UVM), and the foundation 'Nature and Environment' of the Regional State Bank Baden-Württemberg (LBBW). The project SchussenAktivplus was funded by the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and co-funded by the Ministry of the

Environment, Climate Protection and the Energy Sector, Baden-Württemberg. SchussenAktiv*plus* was part of the BMBF action plan 'Sustainable water management (NaWaM)' integrated in the BMBF frame program 'Research for sustainable development FONA'. It was part of the funding measure 'Risk Management of Emerging Compounds and Pathogens in the Water Cycle (RiSKWa)'. Contract period: January 2012 to June 2016, funding number: 02WRS1281J. Jedele & Partner GmbH, Ökonsult GbR, the city of Ravensburg, the AZV Mariatal and the AV Unteres Schussental have financially contributed to the project. Open access publishing was founded by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

7 Acknowledgements

The authors would like to thank the institutions that have given financial support: MTU Umweltstiftung Bodensee; Ministry for Environment, Nature Conservation and Transport Baden-Württemberg (UVM); foundation 'Nature and Environment' of the Regional State Bank Baden-Württemberg (LBBW); Federal Ministry for Education and Research (BMBF); Ministry of the Environment, Climate Protection and the Energy Sector, Baden-Württemberg. Many thanks go also to Jedele & Partner GmbH, Ökonsult GbR, the city of Ravensburg, the AZV Mariatal and the AV Unteres Schussental who financially contributed to the project. The authors are also very grateful to the Animal Physiological Ecology group of Tübingen University, especially to J. Burmester, H. Eckstein, M. Hermann, K. Reitter, and D. Schmidt for excellent work within their final theses; and to A. Dieterich, K. Bader, A. Elsässer, J. Geburzi, A. Henneberg, S. Jacob, S. Kraus, D. Maier, H. Schmiege, C. Schulz, L. Schuster, M. Schweizer, S. Schwarz, K. Vincze, S. Wilhelm, M. Wolter, and M. Ziegler for great help in the lab and during the field work. The authors also acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

8 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

9 References

- [1] Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* (1999) 107:907-938. doi: 10.1289/ehp.99107s6907
- [2] Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XC. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* (2014) 473-474:619-641. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065

- [3] Triebskorn R, Amler K, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung RM, Kneipp S, Köhler H-R, Kraus S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J, Wurm K. SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* (2013) 25:1-9. doi: 10.1186/2190-4715-25-2
- [4] Bundschuh M, Schulz R. Ozonation of secondary treated wastewater reduces ecotoxicity to *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda): are loads of (micro)pollutants responsible? *Water Research* (2011) 45:3999-4007. doi: 10.1016/j.watres.2011.05.007
- [5] Ladewig V, Jungmann D, Köhler H-R, Schirling M, Triebskorn R, Nagel R. Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (2006) 50:370-83. doi: 10.1007/s00244-005-7039-0
- [6] Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Nagel R, Triebskorn R, Köhler H-R. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (2005) 49:53-61. doi: 10.1007/s00244-004-0153-6
- [7] Schneider I, Oehlmann J, Oetken M. Impact of an estrogenic sewage treatment plant effluent on life-history traits of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Journal of Environmental Science and Health Part A Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* (2015) 50:272-81. doi: 10.1080/10934529.2015.981114
- [8] Triebskorn R (ed) (2017) Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- [9] Vincze K, Scheil V, Kuch B, Köhler H-R, Triebskorn R. Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research* (2015) 22:11822-11839. doi: 10.1007/s11356-015-4398-6
- [10] Villa S, Di Nica V, Bellamoli F, Pescatore T, Ferrario C, Finizio A, Lencioni V. Effects of a treated sewage effluent on behavioural traits in *Diamesa cinerella* and *Daphnia magna*. *Journal of Limnology* (2018) 77. doi: 10.4081/jlimnol.2018.1760
- [11] Giebner S, Ostermann S, Straskraba S, Oetken M, Oehlmann J, Wagner M. Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of in vitro endocrine activity and mutagenicity but not of in vivo reproductive toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* (2018) 25:3965-3976. doi: 10.1007/s11356-016-7540-1
- [12] Henneberg A, Triebskorn R. Efficiency of advanced wastewater treatment technologies for the reduction of hormonal activity in effluents and connected surface water bodies by means of vitellogenin analyses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Environmental Sciences Europe* (2015) 27:22. doi: 10.1186/s12302-015-0056-3
- [13] Thellmann P, Greiner-Perth K, Jacob S, Knoll M, Schäfer M, Stängle M, Ziegler M, Scheurer M, Köhler H-R, Triebskorn R. Does Waste Water Treatment Plant Upgrading with Powdered Activated Carbon Result in Reduced Water and Sediment Toxicity of the Receiving Stream? *International Journal of Water and Wastewater Treatment* (2017) 3. doi: 10.16966/2381-5299.141
- [14] Triebskorn R, Hetzenauer H. Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe* (2012) 24:1-24. doi: 10.1186/2190-4715-24-8

- [15] Scheurer M, Richter D, Sacher F, Spurenstoffe: Anlagenbewertung, in Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf, Triebskorn R, Editor. 2017, Eberhard-Karls Universität Tübingen. p. 161-181.
- [16] Brehm J, Meijering MP, Fließgewässerkunde – Einführung in die Ökologie der Quellen, Bäche und Flüsse. 1996, Quelle und Meyer Verlag: Wiesbaden.
- [17] Pöckl M. Beiträge zur Ökologie des Bachflohkrebses (*Gammarus fossarum*) und Flussflohkrebses (*Gammarus roeseli*). Natur und Museum (1993) 123.
- [18] Schwoerbel J, Einführung in die Limnologie. 1999, Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.
- [19] Meijering MP, Pieper HG. Die Indikatorbedeutung der Gattung *Gammarus* in Fließgewässern. Decheniana-Beihefte (1982) 26.
- [20] De-La-Ossa-Carretero JA, Del-Pilar-Ruso Y, Giménez-Casaldueiro F, Sánchez-Lizaso JL, Dauvin JC. Sensitivity of amphipods to sewage pollution. Estuarine, Coastal and Shelf Science (2012) 96:129-138. doi: 10.1016/j.ecss.2011.10.020
- [21] Gross MY, Maycock DS, Thorndyke MC, Morritt D, Crane M. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. Environmental Toxicology and Chemistry (2001) 20:1792-1797. doi: 10.1002/etc.5620200824
- [22] Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski K-U, Nagel R, Köhler H-R, Triebskorn R. Bisphenol A in Artificial Indoor Streams: II. Stress Response and Gonad Histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). Ecotoxicology (2005) 15:143-156. doi: 10.1007/s10646-005-0044-2
- [23] Bundschuh M, Schulz R. Population response to ozone application in wastewater: an on-site microcosm study with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). Ecotoxicology (2011) 20:466-473. doi: 10.1007/s10646-011-0599-z
- [24] European Commission. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Communities (2000)
- [25] Adámek Z, Orendt C, Wolfram G, Sychra J. Macrozoobenthos response to environmental degradation in a heavily modified stream: Case study the Upper Elbe River, Czech Republic. Biologia (2010) 65:527-536.
- [26] Berenzen N, Kumke T, Schulz HK, Schulz R. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. Ecotoxicol Environ Saf (2005) 60:37-46. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.10.010
- [27] Bonzini S, Finizio A, Berra E, Forcella M, Parenti P, Vighi M. Effects of river pollution on the colonisation of artificial substrates by macrozoobenthos. Aquatic Toxicology (2008) 89:1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.008>
- [28] Henneberg A, Bender K, Blaha L, Giebner S, Kuch B, Köhler H-R, Maier D, Oehlmann J, Richter D, Scheurer M, Schulte-Oehlmann U, Sieratowicz A, Ziebart S, Triebskorn R. Are in vitro methods for the detection of endocrine potentials in the aquatic environment predictive for in vivo effects? Outcomes of the projects SchussenAktiv and SchussenAktivplus in the Lake Constance area, Germany. PloS one (2014) 9:e98307. doi: 10.1371/journal.pone.0098307
- [29] Maier D, Benisek M, Blaha L, Dondero F, Giesy JP, Köhler H-R, Richter D, Scheurer M, Triebskorn R. Reduction of dioxin-like toxicity in effluents by additional wastewater treatment and related effects in fish. Ecotoxicology and Environmental Safety (2016) 132:47-58. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.036
- [30] Maier D, Blaha L, Giesy JP, Henneberg A, Köhler H-R, Kuch B, Osterauer R, Peschke K, Richter D, Scheurer M. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in

- wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Research* (2015) 72:127-144. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.050
- [31] Langmaier S. Ökologische Daten zum Vorkommen von Steinfliegen-Larven (Insecta: Plecoptera) im Bundesland Salzburg, Österreich. *Mitteilungen aus dem Haus der Natur Salzburg* (2006) 17.
- [32] Di Lascio A, Rossi L, Carlino P, Calizza E, Rossi D, Costantini ML. Stable isotope variation in macroinvertebrates indicates anthropogenic disturbance along an urban stretch of the river Tiber (Rome, Italy). *Ecological Indicators* (2013) 28:107-114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.006>
- [33] Welton JS. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biology* (1979) 9:263-275. doi: 10.1111/j.1365-2427.1979.tb01508.x
- [34] Pöckl M. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers. *Freshwater Biology* (1993) 30:73-91. doi: 10.1111/j.1365-2427.1993.tb00790.x
- [35] Pöckl M, Webb BW, Sutcliffe DW. Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshwater Biology* (2003) 48:53-66. doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.00967.x
- [36] Borowsky B. The Use of the Males' Gnathopods During Precopulation in Some Gammaridean Amphipods. *Crustaceana* (1984) 47:245-250. doi: 10.1163/156854084X00504
- [37] Sures B, Radszuweit H. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Journal of Helminthology* (2007) 81:191-7. doi: 10.1017/S0022149X07751465
- [38] Sures B. Environmental parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite* (2008) 15:434-8. doi: 10.1051/parasite/2008153434
- [39] Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Triebkorn R. Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2014) 106:115-125. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.011
- [40] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (1976) 72:248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [41] Haase P, Sundermann A, Schindehütte K. Informationstext zur Operationellen Taxaliste als Mindestanforderung an die Bestimmung von Makrozoobenthosproben aus Fließgewässern zur Umsetzung der EU-Wasserrahmenrichtlinie in Deutschland. *Forschungsinstitut Senckenberg, Abteilung für Limnologie und Naturschutzforschung*. www.fliessgewaesserbewertung.de/download/bestimmung (2004)
- [42] Schwab H, Süßwassertiere: ein ökologisches Bestimmungsbuch. 1995, Ernst Klett Verlag: Stuttgart.
- [43] Pöckl M, Humpesch UH. Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology* (1990) 23:441-455. doi: 10.1111/j.1365-2427.1990.tb00286.x
- [44] Watts MM, Pascoe D, Carroll K. Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2002) 21:445-450. doi: 10.1002/etc.5620210230
- [45] Kuch B, Technologiebewertung: E-Screen Assay, in *Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf*, Triebkorn R, Editor. 2017, Eberhard Karls Universität Tübingen. p. 210-217.

- [46] Peschke K, Triebkorn R, Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese auf das Ökosystem der Schussen: Limnologische Analytik, in Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf, Triebkorn R, Editor. 2017, Eberhard-Karls Universität Tübingen. p. 248-249.
- [47] Scheurer M, Richter D, Sacher F, Spurenstoffe: Auswirkungen auf das Gewässer, in Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf, Triebkorn R, Editor. 2017, Eberhard-Karls Universität Tübingen. p. 250-267.
- [48] Triebkorn R, Blaha L, Engesser B, Güde H, Hetzenauer H, Henneberg A, Köhler H-R, Kraus S, Maier D, Peschke K, Thellmann P, Vogel H-J, Kuch B, Oehlmann J, Rault M, Suchail S, Rey P, Richter D, Sacher F, Weyhmüller M, Wurm K. SchussenAktiv–Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* (2013) 8:427-437.
- [49] Mazurová E, Hilscherová K, Šídlová-Štěpánková T, Köhler H-R, Triebkorn R, Jungmann D, Giesy JP, Bláha L. Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and in vitro effects. *Journal of Soils and Sediments* (2010) 10:423-433. doi: 10.1007/s11368-009-0166-x
- [50] Wilhelm S, Henneberg A, Triebkorn R. "Auswirkungen des Ausbaus der Kläranlage Langwiese auf das Ökosystem der Schussen: Stressproteinanalysen". In: Triebkorn R, editor. Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf. Eberhard-Karls Universität Tübingen, Universitätsbibliothek (2017). p. 306-310.
- [51] Ofenböck T, Moog O, Hartmann A, Stubauer I. Leitfaden zur Erhebung der Biologischen Qualitätselemente, Teil A2–Makrozoobenthos. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. Umwelt und Wasserwirtschaft (2010) 211.
- [52] Moog O, Graf W, Janecek B, Ofenböck T, Sensitive Taxa, in Fauna Aquatica Austriaca, Moog O and Hartmann A, Editors. 2017, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft Österreich: Wien.

Publikationsliste

- Triebskorn R, Blaha L, Engesser B, Güde H, Henneberg A, Hetzenauer H, Köhler H-R, Kraiss S, Kuch B, Maier D, Oehlmann J, Peschke K, Rault M, Rey P, Richter D, Sacher F, Suchail S, Thellmann P, Weyhmüller M, Wurm K, Vogel H-J (2013): SchussenAktiv – Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* Nr. 8: 427-436. DOI: 10.3243/kwe2013.08.001
- Triebskorn R, Amler A, Blaha L, Gallert C, Giebner S, Güde H, Henneberg A, Hess S, Hetzenauer H, Jedele K, Jung R-M, Kneipp S, Köhler H-R, Kraiss S, Kuch B, Lange C, Löffler H, Maier D, Metzger J, Müller M, Oehlmann J, Osterauer R, Peschke K, Raizner J, Rey P, Rault M, Richter D, Sacher F, Scheurer M, Schneider-Rapp J, Seifan M, Spieth M, Vogel H-J, Weyhmüller M, Winter J, Wurm K (2013): SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe* 25: 2. DOI: 10.1186/2190-4715-25-2
- Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, Wurm K, Triebskorn R (2014): Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems. Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106: 115-125. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.011
- Peschke K, Burmester J, Hermann M, Köhler H-R, Reitter K, Scheurer M, Wurm K, Triebskorn R (2016): Reaktionen von Flohkrebse und Makrozoobenthos auf die Nachrüstung einer Kläranlage mit einer Pulveraktivkohlestufe. *gwf – Wasser/Abwasser Jahrgang* 157 Heft 4: 370-379.
- Peschke K, Capowiez Y, Köhler H-R, Wurm K, Triebskorn R: Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macroinvertebrates: individual and community responses. *Frontiers in Environmental Science* 7: 64; DOI: 10.3389/fenvs.2019.00064

Danksagung

Kaum zu glauben, aber wahr – meine Arbeit ist nun endlich fertiggestellt und kann gedruckt werden. Auf meinem langen Weg bis zu diesem Ziel haben mich viele tolle Menschen begleitet, denen ich allen von Herzen danken möchte!

Ein ganz besonderer Dank geht an erster Stelle an meine „Doktoreltern“ Prof. Dr. Rita Triebkorn und Prof. Dr. Heinz-R. Köhler. Danke für euer Vertrauen und das stets offene Ohr, das ihr immer für mich habt! Danke für eure riesige Unterstützung und Hilfe in schweren Zeiten und die schier unendliche Geduld in der letzten Fertigstellungsphase. Danke, dass ihr so eine angenehme Arbeitsatmosphäre schafft und mir die Möglichkeit bietet, in eurem Team mitzuarbeiten – das macht mich froh und glücklich!

Prof. Dr. Oliver Betz und Prof. Dr. Henner Hollert danke ich sehr für die Bereitschaft an meiner Disputation mitzuwirken. Es wäre gelogen zu sagen „ich freue mich darauf“, aber mit Aussicht auf diese Unterstützung blicke ich dem Tag doch um einiges gelassener entgegen. Danke!

Ein großer Dank gilt der MTU Umweltstiftung Bodensee für die Finanzierung des ersten Teils meiner Arbeit. Insbesondere Michael Spiegel und Dr. Gerd Schröder danke ich sehr für ihr Interesse an meiner Arbeit und die netten Projekttreffen und Gespräche.

Ich danke Dr. Karl Wurm vom Gewässerökologischen Labor Starzach für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit und die vielen guten Tipps und Hilfestellungen bei limnologischen und makrozoobenthischen Fragen. Herzlichen Dank, Charly!

Für die vielen schönen Erlebnisse, Lachflashes und Musikeinlagen während der manchmal doch anstrengenden Installation der Bypass-Anlagen danke ich ganz besonders Anja Henneberg, Carolin Schultz und Diana Maier. Es war eine ganz tolle Zeit mit euch! Um es mit Anjas Worten zu sagen: herrlich!

Ein weiterer großer Dank gilt allen Mitgliedern und Ehemaligen der „Physiologischen Ökologie der Tiere“, insbesondere Andreas Dieterich, Carla Lorenz, Hannah Schmiege, Katja Bader, Krisztina Vincze, Michael Ziegler, Paul Thellmann, Sabrina Wilhelm, Stefanie Jacob und Simon Schwarz. Danke, dass ich immer auf euch zählen konnte, wenn ich aus füßischen Gründen nicht hundertprozentig probenahmetauglich war! Das hat mir unglaublich geholfen und der Stein im Brett sei euch gewiss ☺ Danke auch für die vielen schönen und unterhaltsamen Kaffeepäuschen und gemeinsamen Kochaktionen.

Danina Schmidt, Helene Eckstein, Janne Burmester, Katharina Reitter, Markus Hermann und Teresa Carl danke ich sehr für ihr Engagement und ihre tolle Arbeit im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten. Es hat mit jedem Einzelnen von euch echt Spaß gemacht!

An Margret Galli ein herzliches Dankeschön für die schönen Kaffeepläuschchen in der Früh. So lässt es sich gut in den Tag starten - Danke!

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Christine Hepper. Danke für die netten Schwätzle zwischendurch und deine immerwährende Hilfsbereitschaft!

Für die schönen Care-Pakete, die seltsamerweise immer gerade zum richtigen Zeitpunkt eintrafen, und für die moralische Unterstützung und Aufmunterung danke ich sehr meiner lieben Großcousine Gudrun. Jetzt kann wieder gestrickt werden!

Ein dickes Dankeschön geht an Mona Schweizer. Danke, dass ich dich jederzeit um Rat fragen durfte und danke für deine vielen Hilfestellungen und hilfreichen Korrekturen! Und vor allem auch für die vielen schönen Spieleabende, von denen hoffentlich noch viele folgen werden. Sollte es keine EXIT-Games mehr geben, dann puzzeln wir eben 😊

Für die Begleitung durch dick und dünn und die Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich von ganzem Herzen meiner Freundin Stefanie Kraus. Danke, dass ich immer auf dich zählen kann, egal was passiert! Danke für die unglaublich vielen schönen Stunden, die wir schon miteinander erlebt haben! Danke, dass du immer eine Matratze inklusive schnurrender Büsis für mich parat hast. Ich könnte die Liste jetzt endlos fortsetzen - kurz gesagt: Es ist so wunderschön, dass ich dich an meiner Seite habe!

Zu guter Letzt gilt mein innigster Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern ♥ und Christian ♥ Die Dankbarkeit und Liebe, die ich für euch empfinde, lassen sich nicht in Worte fassen.