

Abschlussbericht

Literaturstudie zu Auswirkungen von Spurenstoffen auf aquatische Organismen in Fließgewässern und Empfehlungen für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring

Projekt O 8.20
des Länderfinanzierungsprogramms „Wasser, Boden und Abfall“ 2020

Auftraggeber



Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser

Bearbeitung

Prof. Dr. Rita Triebkorn, Steinbeis Transferzentrum für Ökotoxikologie und Ökophysiologie Rottenburg
Dr. Sabrina Wilhelm, Universität Tübingen

mit Unterstützung durch
Dr. Karl Wurm, Gewässerökologisches Labor Starzach

Fachliche Begleitung

- LAWA-Expertenkreis „Biologische Bewertung Fließgewässer und Interkalibrierung“,
Federführung Antje Köhler
- Projektbeirat bestehend aus folgenden Personen:

Antje Köhler (BE, SENUVK)
Kristin Stolberg (BY, LfU)
Klaus Weiss (BY, LfU)
Julia Schwaiger (BY, LfU)

Eva Mehler (NI, NLWKN)
Jürgen Zipperle (BW, LUBW)
Franziska Neumann (MV, LUNG)
Ingo Warnke (UBA)

Stand: 18.02.2022

Inhalt

Tabellenverzeichnis.....	iv
Glossar	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
2 Methoden	6
2.1 Vorgehensweise bei der Literaturrecherche.....	6
2.2 Vorgehensweise bei der Bewertung der Eignung der Methoden für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring.....	6
3 Ergebnisse der Literaturrecherche	8
3.1 Auswirkungen von Spurenstoffen auf aquatische Organismen von Fließgewässern.....	8
3.2 Bewertungsverfahren nach EU-WRRL und Möglichkeiten ihres Einsatzes zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen	11
3.2.1 Grundlagen des biologischen und chemischen Monitorings gem. EU- WRRL	11
3.2.2 Eignung von Metrics nach WRRL zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen	13
3.3 Effektbasiertes Monitoring und Spurenstoffwirkungen	16
3.3.1 Historische Entwicklung des effektbasierten Monitorings	16
3.3.2 Grundlagen für das effektbasierte Monitoringkonzept für Spurenstoffe ...	17
3.3.3 Nachweis von Spurenstoffwirkungen im Rahmen eines effektbasierten Monitorings	19
4 Empfehlungen für die Durchführung eines investigativen und effektbasierten Spurenstoffmonitorings	33
4.1 Voruntersuchung.....	34
4.1.1 Beschaffung vorhandener Informationen.....	34
4.1.2 Vor-Ort-Begehungen	34
4.1.3 Basis-Check zum Ausschluss von Nicht-Spurenstoffwirkungen	36
4.2 Hauptuntersuchung (effektbasiertes Spurenstoffmonitoring)	38
4.3 Werkzeugkasten für ein anlassbezogenes, gewässerspezifisches und effektbasiertes Spurenstoffmonitoring.....	39
4.3.1 Szenario 1: Gebiete mit Einfluss von Landwirtschaft	39
4.3.2 Szenario 2: Gebiete mit Einfluss von Industrie	40
4.3.3 Szenario 3: Gebiete im Siedlungsraum	40

4.3.4	Szenario 4: Gebiete mit Einfluss von Krankenhäusern als Indirekteinleiter .	40
4.3.5	Szenario 5: Gebiete mit Einfluss von Straßenverkehr	40
4.3.6	Szenario 6: Gebiete in renaturierten Gewässerbereichen bzw. Naturschutzgebieten	41
4.4	Chemische Analytik zur Ursachen-Spezifizierung für nachgewiesene Spurenstoffwirkungen	44
5	Zusammenfassung	45
	Literaturverzeichnis	47
	Anlagen	78
Anlage 1	Übersicht über Biotests und Biomarkeranalysen, die in Gewässeruntersuchungen eingesetzt werden	79

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Metrics zur Beschreibung des ökologischen Zustands von Fließgewässern anhand der Qualitätskomponente MZB und ihre Sensitivität für verschiedene Belastungen (nach Asterics (2013) und Asterics-Perlodes (2020))</i>	14
<i>Tabelle 2: Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden zum Nachweis von Effektpotenzialen und Effekten beim Spurenstoffmonitoring</i>	19
<i>Tabelle 3: In einigen Behörden* etablierte Biotests</i>	22
<i>Tabelle 4: In einigen Behörden * etablierte Biomarkerstudien</i>	25
<i>Tabelle 5: Biotests, die auf Basis der in Kap. 2.2 genannten Kriterien für das Monitoring von Spurenstoffwirkungen empfohlen werden</i>	26
<i>Tabelle 6: Biomarker, die auf Basis der in Kap. 2.2 genannten Kriterien für das Monitoring von Spurenstoffwirkungen empfohlen werden</i>	30
<i>Tabelle 7: Passives und aktives Monitoring: Vor- und Nachteile nach VDI 4230 Blatt 5</i>	36
<i>Tabelle 8: Werkzeugkasten für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring in Gebieten mit Einfluss von Landwirtschaft oder Industrie sowie im Siedlungsraum</i> .	42
<i>Tabelle 9: Werkzeugkasten für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring in Gebieten mit Einfluss von Krankenhäusern, Straßenverkehr sowie in renaturierten Gewässerbereichen bzw. Naturschutzgebieten</i>	43

Glossar

Aktives Monitoring	Aktives Einbringen von Organismen aus Zuchten oder von anderen Stellen eines Gewässers in Käfigen bzw. Hälterungseinheiten und deren Exposition im Gewässer über einen definierten Zeitraum.
Biomarker	In oder an lebenden Organismen messbare Veränderungen von biologischen Prozessen, die eine Umweltbelastung anzeigen. Diese Veränderungen von biologischen Prozessen können entweder bei aktiv exponierten oder bei im Freiland entnommenen Organismen bestimmt werden. Standards für die Durchführung solcher Untersuchungen sind in der Richtlinie VDI 4230 Blatt 5 für Fische niedergeschrieben; für wirbellose Tiere befindet sich eine vergleichbare Richtlinie momentan kurz vor der Phase des Gründrucks.
Biomonitoring	Das zeitlich regelmäßig wiederholte Beobachten und Messen des Zustandes und Bestandes von Pflanzen und Tieren und deren Gemeinschaften. Aus Zustands- oder Bestandsänderungen der Lebewelt werden Rückschlüsse auf Qualität und Quantität von chemisch/physikalischen Umweltveränderungen anthropogenen Ursprungs gezogen (LAWA, 2000)
Biotests	Biologische Verfahren, mit denen (1) im Labor ökotoxikologische Wirkpotentiale in Umweltproben <i>in vivo</i> (an lebenden Organismen) oder <i>in vitro</i> (in Zellsystemen) sowie (2) Wirkungen bei im Gewässer exponierten Organismen <i>in situ</i> , d. h. vor Ort nachgewiesen werden können. Mit Biotests kann nicht nur die ökotoxikologische Wirkung einzelner Schadstoffe, sondern auch die summarische Wirkung von Schadstoffgemischen bestimmt werden. Die Verfahren sind im Idealfall nach DIN, ISO oder OECD standardisiert oder sie werden anhand von Standardarbeitsanweisungen (SOP – Standard Operating Procedure) durchgeführt.
Spurenstoffe	Vom Menschen hergestellte organische Verbindungen, die in geringen Mengen (Nano- bis Mikrogramm pro Liter) in der aquatischen Umwelt nachweisbar sind. Unter den Begriff fallen z. B. Inhaltsstoffe aus Arznei-, Reinigungs-, Körperpflege- und Pflanzenschutzmitteln ebenso wie Industrie- und Haushaltschemikalien.
Wirkpotentiale	Mit Hilfe von Wirkmechanismus-spezifischen Biotests in Umweltproben nachgewiesene Effekte, die auf potentielle Wirkungen mit vergleichbarem Wirkspektrum in Freilandorganismen hinweisen.

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
ABW	Abwasser
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
DIN	Deutsches Institut für Normung
EPT-Taxa	Taxa der Ephemeroptera (Eintagsfliegen), Plecoptera (Steinfliegen) und Trichoptera (Köcherfliegen)
EROD Assay	Ethoxyresorufin-O-deethylase Assay
FET	Fischembryotoxizitäts-Test
GST	Glutathion-S-Transferase Aktivität
HSP	Hitzeschockproteine / Stressproteine
ISO	Internationale Organisation für Normung
KA	Kläranlage
LFU	Landesamt für Umwelt
LUBW	Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg
MZB	Makrozoobenthos
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development / Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OW	Oberflächenwasser
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons / polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
RKB	Regenklärbecken
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RÜ	Regenüberlauf
RÜB	Regenüberlaufbecken
SOP	Standard Operating Procedure
TOC	Total Organic Carbon / gesamter organischer Kohlenstoff
TW	Trinkwasser
UQN	Umweltqualitätsnorm
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
Vtg	Vitellogenin
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
YES	Yeast Estrogen Screen
ZHK-UQN	Zulässige Höchstkonzentration

1 Einleitung

Ziel der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL; 2000/60/EG) ist es, den guten ökologischen Zustand bzw. ein gutes ökologisches Potenzial sowie einen guten chemischen Zustand der europäischen Gewässer wiederherzustellen bzw. zu erhalten.

In Deutschland sind laut Umweltbundesamt (2017) weniger als 10% der bewerteten natürlichen Fließgewässerstrecke in einem sehr guten oder guten ökologischen Zustand. Bei erheblich veränderten Gewässern und künstlichen Gewässern erreichen bezogen auf die bewertete Fließstrecke nur 2% bzw. 5% das gute oder höchste ökologische Potenzial. In weniger als einem Drittel aller als natürlich ausgewiesenen Fließstrecken wiesen die Qualitätskomponenten Fische und Makrophyten einen guten oder sehr guten Zustand auf. Für Organismen des Makrozoobenthos war dies bei weniger als der Hälfte der Fall. Verantwortlich gemacht werden hierfür neben hydromorphologischen Defiziten sowohl die Nährstoffbelastung als auch Belastungen mit Chemikalien.

Chemikalienbelastungen werden sowohl bei der Bewertung des ökologischen Zustands bzw. Potentials betrachtet als auch bei der Bewertung des chemischen Zustands eines Gewässers berücksichtigt. Überwacht wird hierbei die Einhaltung von Umweltqualitätsnormen der in den Anlagen 6 und 8 der OGewV (2016) genannten Stoffe.

Während Daten zu flussgebietspezifischen Stoffen (Anlage 6 OGewV, 2016) zur Bewertung des ökologischen Zustands herangezogen werden, wird der chemische Zustand anhand der Überschreitung von Umweltqualitätsnormen der in Anlage 8 Tabellen 1 und 2 der OGewV, gelisteten Stoffe ermittelt (s. 3.2.1). Dieser ist deutschlandweit durchgehend „nicht gut“. Hinzu kommt, dass immer mehr nicht überwachte Stoffe aus dem kommunalen Bereich und der Landwirtschaft, wie z. B. Inhaltsstoffe aus Arznei-, Reinigungs-, Körperpflege- oder Pflanzenschutzmitteln sowie Industrie- und Haushaltschemikalien in niedrigen Konzentrationsbereichen, als sog. Spurenstoffe, im Oberflächenwasser nachgewiesen werden (z. B. Brauch, 2011; Triebkorn und Hetzenauer, 2012). Dies ist unter anderem der Tatsache zu schulden, dass sich das Stoffspektrum stetig vergrößert und die Verbrauchsmengen an Chemikalien zunehmen, aber auch weil die Nachweisgrenzen in der chemischen Analytik sinken. Die genannten Stoffe gelangen über Punktquellen (Kläranlagen, Regenüberlaufbecken, Regenklärbecken, gewerbliche Direktleitungen), diffus (z. B. aus der Landwirtschaft, von Verkehrswegen, über Altlasten bzw. Deponien) oder als atmosphärische Deposition in Gewässer und treten in der Regel in unterschiedlichsten Mischungen auf. Ihre möglichen Auswirkungen auf Gewässerökosysteme werden mittlerweile als besorgniserregend eingestuft (Umweltbundesamt, 2017). In der vorliegenden Studie wird der Begriff „Spurenstoffe“ für vom Menschen produzierte organische Verbindungen verwendet, die in geringen Mengen (Nano- bis Mikrogramm pro Liter) in der aquatischen Umwelt nachweisbar sind.

Die Bedeutung von Kläranlagen für den Eintrag von Spurenstoffen in Gewässer und deren negative Auswirkungen auf die aquatische Flora und Fauna ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus von Wissenschaft und Öffentlichkeit gerückt (z. B. Margot et al., 2015; Kim und Zoh, 2016; BUND, 2017; Mor et al., 2019). Das gilt sowohl für große und mittlere Kläranlagen im urbanen Bereich als auch für Regionen mit vielen kleinen Klärwerken oder dezentraler Abwasserbehandlung.

Den politischen Rahmen für Maßnahmen zur Reduktion von Spurenstoffeinträgen in die Umwelt generell, aber auch über Kläranlagen bietet der Europäische *Green Deal* bzw. der am 12. Mai 2021 verabschiedete EU-Aktionsplan *"Towards a Zero Pollution for Air, Water and Soil"*. In diesem wird gefordert, dass bis 2050 die Verschmutzung von Luft, Wasser und Boden

auf ein Niveau reduziert wird, das für Mensch und Umwelt als unbedenklich gilt (Umweltbundesamt, 2021a).

Vor diesem Hintergrund widmet sich auch der seit 5 Jahren stattfindende Stakeholder-Dialog zur Spurenstoffstrategie des Bundes, dessen Ergebnisse in einem Policy Paper sowie einem Ergebnisbericht zusammengefasst sind (BMU/UBA, 2017, 2019a), und der gerade abgeschlossene Wasserdialo g des Bundes als Grundlage für den Entwurf der Nationalen Wasserstrategie (BMU, 2021) der Thematik „Spurenstoffe in der Umwelt“. Beide Dialogprozesse verfolgen das Ziel, Chemikalieneinträge in die Natur auf der Basis eines ganzheitlichen Ansatzes zu verringern und sowohl Maßnahmen an der Quelle (z. B. bei der Arzneimittelentsorgung) als auch End-of-Pipe-Lösungen (z. B. auf Kläranlagen) voranzutreiben. Zur weitergehenden Abwasserbehandlung auf Kläranlagen wurde im Rahmen des Spurenstoffdialogs ein Orientierungsrahmen zur Reduktion von Spurenstoffeinträgen formuliert. Dieser beschreibt Kriterien und Wege zur Auswahl von Kläranlagen, für die eine weitergehende Abwasserreinigung empfohlen wird. Zudem wurde eine Vorgehensweise zur Relevanzbewertung von Spurenstoffen erarbeitet, die im Rahmen einer gerade abgeschlossenen Pilotphase mit ausgewählten Stoffen erprobt wurde. Durch das im Jahre 2021 neu gegründete Spurenstoffzentrum am UBA wird diese Methode derzeit finalisiert und künftig angewendet. Handlungsempfehlungen für Maßnahmen zur Reduktion von Spurenstoffeinträgen in Gewässer und zur verbesserten Abwasserreinigung wurden allerdings auch schon früher in Strategiepapieren, z. B. des Umweltbundesamts (Umweltbundesamt 2015, 2018), von verschiedenen Bundesländern und Spurenstoff-Kompetenzzentren (z. B. UM-BW, 2012; ARGE, 2015; Launay, 2020) oder in länderübergreifenden Papieren (z. B. DWA, 2015; LAWA, 2016; IKS R, 2019) formuliert. Die Rheinministerkonferenz beschloss so z. B. im Februar 2020, bis zum Jahr 2040 den Eintrag von Mikroverunreinigungen in den Rhein über kommunale Kläranlagen, Industrie und aus der Landwirtschaft um mindestens 30 % zu reduzieren.

Im Rahmen zahlreicher Forschungsprojekte weltweit konnte die Effizienz der weitergehenden Abwasserreinigung für die Reduktion von Spurenstoffen bzw. deren Wirkpotentiale gezeigt werden (z. B. Howe et al., 2011; Kienle et al., 2011; Lyko et al., 2012; Eggen et al., 2014; Vogel et al., 2014; Ashauer, 2016; Triebskorn, 2017; Völker et al., 2019). Darüber hinaus hat das deutsche Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) das Förderprogramm RiS-KWa (Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf) ins Leben gerufen, im Rahmen dessen 12 Forschungskonsortien Möglichkeiten und Effizienz der weitergehenden Abwasser- und Mischwasserbehandlung zur Reduktion des Eintrags von Spurenstoffen und Keimen in den Wasserkreislauf untersuchten. Eines dieser RiS-KWa-Projekte (SchussenAktivplus) beschäftigte sich nicht nur mit Möglichkeiten der Spurenstoffreduktion auf Kläranlagen, sondern untersuchte auch die Auswirkungen einer zusätzlichen Reinigungsstufe auf der Basis von Pulveraktivkohle auf Fische und Invertebraten im aufnehmenden Gewässer (Schussen). Deren Gesundheitszustand sowie der Zustand der Biozönose war unterhalb der Kläranlage nach ihrem Ausbau deutlich besser als vor der Maßnahme (Triebskorn, 2012; Wilhelm et al., 2017, 2018; Peschke et al., 2019; Triebskorn et al., 2019). Auch in früheren Projekten wurden bereits positive Effekte der weitergehenden Abwasserreinigung für wirbellose Gewässerorganismen und Fische gezeigt. (Bundschuh et al., 2011b; Stalter et al., 2011; Margot, 2013; Triebskorn et al., 2014b; Beijer et al., 2017; Thellmann et al., 2017b). Weitere Datenanalysen aus investigativen Untersuchungen zu Auswirkungen der weitergehenden Abwasserreinigung kommen zum Ergebnis, dass *in vitro* Tests und *in vivo* Untersuchungen an Schnecken sowie *in situ*-Untersuchungen mit Flohkrebse n in der Lage sind, die Reduktion östrogenen und anderer toxischer Wirkpotentiale im Abwasser abzubilden, und dass sich dies auch teilweise über Veränderungen verschiedener ökologischer Metrics darstellen lässt (Kap. 3.2.2).

Um den Erfolg künftiger und bereits initiiertter Maßnahmen zur Spurenstoffreduktion für aquatische Ökosysteme gezielter dokumentieren und in Fällen von unstimmgigen Bewertungen die Bedeutung von Spurenstoffen für ökosystemare Veränderungen besser abschätzen und bewerten zu können, ist ein Monitoringkonzept notwendig, durch das Spurenstoffwirkungen von anderen Einflüssen getrennt abgebildet werden. Durch das vorliegende Projekt soll hierfür ein Werkzeugkasten empfohlen werden, der auf den recherchierten Daten basiert und das in der EU-WRRL etablierte Bewertungssystem in diesem Zusammenhang ergänzen kann.

Mit den derzeit im Rahmen der EU-WRRL eingesetzten und etablierten Bewertungsmethoden ist zwar eine Bewertung des ökologischen Zustands der Gewässer möglich, und es können Zusammenhänge zwischen Belastungen durch Nährstoffe und biologischen Indizes gezeigt werden, allerdings ist ein monokausaler Zusammenhang für Belastungen mit Spurenstoffen noch Gegenstand der Forschung. So traten, wie beispielsweise für Makrophyten im Rahmen des Symposiums „Wirkungen von Xenobiotika aus der Land- und Forstwirtschaft auf stehende Gewässer“, LfU Brandenburg, 2. Oktober 2020, berichtet, Fälle auf, bei welchen Lücken im Artenbestand nicht mit der Bewertung des Gewässerzustandes nach WRRL zur Deckung gebracht werden konnten; trotz guter Bewertungen nach EU-WRRL waren hier deutliche biologische Defizite in der Artengemeinschaft der untersuchten Gewässer nachzuweisen. Dies war auch am Neckar bei Tübingen der Fall (Triebskorn et al., 2020). Thellmann et al. (2017a) zeigten weiterhin, dass auch strukturell sehr gut ausgestaltete Fließgewässer einen nicht optimalen Artenbestand aufweisen können. Brettschneider et al. (2019a, b) berichten von Renaturierungsmaßnahmen, die bei vorhandener Spurenstoffbelastung nicht zu dem gewünschten Erfolg führten.

Vor diesem Hintergrund sind Informationen darüber, welchen Anteil Spurenstoffe zur Gesamtbelastung unserer Gewässer beitragen, und in welchem Maße sie für Veränderungen in der Vitalität und Resilienz von Gewässerorganismen sowie für Störungen in der Biozönose verantwortlich zu machen sind, von großer Bedeutung.

Welche der in der EU-WRRL etablierten Metrics ggf. doch für ein solches effektbasiertes Spurenstoffmonitoring eingesetzt werden können, wurde in besonderem Maße für den SPEAR_{pesticides}-Index, aber auch für andere ökologische Indices im Rahmen mehrerer Projekte untersucht (z. B. Brinke et al., 2017; Loske, 2017; Wick et al., 2019). Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch nicht eindeutig und sprechen in vielen Fällen eher dafür, dass selbst der SPEAR-Index, dem ursprünglich eine sehr spezifische Indikationskraft für Pestizide (v. a. Insektizide) zugesprochen wurde, durch zahlreiche weitere Faktoren beeinflusst werden (s. Kapitel 3.2.2). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, stoffspezifischere Indikatoren in den Blick zu nehmen. Zur Verfügung stehen hierfür Wirkmechanismus-basierte Biotests sowie Biomarker, die, in sinnvoller Kombination eingesetzt, in der Lage sind, Effektpotentiale für verschiedene Wirkstoffklassen im Oberflächenwasser nachzuweisen und ihre Auswirkungen in lebenden Organismen zu beschreiben. Detaillierte Informationen zu Vor- und Nachteilen dieser Methoden, zu Voraussetzungen für ihren Einsatz und zu Einsatzbereichen sind ebenso wie eine detaillierte Methodenpalette in dem 2014 von der EU herausgegebenen „*Technical report on aquatic effect-based monitoring tools*“ (Wernersson et al., 2015) enthalten. Auch im Rahmen des EU-Projekts SOLUTIONS wurden Empfehlungen für den Einsatz effektbasierter Methoden im Gewässermonitoring formuliert (Brack et al., 2017, 2018, 2019a, b; Brack, 2019). Erfolgreich eingesetzt wurden solche Methodenpaletten z. B. im oben erwähnten Projekt SchussenAktivplus (Triebskorn et al., 2019) ebenso wie in weiteren Projekten mit dem Ziel, Spurenstoffwirkungen in Gewässern zu detektieren (Kienle et al., 2011; Brack et al., 2019a; Schmitz et al., 2021).

Vor diesem Hintergrund wurde eine Literaturstudie zu den Wirkungen von Spurenstoffen auf aquatische Organismen von Fließgewässern beauftragt (LFP-Projekt Nr. O 8.20, genehmigt

auf der 159. LAWA-Vollversammlung, 19./20.03.2020). Der Auftrag wurde für das am 15. Januar 2020 von der Autorin dieses Berichts eingereichte Angebot erteilt, in dem die Zielsetzung der Studie wie folgt formuliert wurde:

„Im Rahmen der angebotenen Literaturstudie wird eine integrative und Effekt-basierte Monitoringstrategie zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen auf Fließgewässer-Ökosysteme erarbeitet. Die Strategie soll dazu dienen, stofflich basierte Defizite in Gewässerökosystemen zu beschreiben, wobei neben einer Auswahl von im Rahmen der EU-WRRL bereits etablierten Methoden zur Bewertung des ökologischen Zustands eines Gewässerökosystems eine Palette ökotoxikologischer Methoden vorgeschlagen wird, durch welche Mängel im Gesundheitszustand von im System (noch) präsenten Arten dargestellt und mit stofflichen Ursachen in Verbindung gebracht werden können. Das Konzept soll so angelegt sein, dass Wirkungen von Spurenstoffen von nicht-stofflichen Effekten getrennt und – falls gewünscht – Ursachen chemikalienspezifisch detektiert werden können. Die chemisch-analytische Stoffidentifikation steht im Rahmen dieser Strategie jedoch nicht an erster Stelle, sondern kann, falls ein Bedarf nach spezifischer Ursachenfindung besteht, als letzter Schritt mit Hilfe einer effektorientierten chemischen Analytik durchgeführt werden. Primär sollen jedoch bereits manifestierte Wirkungen im Gewässer an verschiedenen biologischen Qualitätskomponenten auf unterschiedlicher Integrationsebene betrachtet und Ursachen für diese Wirkungen aufgedeckt werden. Die Palette an unterschiedlich stark integrierenden Effektuntersuchungen mit gestaffelter Spezifität für stoffliche Belastungen wird im Sinne einer „Ökotox-Box“ entsprechend der Tox-Box in der Trinkwasserbewertung einsetzbar sein. Der Strategieplan wird zusätzlich Informationen zu den notwendigen Rahmenbedingungen für die Anwendung dieser Ökotox-Box beinhalten, so dass er insgesamt als praxistaugliches Instrument bzw. SOP im Gewässermonitoring zum Beispiel im Zusammenhang mit Entscheidungen zur 4. Reinigungsstufe auf Kläranlagen Verwendung finden kann.“

Als Basis für die Erstellung des o. g. Monitoringkonzepts wurden in der nationalen und internationalen Literatur verfügbaren Informationen recherchiert und folgende Fragen beantwortet:

- Welche grundlegenden Informationen zur Vor-Ort-Situation sind essenziell, um ein effektorientiertes Monitoring sinnvoll realisieren zu können (z. B. bereits vorhandene Untersuchungsergebnisse, mögliche Eintragsquellen und damit verbunden Lage möglicher Probestellen etc.)?
- Wie viele und welche Probestellen sind notwendig, um (a) stoffspezifische Effekte von z. B. strukturellen Einflüssen oder (b) Einträge aus Punktquellen von diffusen Einträgen zu trennen?
- Unter welchen Bedingungen empfiehlt sich ein aktives Monitoring zusätzlich zu den Untersuchungen im Gewässer?
- Wie viele Probenahmen sind notwendig, um Einflüsse von Randbedingungen (z. B. jahreszeitlichen Schwankungen) zu erfassen?
- Welche Bezugsgrößen dienen als Referenzwerte (z. B. Leitarten, „Normal“-Werte für Biomarker)?
- Welche biologischen Komponenten eignen sich für ein Effektmonitoring von Spurenstoffen, welche sind besonders sensitiv und welche Schlüsse lassen ihre Antworten zu?
- Welche gewässerökologischen Indices / Metrics weisen im besonderen Maße auf stoffliche Einflüsse hin und welche indizieren andere, nichtstoffliche Belastungsparameter?
- Welche diagnostischen Methoden (Biomarker) eignen sich dafür, den Gesundheitszustand von im Gewässer abundanten Organismen zu bewerten?
- Welche *in vivo*- und *in vitro*-Biotestverfahren im Labor sind geeignet, um Stoffgruppen bzw. durch diese beeinflusste Wirkmechanismen zu identifizieren, die für Effekte im Freiland verantwortlich sind (z. B. gentoxische, phytotoxische, östrogene, neurotoxische Wirkpotentiale; Schmerzmittelwirkungen, Wirkungen von Betablockern, oxidativer Stress u. ä.)?

- Welche Kombination aus Versuchsdesign, Biokomponenten und Untersuchungsmethoden ermöglicht es schließlich, Spurenstoffwirkungen von anderen Einflüssen zu trennen?

Ziel der Studie ist es, den Kenntnisstand zu Spurenstoffwirkungen auf die aquatische Flora und Fauna sowie Methoden zur Untersuchung dieser aus der Literatur darzustellen und darauf basierend eine anlassbezogene, integrative und effektbasierte Monitoringstrategie zum Nachweis möglicher Spurenstoffwirkungen auf Ökosysteme kleiner und mittlerer Fließgewässer zu erarbeiten. Es soll ein mehrteiliger „Werkzeugkasten“ für die Bewertung von Spurenstoffwirkungen in Gewässern dieser Größenklassen zur Verfügung gestellt werden, der vor allem dann zum Einsatz kommen kann, wenn durch etablierte Bewertungsmethoden Defizite im Zusammenhang mit Spurenstoffen im Gewässer nicht aufgedeckt werden können.

2 Methoden

2.1 Vorgehensweise bei der Literaturrecherche

Im Rahmen der Literaturrecherche wurden Informationen zu Wirkungen von Spurenstoffen auf die aquatische Flora und Fauna recherchiert. Diese Informationen dienten als Basis für das vorgeschlagene Konzept zum Monitoring von Spurenstoffwirkungen.

In tabellarischer Form wurden Informationen zu Methoden, die für ein Effektmonitoring zur Verfügung stehen und u. a. in den Projekten der BMBF-Fördermaßnahme RiSKWa (Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf) zum Einsatz kamen, zusammengestellt. Informationen hierzu wurden dem RiSKWa-Statuspapier „Methoden zur (öko-)toxikologischen Bewertung von Spurenstoffen im Wasserkreislauf – Ergebnisse des Querschnittsthemas (Öko-)Toxikologie“ (Grummt et al., 2017) entnommen. Zudem wurden Informationen zur praktischen Anwendbarkeit der Tests von verschiedenen, in der Danksagung genannten Expertinnen und Experten zur Verfügung gestellt.

Für die weiterführende Literaturrecherche wurden die Datenbanken *Web of Science* und *Google Scholar* verwendet. Hierfür wurden für die einzelnen Fragestellungen formulierte Suchbegriffe bzw. Kombinationen derselben genutzt, wie z. B. (*surface water OR freshwater*) AND (*monitor* OR assess**) AND (*bioassay OR biotest OR biomarker*). Zudem wurde mithilfe der Begriffe *trigger value*, *threshold** und *baseline* die Suche nach Referenzwerten durchgeführt. Eine Einschränkung der Ergebnisse auf Basis des Publikationsjahres erfolgte nicht.

2.2 Vorgehensweise bei der Bewertung der Eignung der Methoden für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring

Folgende Kriterien wurden für die Methodenauswahl zum effektbasierten Monitoring mit Biotest und Biomarkern berücksichtigt:

1. Zu erwartende Wirkmechanismen bzw. Wirkorte für mögliche Spurenstoffwirkungen (z. B. Insektizide: Neurotoxische Wirkungen; Herbizide: Phytotoxische Wirkungen; Arzneimittel und Industriechemikalien: Biotransformation in der Leber)
2. Sensitive Arten für das zu erwartende Spurenstoffspektrum
3. Standardisierungs- und Etablierungsgrad sowie Robustheit der Methoden, das Vorhandensein von Referenzwerten, mögliche Störfaktoren, die Notwendigkeit der Probenanreicherung und mögliche Testmatrices. Alle Angaben hierzu sind in den Tabellen in Anlage 1 enthalten. Die genannten Angaben wurde auf Basis einer Umfrage der Bundesländer im LAWA-Expertenkreis Biologie Fließgewässer (Dezember 2021) abgeschätzt. Der Etablierungsgrad wurde von diesen als „noch in der Forschung“ (1), „etabliert, aber nicht standardisiert“ (2) oder „standardisiert“ (3) bewertet. Die Robustheit wurde als „wenig robust, viele Störgrößen“ (1), „mittelmäßig robust“ (2) bzw. „robust und wenig beeinflusst durch Störgrößen“ (3) eingestuft.
4. Tierschutz: Vor dem Hintergrund ethischer und rechtlicher Aspekte (Tierschutzgesetzgebung) sollten, falls möglich und sinnvoll, *in vitro* Methoden in der Indikationsrichtung vergleichbaren *in vivo* Untersuchungen vorgezogen werden. Wenn die jeweiligen Fragestellungen (zumindest teilweise) durch Untersuchungen an Wirbellosen beantwortet werden können, soll auf Studien mit Wirbeltieren aus dem Freiland (Fischen) möglichst verzichtet werden, oder sie sollen erst im letzten Schritt zum Einsatz kommen. Abzuwägen ist in

diesem Zusammenhang auch der Einsatz von Zuchtfischen (Bachforellen) für ein aktives Monitoring. Zu berücksichtigen ist, dass für Untersuchungen an Fischen sowohl Entnahmegenehmigungen als auch Tierversuchsgenehmigungen bei den zuständigen Behörden zu beantragen sind.

5. Kosten: *In vitro*-Tests sind in der Regel günstiger als *in vivo*-Versuche, und Untersuchungen an Wirbellosen (z. B. Gammariden) sind in der Regel weniger kostenintensiv als solche an Wirbeltieren.
6. Zeitaufwand: Biomarkerstudien sind zeitaufwändiger als Biotests, wobei ihre Aussagekraft hinsichtlich der ökologischen Relevanz deutlich höher ist. Vor allem für Arzneimittelwirkungen sind Untersuchungen an Fischen sehr bedeutend, da diese Tiere für diese Stoffgruppe eindeutig die sensitivsten Organismen im Gewässer darstellen.

Auch die Qualitätskomponenten und Metrics der rechtsgültigen Bewertungsverfahren gem. EU-WRRL wurden hinsichtlich ihrer indikativen Eigenschaften für verschiedene Stressoren/Belastungsfaktoren und ihrer Eignung für ein investigatives Effektmonitoring für Spurenstoffe auf der Basis des Software Handbuchs Asterics Version 4 sowie der Dokumentation Teil III, Beschreibung der Indizes von Asterics Perلودes Version 5, herausgegeben im März 2020 untersucht.

Vor dem Hintergrund verschiedener Belastungsszenarien vor Ort und unter Berücksichtigung unterschiedlicher monetärer Ressourcen wurden schließlich qualitativ und quantitativ unterschiedliche Methodenpakete als Werkzeugkästen für das Effektmonitoring von Spurenstoffen vorgeschlagen. Die Auswahl basiert hierbei auf der persönlichen Einschätzung der beiden Autorinnen dieser Studie und erhebt weder einen Absolutheitsanspruch noch einen Anspruch auf allgemeine Akzeptanz. Mit Hilfe der in Anlage 1 gelisteten Informationen können jederzeit auch individuell andere Methodenpaletten zusammengestellt werden. Als „kleines Paket“ wurden hier vor allem Wirkmechanismus-spezifische, gut etablierte und robuste Tests empfohlen, mit denen eine erste Einschätzung der Belastungssituation möglich ist. Abhängig davon, welche Qualitätskomponenten im Fokus stehen, wurden für das weitere Vorgehen eine zweite und dritte Methodenpalette mit aufwändigeren Methoden empfohlen, durch die die Spurenstoffwirkungen weitergehender charakterisiert werden können.

3 Ergebnisse der Literaturrecherche

3.1 Auswirkungen von Spurenstoffen auf aquatische Organismen von Fließgewässern

Der Einfluss **hormonell aktiver Substanzen** auf aquatische Organismen ist weitreichend wissenschaftlich belegt, wobei in der Vergangenheit vor allem Reaktionen bei Fischen genauer untersucht wurden. So konnten bereits in den 1990er Jahren Veränderungen in den Fortpflanzungsorganen von Fischen, die unterhalb von Kläranlageneinträgen gefangen wurden, beobachtet werden (Purdom et al., 1994; Jobling et al., 1998). Diese Veränderungen, zu denen das Auftreten von Intersex-Gonaden und die Verweiblichung von männlichen Individuen gehören, wurden auf hormonell wirksame Substanzen, wie beispielsweise das synthetische Hormon Ethinylestradiol oder Alkylphenoethoxylate, zurückgeführt, welche aufgrund der unzureichenden Elimination durch die Kläranlagen in die jeweiligen Gewässer eingetragen wurden und mit dem Hormonsystem der Fische interagierten. Auf biochemischer Ebene kommt es durch die Anwesenheit östrogen-aktiver Substanzen häufig zur Induktion der Vitellogenin-Synthese bei männlichen Fischen (Jobling und Tyler, 2003). Zudem wurden Veränderungen im Reproduktionsverhalten sowie der larvalen Entwicklung mit endokrin aktiven Substanzen in Zusammenhang gebracht (z. B. Jobling und Tyler, 2003; Coe et al., 2008). Obwohl in der Vergangenheit bei der Untersuchung endokriner Disruption in der aquatischen Umwelt vor allem Fische im Fokus standen, gibt es auch Hinweise auf endokrine Effekte bei aquatischen Invertebraten (siehe z. B. Review von Oetken et al., 2004). Zu den bekanntesten Effekten zählen wohl morphologische Deformationen und Geschlechtsveränderungen bei Muscheln und Schnecken – ausgelöst durch Tributylzinn, welches in der Vergangenheit vor allem in Anti-Fouling-Anstrichen in der Schifffahrt Anwendung fand (Oetken et al., 2004). Gross et al. (2001) konnten bei Individuen von *Gammarus pulex*, die aus mit hormonell aktiven Substanzen belasteten Gewässerbereichen unterhalb von Kläranlagen entnommen wurden, adverse Effekte beobachten. So waren beispielsweise die Oozyten der weiblichen Tiere in ihrer Morphologie verändert. In einer ähnlichen Studie wurden in Individuen der verwandten Spezies *Gammarus fossarum* vergleichbare Beobachtungen gemacht. Hier kam es außerdem zu Veränderungen im Level des Steroidhormonwirkung-regulierenden Proteins hsp90 sowie einer verzögerten Entwicklung (Schirling et al., 2005). Exposition von *G. fossarum* gegenüber Bisphenol A führte zu einer beschleunigten Entwicklung der Eizellen und einer Reduktion des hsp90 Gehaltes (Schirling et al., 2006). Die negativen Auswirkungen hormonell aktiver Substanzen beschränken sich oft nicht nur auf einzelne Individuen. So konnten auf Populationsebene beispielsweise Veränderungen im Geschlechterverhältnis sowie verringerte Fertilitätsraten durch diverse endokrine Disruptoren, u. a. Bisphenol A, beobachtet werden (Ladewig et al., 2006; Langston, 2020).

Für **Pestizide und Biozide** ist davon auszugehen, dass Target-Organismen für die jeweiligen Pestizid- oder Biozidgruppen bzw. mit diesen Organismen nahe verwandte Arten am empfindlichsten auf die gegen sie entwickelten Stoffe reagieren. Für Insektizide wären dies, wie von Kulzer et al. (1986), z. B. für das Pyrethroid Deltamethrin gezeigt, Insektenlarven. Lediglich um den Faktor zehn weniger empfindlich gegenüber diesem Insektizid erwiesen sich Krebstiere und Fische. In einer groß angelegten Monitoringstudie in deutschen Gewässern, durchgeführt von Liess et al. (2021), waren diffuse Pestizeidinträge der Haupttreiber für eine verringerte Anzahl an sensitiven Invertebratenarten. Hierbei war die Toxizität vor allem durch die Neonikotinoide Thiacloprid, Imidacloprid und Clothianidin sowie das Biozid Fibronil getrieben. Auch für Diazinon, welches in Gewässern zeitweise in Konzentrationen oberhalb der vorgeschlagenen Umweltqualitätsnorm detektiert wird, zeigte sich eine hohe Toxizität für Invertebraten (Jemec et al., 2007; Margot et al., 2015). Saha und Kaviraj (2007) untersuchten die Auswirkungen von Cypermethrin, einem Insektizid aus der Gruppe der Pyrethroide, auf aquatische

Nicht-Zielorganismen. Hierbei zeigte sich, dass Insekten und Krebstiere deutlich empfindlicher auf die Substanz reagierten als Fische und Amphibien. Auch Endosulfan, welches in einer europaweiten Untersuchung des „European Topic Centre on Inland, Coastal and Marine waters“ in Oberflächengewässern häufig oberhalb der Umweltqualitätsnormen gemessen wurde, führte in einer Mesokosmosstudie zu einer verringerten Überlebensrate von Krebstieren (Barry und Logan, 1998; Mohaupt et al., 2020). Die Auswirkungen von Insektiziden auf aquatische Ökosysteme treten jedoch nicht nur auf, wenn der regulatorische Grenzwert überschritten wurde. Auch Konzentrationen, die weit unterhalb der regulatorischen Grenzwerte liegen, können deutliche adverse Effekte hervorrufen, wie beispielsweise von Münze et al. (2017) beobachtet wurde.

Für Herbizide sind naturgemäß die stärksten Effekte bei Pflanzen zu erwarten, wobei die Wirkweisen sehr unterschiedlich sein können. So beeinflussen Triazin-Herbizide, zu denen Atrazin und Simazin gehören, sowie Arylharnstoffe, wie Diuron und Isoproturon, gezielt das Photosynthesystem, was zu Wachstumsstörungen, auch in aquatischen Pflanzen, führt (Graymore et al., 2001; Saladin & Clément, 2005; de Souza et al., 2020; Vonk und Kraak, 2020). Herbizide, die ihre Wirkung über die Beeinflussung des hormonellen Stoffwechsels von Pflanzen erzielen, wie 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure), wirken vor allem auf höhere Pflanzen, deren Wachstum durch Auxine reguliert wird (Vonk und Kraak, 2020). Effekte auf Algen sind bei solchen Substanzen eher weniger zu erwarten.

Das Totalherbizid Glyphosat hemmt die Synthese aromatischer Aminosäuren bei Pflanzen und bestimmten Bakterien (Vonk und Kraak, 2020). In einer Laborstudie reduzierte dieses Herbizid die Primärproduktion von Phytoplankton deutlich (Schaffer und Sebetich, 2004). Beschrieben sind für Glyphosat auch Wirkungen bei Fischen als Nicht-Zielorganismen. Diese umfassen gentoxische und neurotoxische Effekte sowie die Induktion von oxidativem Stress (Gluszak et al., 2006; Cavalcante et al., 2008; Lushchak et al., 2009; Topal et al., 2015; Webster und Santos, 2015; Li et al., 2017). Gezeigt wurde auch, dass das Herbizid enzymatische, hämatologische und immunologische Parameter verändert (Gluszczak et al., 2007; Kreutz et al., 2011), zu Störungen des Energie-, Aminosäure- und Nukleosidstoffwechsels und des Blutbildes führt (Li et al., 2017), histopathologische Effekte in Kiemen, Leber und Niere bei Fischen hervorruft (Antunes et al., 2017; Li et al., 2017), die Steroidsynthese stört (Webster et al., 2014), die Embryonalentwicklung negativ beeinflusst (Zebreal et al., 2017) und das Schwimmverhalten verändert (Webster et al., 2014). In Bezug auf Glyphosat-induzierte indirekte Effekte zeigten Kelly et al. (2010), dass Glyphosat die Anfälligkeit von Fischen für Parasiten erhöht.

Ein weiteres Herbizid, S-Metolachlor, führte zu einer verringerten Zellvermehrung von Algen, wobei in einer anderen Studie die Sensitivität aquatischer Makrophyten deutlich höher war (Debenest et al., 2009; Vonk und Kraak, 2020).

Für Fungizide sind die stärksten Effekte bei Pilzen zu erwarten. Obwohl aquatische Pilze eine große Rolle im Nahrungsnetz spielen, werden sie bislang auf regulatorischer Ebene kaum beachtet. Im Vergleich zu Herbiziden, die oft sehr gut wasserlöslich sind, sind Fungizide eher lipophil. Aquatische Pilze sind demnach nicht prioritär über die Wasserphase, sondern vor allem über das Sediment diesen Substanzen ausgesetzt. Vergleichbar zu Herbiziden, gibt es auch bei den Fungiziden diverse Wirkmechanismen. So inhibieren Anilino-Pyrimidine und Azole die Synthese wichtiger Aminosäuren und Steroide, Benzimidazole wirken auf die Zellteilung, Carbonsäureamide, wie beispielsweise Boscalid, greifen in die Biosynthese der Zellwand ein, wohingegen Strobilurine den mitochondrialen Energiestoffwechsel beeinflussen (Ittner et al., 2018). Durch die toxische Wirkweise kann es zu Veränderungen in der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften kommen (Gardeström et al., 2016; Rossi et al., 2017).

Als sensitivste Gruppen für **Arzneistoffe** wurden im Rahmen des Projekts Eff-Pharm (UBA) Fische und Mollusken identifiziert (Triebskorn et al., 2014a). Allerdings sind molekulare Targets für Arzneimittel oft stark phylogenetisch konserviert, weshalb, je nach Wirkstoffgruppe, auch Effekte bei weiteren Taxa erwartet werden können (Verbruggen et al., 2018).

Schwarz et al. (2021) untersuchten Daten für 183 Wirkstoffe hinsichtlich der Artensensitivität, wobei nur Informationen für standardisierte Tests mit Daphnien, Fischen und Algen/Cyanobakterien ausgewertet wurden. Insgesamt waren Fische in 86 Fällen am empfindlichsten und dies v. a. für endokrin aktive Substanzen und Schmerzmittel. Grünalgen und Cyanobakterien zeigten in 52 Fällen die höchste Sensitivität, insbesondere für Antibiotika und Antimykotika. Krebstiere erwiesen sich in 42 Fällen v. a. für Herz-Kreislaufmittel und Antineoplastika als am sensitivsten. Die Effekte, die Pharmazeutika bei aquatischen Organismen hervorrufen können, sind sehr unterschiedlich und können verschiedene biologische Ebenen betreffen. In einer Studie von Buchberger et al. (2018) zeigte sich beispielsweise die negative Auswirkung des Betablockers Metoprolol auf die Reproduktion von aquatische Invertebraten. Oetken et al. (2005) konnten beobachten, dass die Überlebensrate von Zuckmückenlarven durch das Antiepileptikum Carbamazepin deutlich verringert wurde. Auch auf biochemischer und zellulärer Ebene wurden bereits deutliche Reaktionen detektiert, die auf Pharmazeutika zurückgeführt werden konnten. So zeigten sich bei Fischen, die Carbamazepin, Metoprolol und Diclofenac ausgesetzt waren, ultrastrukturelle Veränderungen (Tribskorn et al., 2004). Der Entzündungshemmer Diclofenac führte auch zu histopathologischen Effekten im Leber- Nieren-, Kiemen- und Darmgewebe von Regenbogenforellen (Tribskorn et al., 2007). Auch Antidepressiva können adverse Reaktionen in exponierten Nichtziel-Organismen hervorrufen. So detektierten Ziegler et al. (2020) einen erhöhten oxidativen Stresslevel und zelluläre Gewebeveränderungen bei juvenilen Fischen, die Venlafloxin und Citalopram ausgesetzt waren. In einer weiteren Studie mit diesen Substanzen zeigten sich Verhaltensveränderungen bei Bachforellen sowie bei aquatischen Schnecken (Ziegler et al., 2021a, b). Eine Veränderung im Verhalten von juvenilen Bachforellen wurde auch in Experimenten mit dem Entzündungshemmer Diclofenac beobachtet (Schwarz et al., 2017). Eine weitere Substanz, die häufig in Oberflächengewässern detektiert wird, ist das Antidiabetikum Metformin, welches in einer Studie von Rogall et al. (2020) deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms juveniler Bachforellen auslöste.

Neben endokrin-wirksamen Substanzen, Pestiziden, Bioziden und Arzneimitteln sind noch **weitere Chemikalien in Oberflächengewässern** nachweisbar. So wird die Verbindung PFOS (Perfluoroktansulfonat) häufig in Umweltproben detektiert. Dieses perfluorierte Tensid ist nicht nur extrem persistent, sondern weist auch ein hohes Bioakkumulationspotenzial auf (Hillenbrand et al., 2014). Zudem wurde eine toxische Wirkung auf aquatische Organismen nachgewiesen (Jeong et al., 2016; Logeshwaran et al., 2021). Auch die gut wasserlöslichen Benzotriazole, welche als Korrosionsschutzmittel, z. B. in Geschirrspülmitteln, eingesetzt und kontinuierlich über Kläranlagen in Fließgewässer eingetragen werden, führen zu negativen Effekten in der aquatischen Umwelt. So wurde eine verringerte Wachstumsrate von Algen und Wasserlinsen sowie eine verringerte Reproduktionsrate bei Daphnien beobachtet (Seeland et al., 2012).

Zumeist sind aquatische Organismen jedoch **komplexen Stoffgemischen** ausgesetzt, welche drastische Auswirkungen auf einzelne Individuen sowie ganze Ökosysteme haben können. So zeigten sich im Projekt VALIMAR Reaktionen bzw. Schädigungen bei Fischen, die aus einem mit Pestiziden, endokrin wirksamen Stoffen sowie vielen weiteren Substanzen belasteten Gewässer entweder entnommen oder dort aktiv exponiert wurden. Zu diesen Reaktionen zählten beispielsweise Veränderungen im Metabolismus und histologische Gewebeveränderungen. Bachforellen reagierten hier insgesamt deutlich sensitiver als Bachschmerlen (Tribskorn et al., 2001, 2003). Auch bei Fischen, die flussabwärts von Kläranlagen untersucht wurden, konnten Schädwirkungen auf verschiedenen Ebenen mit Biomarkern detektiert werden. Zu diesen zählten beispielsweise vermehrt gentoxische Effekte, eine erhöhte Biotransformationsaktivität sowie histologische Gewebeveränderungen in verschiedenen Organen (Wilhelm et al., 2017, 2018). Gentoxische Effekte beobachteten auch Deutschmann et al. (2016) bei Fischen aus Gewässerbereichen stromabwärts von stark besiedelten Gebieten.

Obgleich sich in zahlreichen Projekten bisher Vertreter der Salmoniden, und hierbei v. a. Bachforellen als sensitiv für komplexe Gewässerbelastungen erwiesen haben (Pawert, 1998; Schramm, 1998; Tribskorn et al., 2001; Tribskorn et al., 2017; Schmitz et al., 2021), wurden Biomarkeruntersuchungen auch erfolgreich an anderen Fischarten, wie Döbel, Groppen, Nasen, Brachsen oder Schneider durchgeführt (Bader, 2013; Tribskorn et al., 2008; Wilhelm et al., 2017, 2018; Tenji et al., 2020). Auf der Basis der Ergebnisse der Fischbestandserfassungen in Oberweser und Werra von 2020 (von Dassel-Scharf, 2020) würde sich für dieses Gewässer beispielsweise der Döbel als Monitoringart eignen. Notwendige Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass diese Spezies auch in vergleichbarer Altersstruktur an allen festgelegten Probestellen abundant ist. Dies ist vor dem Hintergrund von großer Bedeutung, dass die Sensitivität für Spurenstoffwirkungen zwischen Arten und verschiedenen Altersstadien deutlich schwanken kann (z. B. Kulzer et al., 1986; Schramm et al., 1998; Greulich & Pflugmacher, 2003; Schwarz *et al.*, 2017).

Unterscheidet sich der Fischbestand an den zu untersuchenden Probestellen, besteht die Möglichkeit, Fische aus Zuchten aktiv in die Gewässer einzubringen und deren Gesundheitszustand nach mehrwöchiger Exposition mit Hilfe von Biomarkerantworten zu charakterisieren. Hierbei kamen in der Vergangenheit meist Bach- oder Regenbogenforellen zum Einsatz (Tribskorn et al., 2001; Bernet et al., 2004; Tribskorn et al., 2017; Valenzuela-Nieto et al., 2021). In Kapitel 4.1.2 werden Vor- und Nachteile des passiven und aktiven Monitorings diskutiert. Von Nachteil für Untersuchungen an Fischen ist, dass für die Entnahme von Tieren aus dem Gewässer eine Entnahmegenehmigung, für das aktive Monitoring sogar eine Tierversuchsgenehmigung vorliegen muss. Letztere sollte mindestens 4 Monate vor Versuchsbeginn bei der zuständigen Behörde beantragt werden.

Alternativ zu Fischen können auch Gammariden dem Gewässer entnommen oder *in situ* im Rahmen von Caging-Experimenten untersucht werden (Bundschuh et al., 2011a; Coulaud et al., 2011; Chaumot et al., 2019). Für solche Experimente ist nach deutschem Recht keine tierschutzrechtliche Genehmigung erforderlich. Allerdings ist die Methodenpalette, die zu diagnostischen Zwecken hier eingesetzt werden kann, weniger breit als bei Fischen. Als geeignete Indikatoren für komplexe Gewässerbelastungen haben sich bei Gammariden die Fraßrate, das Geschlechterverhältnis, die Fertilität der Weibchen und der Stressproteinlevel erwiesen (Schill, 2002; Langer et al., 2017; Peschke et al., 2019; Völker et al., 2019).

3.2 Bewertungsverfahren nach EU-WRRL und Möglichkeiten ihres Einsatzes zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen

3.2.1 Grundlagen des biologischen und chemischen Monitorings gem. EU-WRRL

Im Rahmen des durch die EU-WRRL vorgeschriebenen Monitorings werden der ökologische Zustand (bzw. das ökologische Potenzial) und der chemische Zustand der Gewässer bewertet. Hierbei werden gem. OGeV (2016) folgende Qualitätskomponenten untersucht und bewertet:

A) *Ökologischer Zustand/ökologisches Potenzial*

Als biologische Qualitätskomponenten werden die Abundanzen und die Artenzusammensetzung von Makrozoobenthos (MZB), Fischen und die Gewässerflora (Phytoplankton, Makrophyten, Phytobenthos) anhand mehrerer Bewertungsverfahren untersucht (ausführlich beschrieben auf www.gewaesser-bewertung.de (UBA/LAWA 2021)):

- *Makrozoobenthos/Modul „Saprobie“*: Der Saprobienindex reagiert sensibel auf Auswirkungen organischer Belastung bzw. Sauerstoffzehrung auf das Makrozoobenthos.

- *Makrozoobenthos/Modul „Allgemeine Degradation“*: Dieses Modul spiegelt die summarischen Auswirkungen verschiedener Stressoren wider, wie wasserbauliche Eingriffe in die Gewässermorphologie, Nutzung im Einzugsgebiet, aber auch Auswirkungen stofflicher Belastungen von Nährstoffen und Spurenstoffen.
- *Makrozoobenthos/Modul „Versauerung“*: Bei versauerungsgefährdeten Gewässertypen (Typen 5 und 5.1) wird mit Hilfe dieses Moduls die typspezifische Bewertung des Säurezustandes vorgenommen.
- *Fische*: Das *fischbasierte Bewertungssystem* für Fließgewässer (fiBS) spiegelt die Auswirkungen verschiedener Stressoren wider: Degradation der Gewässermorphologie (insbes. Struktur, Kolmation, Durchwanderbarkeit), indirekt aber auch die Nutzung im Einzugsgebiet und Auswirkungen stofflicher Belastungen von Nährstoffen und Spurenstoffen.
- *Makrophyten und Phytobenthos* (MuP): Diese biologische Qualitätskomponente beurteilt die benthische Vegetation der Fließgewässer und gibt v. a. Aufschluss über die trophische und saprobielle Situation, strukturelle und hydrologische Gegebenheiten sowie stoffliche Belastungen und physikalische Eigenschaften eines Gewässers.
- *Phytoplankton*: Die Menge und Artenzusammensetzung des Phytoplanktons zeigt anthropogene Nährstoffbelastungen an.

Chemische Qualitätskomponenten: In Deutschland werden derzeit 67 flussgebietspezifische Stoffe hinsichtlich der Überschreitung von Umweltqualitätsnormen in Wasser, teilweise in Schwebstoff/Sediment überprüft, die in Anlage 6 der Oberflächengewässerverordnung festgelegt sind. Prüfwerte sind Jahresmittelwerte und z. T. Jahreshöchstkonzentrationen.

Zur Bewertung des ökologischen Zustands werden darüber hinaus unterstützende Qualitätskomponenten untersucht und bewertet. Diese umfassen hydromorphologische und allgemeine physikalisch-chemische Qualitätskomponenten:

- *Hydromorphologische Qualitätskomponenten*: Die Gewässerstrukturkartierung ermittelt hydromorphologische Defizite der Fließgewässer (Tiefen- und Breitenvariabilität des Gewässerbettes, Laufentwicklung, Strömungs- und Substratdiversität, Struktur der Uferzone, Durchgängigkeit).
- *Allgemeine physikalisch-chemische Qualitätskomponenten bzw. Parameter (ACP)*: Hierzu zählen nach OGewV für Fließgewässer Temperaturverhältnisse, Sauerstoffgehalt (z. B. TOC, BSB), Salzgehalt (z. B. Chlorid, Sulfat, Leitfähigkeit bei 25 °C) Versauerungszustand (pH-Wert) und die Nährstoffverhältnisse (Konzentrationen von Gesamtphosphor, ortho-Phosphat-Phosphor, Gesamtstickstoff, Ammonium-Stickstoff, Ammoniak-Stickstoff sowie Nitrit-Stickstoff). Die Bewertung der ACP erfolgt anhand von gewässertypspezifischen Anforderungswerten nach OGewV (2016).

B) Chemischer Zustand

- Zur Bestimmung des chemischen Zustands eines Gewässers werden die Konzentrationen von 45 prioritären Stoffen auf Überschreitungen von EU-weit festgelegten Umweltqualitätsnormen (UQN) sowie Nitrat auf Überschreitung des Aktionswertes von 50 mg/L überprüft (Anlage 8 OGewV, 2016). Werden die Normen eingehalten, wird der Zustand als „gut“, ansonsten als „nicht gut“ klassifiziert. Bewertet werden hierbei grundsätzlich Jahresmittelwerte, für einige sehr toxische Stoffe existiert zusätzlich eine zulässige Höchstkonzentration (ZHK-UQN), die der Maximalwert nicht überschreiten darf. Darüber hinaus existieren für Stoffe mit hohem Akkumulationspotential UQN für Fische oder Muscheln (Biota).

- Zusätzlich werden auffällige Stoffe über die EU-Watch-List sowie über nationale Beobachtungslisten von den verschiedenen Bundesländern überwacht (EU, 2013), die Messungen werden jedoch bei der Ermittlung des chemischen Zustands der jeweiligen Gewässer nicht berücksichtigt.

Negative Auswirkungen von Spurenstoffen auf die Gewässerfauna werden somit im Rahmen des WRRL-Monitorings zwar integrativ über die biologischen Bewertungsverfahren erfasst, welchen Beitrag nicht geregelte Spurenstoffen allerdings zu den gezeigten Effekten beitragen, kann nicht gezeigt werden. Hierzu kann ein ergänzendes, auf Spurenstoffwirkungen fokussierendes Monitoring zu investigativen Zwecken anlassbezogen hilfreich sein.

3.2.2 Eignung von Metrics nach WRRL zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen, dass die derzeit im Fließgewässermonitoring gem. EU-WRRL eingesetzten Bewertungsverfahren für die Qualitätskomponenten MZB (Modul Allgemeine Degradation), Fische und MuP verschiedene Belastungen, darunter ggf. auch Spurenstoffwirkungen, anzeigen können. Tabelle 1 fasst die Indikationsspektren für Metrics, die im Rahmen des Monitorings der WRRL zur Bewertung des MZB eingesetzt werden, zusammen (Datengrundlage: Asterics, 2013; Asterics-Perlodes, 2020). Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die meisten Metrics durch verschiedene Belastungsfaktoren beeinflusst werden und deshalb monokausale Schlüsse auf Spurenstoffwirkungen nicht erlauben. Dies ist allerdings auch nicht überraschend, da sie nicht explizit für diesen Zweck entwickelt wurden. Einzig dem für ein Pestizidmonitoring in kleinen Fließgewässern entwickelte Index $SPEAR_{pesticides}$ wurde zunächst eine sehr spezifische Indikationskraft zugesprochen (Schriever et al., 2008; Schäfer et al., 2012; Liess und von der Ohe, 2005), was sich später relativierte. Da Pflanzenschutzmittel sehr bedeutende Belastungsfaktoren vor allem in kleinen Fließgewässern darstellen (Ergebnisse UBA-Projekts „Kleingewässermonitoring“; Halbach et al., 2021) und sich als sehr bedeutende Treiber für Störungen in aquatischen Lebensgemeinschaften erwiesen haben (Liess et al., 2021), kommt einem solchen relativ spezifischen Indikator für Pflanzenschutzmittelwirkungen eine besonders große Bedeutung zu, weshalb seine Eignung zum spezifischen Spurenstoffmonitoring nachfolgend detaillierter betrachtet wird.

Tabelle 1: Auswahl an Metrics zur Beschreibung des ökologischen Zustands von Fließgewässern anhand der Qualitätskomponente MZB und ihre Sensitivität für verschiedene Belastungen (nach Asterics (2013) und Asterics-Perloides (2020))

Belastung Metrics	Allgemeine Degradation	Organische Belastung, O ₂ -Zehrung	Gewässer-morphologie	Versauerung	andere, ggf. Spurenstoffe
Abundanz	x	x	x		
Taxazahl	x	x	x	x	
Saprobienindex		x			
Anzahl EPT-Taxa	x	x	x	x	x?
EPT %	x				x?
Anzahl sensitive Taxa		x	x		x?
Verhältnis sensitive/insensitive Taxa	x				x?
Diversität (Shannon-Wiener-Index)	x	x	x		
Deutscher Faunaindex			x		
Rheoindex nach Banning	x				
SPEAR _{pesticides} -Index					x ?

x: zutreffend, x?: zum Teil zutreffend, fraglich

Im Gegensatz zur Einschätzung von Wernersson et al. (2015) im „European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive“, die den SPEAR_{pesticides}-Index mit Bezugnahme auf Schäfer et al. (2012) als sehr empfindlich gegenüber Pestiziden und relativ unabhängig von Störfaktoren bewerten, schätzt der LAWA-Expertenkreis (EK) „Biologische Bewertung Fließgewässer und Interkalibrierung“ in einer Beiratssitzung zum FuE-Vorhaben „Umsetzung des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pestiziden“ am den Einsatz des SPEAR_{pesticides}-Index zum Pflanzenschutzmonitoring nach Prüfung der Daten eher kritisch ein. Monokausale Rückschlüsse vom SPEAR_{pesticides}-Index auf die Belastungen seien auch für diesen Index nicht möglich. Im Protokoll zu dieser Sitzung wurde festgeschrieben: „Die Eignung des SPEAR zur Detektion von PSM-Belastungen, unabhängig von anderen Stressoren, wird in einigen Bundesländern kritisch gesehen. So gab es Ansätze in verschiedenen Bundesländern, die Abhängigkeiten des SPEAR zum Saprobienindex, zur Allgemeinen Degradation, zur Struktur oder zur Landnutzung zu überprüfen. Die Korrelationen zwischen diesen Kenngrößen und SPEAR waren teilweise hoch (...) SPEAR zeigt wahrscheinlich zuverlässig eine Degradation im Gewässer an, aber ein monokausaler Zusammenhang zwischen PSM und SPEAR / Makrozoobenthos sollte durch weitere statistische Analysen bestätigt werden. Um diesem Bedürfnis der Bundesländer gerecht zu werden und die Akzeptanz des SPEAR in der Praxis zu erhöhen, empfiehlt der LAWA-EK „Biologische Bewertung Fließgewässer und Interkalibrierung“ daher zum einen in der weiteren Projektbearbeitung anhand der (...) zusammengestellten Daten den statistischen Zusammenhang zwischen SPEAR und folgenden Kenngrößen des PERLODES-Verfahrens abzuklären: Modul Saprobie (Saprobienindex), Modul Allgemeine Degradation (Multimetrischer Index); Deutscher Faunaindex, ausgewählte weitere Core-Metrics des PERLODES-Verfahrens“.

Von Brinke et al. (2017) und Wick et al. (2019) wurden solche vom LAWA-EK „Biologische Bewertung Fließgewässer und Interkalibrierung“ gewünschte Analysen zu Korrelationen des

SPEAR_{pesticides}-Index mit anderen Metrics durchgeführt. Brinke et al. (2017) beschreiben, dass der SPEAR_{pesticides}-Index relativ spezifisch auf Belastungen mit Insektiziden und anderen insektizid wirkenden Stoffen reagiert und durch hydromorphologische Parameter relativ wenig beeinflusst wird. Für die Bewertung von Nicht-insektizid wirkenden Pflanzenschutzmitteln (Herbizide, Fungizide) sollten aber weitere Bioindikatororganismen, wie z. B. Diatomeen, genutzt werden. Wick et al. (2019) schlussfolgern, dass der SPEAR_{pesticides}-Index auf alle Fließgewässertypen außer auf organisch belastete Bäche und Flüsse anwendbar ist. Auch in großflächig geschlossenen Waldgebieten liefere der SPEAR_{pesticides} keine eindeutigen Ergebnisse.

Auch der Saprobien-Index und der Index %EPT-Taxa wurden von Wick et al. (2019) auf ihre Beeinflussung durch verschiedene Kenngrößen hin analysiert. Es stellte sich heraus, dass auch diese beiden Indizes durch organische Belastung, zudem aber auch stärker als der SPEAR_{pesticides}-Index durch die allgemeine Umgebung beeinflusst werden, so dass laut der Autoren für diese Parameter eine differenzierte Betrachtung des Fließgewässertyps notwendig ist.

Loske (2017) führte ebenfalls Korrelationsanalysen durch, um zu überprüfen, ob der SPEAR-Index monokausal mit Pestizidbelastung im Zusammenhang steht. Sie nutzte hierfür Daten des repräsentativen Monitorings aus hessischen Fließgewässern aus den Jahren 2004 bis 2014. Aus den Korrelationsanalysen geht hervor, dass der EPT [%], der Saprobienindex und der der Faunaindex, nicht aber der Habitatindex mit dem SPEAR_{pesticides} korrelieren. Auch weisen ihre Daten darauf hin, dass der SPEAR_{pesticides}, ähnlich wie der Saprobien-Index, durch die Sauerstoffverhältnisse im Gewässer im Zusammenhang mit Strömung und Substratqualität beeinflusst wird. Der von ihr untersuchte Datensatz zeigt zudem eine hohe Korrelation des SPEAR_{pesticides} zum Landnutzungsindex an. Überraschenderweise zeigte sich hierbei eine stärkere Korrelation mit dem Anteil an bebauter Fläche als mit demjenigen an landwirtschaftlicher Fläche. Die Autorin schließt hieraus, dass Pestizide im untersuchten Einzugsgebiet ggf. im großen Maße über Kläranlagen in die Gewässer eingetragen werden könnten. Für nicht geeignet wird der SPEAR_{pesticides} von Loske (2017) für große Ströme gehalten, da in diesen der hohe Anteil an Neozoen die Indikationskraft des Index für Pestizide negativ beeinflussen würde.

Auch von Langer et al. (2017) wurde der SPEAR_{pesticides}-Index erfolgreich zur Bewertung von Pestizidwirkungen in Bächen der Schweiz eingesetzt. Auch diese Autoren betonen jedoch, dass die Ergebnisse des SPEAR_{pesticides} mit Vorsicht interpretiert werden müssen, da der Index auch durch morphologische und hydrologische Faktoren, wie Verbauung der Gewässersohle beeinflusst wird.

Aus den angeführten Analysen lässt sich schließen, dass auch dem anfangs als recht spezifisch für Pestizide eingeschätzten SPEAR_{pesticides}-Index nur bedingt eine spezifische Indikationskraft für Spurenstoffe zukommt, dass er allerdings aus dem Spektrum möglicher Spurenstoffe am besten auf insektizid wirkende Wirkstoffe in kleinen Fließgewässern reagiert. In Kombination mit anderen Indikationstechniken (Wirkmechanismus-spezifischen Biotests und Biomarkern) und nach Ausschluss möglichst zahlreicher unspezifischer Einflussgrößen zu Beginn der Studie kann er als Teil eines Methodenrepertoires zum Spurenstoffmonitoring mit relativ guter Indikationskraft für insektizide Stoffe dienen.

Neben dem SPEAR-Index wurde von Wernersson et al. (2015) noch ein weiterer Indikator zum Nachweis von Schadstoffwirkungen genannt, der auf Toleranzbildung von Arten beruht. Dieser Index, basierend auf dem Konzept der Pollution-induced Community Tolerance (PICT) wird als empfindliches Instrument eingeschätzt, um Veränderungen in der Funktion von Biozöosen nachzuweisen, die auf generell toxische Einflüsse zurückgeführt werden können. Inwie-

fern er für ein investigatives Spurenstoffmonitoring geeignet ist, ist fraglich. Auch für die Bewertung von Risiken für langlebige Organismen mit komplexen Lebenszyklen (z. B. Insekten und Wirbeltiere) wird der PICT-basierte Index nicht empfohlen.

Abschließend zu erwähnen ist, dass die Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen Spurenstoffkonzentrationen und Auswirkungen auf die Gewässerökologie bzw. die Qualitätskomponente MZB auf der Basis der für die WRRL ermittelten Werte auch deshalb erschwert ist, weil die Beurteilung des MZB im Frühjahr bzw. im Frühsommer stattfindet, so dass die Gefahr besteht, dass Effekte, die sich erst im Herbst (z. B. nach Reproduktionsphase oder in der Niedrigwasserperiode) manifestieren, unterschätzt werden. Zudem wird der kurzfristige Einfluss von Stoßbelastungen durch Mischwassereinleitungen aus Regenüberläufen (RÜ) oder Regenüberlaufbecken (RÜB) in der Regel nicht, nur in Einzelfällen oder zufällig erfasst, da biologische Untersuchungen explizit direkt nach Starkregenereignissen mit Entlastungen nicht vorgesehen sind und mit sehr hohem Aufwand verbunden wären.

3.3 Effektbasiertes Monitoring und Spurenstoffwirkungen

3.3.1 Historische Entwicklung des effektbasierten Monitorings

Im Anschluss an den Chemieunfall in der Firma Sandoz im Dezember 1986 in Basel wurde, initiiert durch die Internationale Kommission zum Schutz des Rheins (IKSR) und die Deutsche Rheinschutzkommission, im Rahmen des umfassenden Forschungsvorhabens "Entwicklung, Erprobung und Implementation von Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins" der Einsatz von Testverfahren mit Organismen unterschiedlicher Trophie-Ebenen als Bioindikatoren für Schadstoffe überprüft, wobei Effekte von Schadstoffspitzenbelastungen auf organismischer Ebene im Fokus standen. In den Folgejahren erfuhr das Biomonitoring als Frühwarnsystem zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung, wie z. B. in der Rheingüte-Mess-Station in Karlsruhe, eine Blüte (LAWA, 1996; Marten & Schwörer, 2000; Gunatilaka & Diehl, 2001).

Ebenfalls organismische Effekte, d. h. die Präsenz bzw. Absenz bestimmter Organismengruppen dienten ab Anfang der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts in Deutschland im Rahmen der biologischen Gewässergütebestimmung als Wirkungsindikatoren für leicht abbaubare organische Substanzen und Nährstoffe. Auf der Basis der Anwendung des Saprobiensystems wurden hierdurch deutschlandweit Gewässergütekarten erstellt. Auch nach Inkrafttreten der Wasserrahmenrichtlinie Ende 2000 behielt dieses Indikationssystem seine Bedeutung und es wurden zusätzliche Bewertungssysteme für Fische, Makrozoobenthos und Makrophyten als Nachweis für den guten ökologischen Zustand eingeführt.

Einhergehend mit einer zunehmend besser werdenden Abwasserreinigung und verschärften Zulassungsregularien für Chemikalien veränderte sich das Belastungsprofil der Fließgewässer kontinuierlich. Rückläufige Phosphor- und Stickstoffeinträge sowie die deutliche Eintragsminderung stark toxischer Stoffe wurden begleitet von zunehmenden Verbrauchsmengen an Chemikalien in der menschlichen Gesellschaft und damit zusammenhängenden Einträgen „neuartiger“ Stoffe in die Gewässer. Diese treten dort bis heute in zunehmend größerer Anzahl in geringen und in der Regel nicht akut toxischen, sondern ggf. chronisch wirkenden Konzentrationen als sog. Spurenstoffe auf.

Der Frage, welche Bedeutung diesen Stoffen vor allem hinsichtlich möglicher Langzeitwirkungen zukommen kann, und auf welchen biologischen Ebenen sie in Gewässersystemen interagieren können, widmete sich die LAWA mit einer Analyse von zu dieser Zeit vorhandenen Methoden, die auch suborganismische Parameter zur Indikation von Schadstoffwirkungen berücksichtigten (LAWA, 2000). Da die Datenlage und die vorhandenen Methoden zu dieser Zeit

jedoch noch sehr begrenzt waren, und Erfahrungen in ihrem Einsatz zum Biomonitoring fehlten, wurde empfohlen, weiterhin die Bewertung des Makrozoobenthos zu favorisieren, jedoch im Rahmen von Forschungsprojekten Informationen zur Eignung anderer Indikatoren für mögliche chronische Schadstoffeffekte zu prüfen. Genannt wurden hierbei der umuC-Test für genotoxische Effekte, Untersuchungen der Lysosomeninstabilität auf zellulärer Ebene, Nachweise von Leberschädigungen bei Fischen auf Organ-Ebene, Tumorbildungen und morphologische Veränderungen auf der Ebene des Organismus sowie Makrozoobenthos-Untersuchungen auf biozönotischer Ebene.

In den Folgejahren wurden zahlreiche Projekte zu der von LAWA (2000) formulierten Fragestellung durchgeführt, die die Basis für das nachfolgend beschriebene effektorientierte Monitoringkonzept für Spurenstoffe darstellt.

3.3.2 Grundlagen für das effektbasierte Monitoringkonzept für Spurenstoffe

Das im Jahre 2000 abgeschlossene BMBF-Verbundprojekt Valimar (Validierung und Einsatz von Biomarkern zur Bewertung der Belastung kleiner Fließgewässer; <https://uni-tuebingen.de/de/489>; Triebskorn et al., 2001) adressierte genau dieses Thema. Es wurden verschiedene effektbasierte Methoden (Biotests, Biomarker und Bioindikatoren) vergleichend eingesetzt, so dass Zusammenhänge zwischen Ergebnissen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen und Veränderungen in der Biozönose erarbeitet werden konnten (Triebskorn et al., 2001; 2003). Im Zentrum des Interesses standen zu dieser Zeit weniger die heute als typische Spurenstoffe geltenden Chemikalien, sondern eher Pflanzenschutzmittel und schwer abbaubare Stoffe. In diesem Projekt war bereits der E-Screen als neuer, Wirkmechanismus-basierter Biotest zum Nachweis östrogenen Wirkpotentiale integriert (Körner et al., 2001). Das Projekt Valimar lieferte die Grundlage für die Projekte SchussenAktiv und SchussenAktiv*plus*, bei denen schließlich Indikatoren auf unterschiedlichen biologischen Ebenen incl. zahlreicher Wirkmechanismus-basierter Biotests zeitgleich mit chemischer Analytik und detaillierten Analysen des Makrozoobenthos und der Fischfauna eingesetzt wurden. In diesen Projekten waren Spurenstoffe bzw. deren Entnahme im Rahmen der weitergehenden Abwasserreinigung im Fokus. Durch den kombinierten und koordinierten Einsatz der verschiedenen Methoden konnte gezeigt werden, dass Spurenstoffe negative Auswirkungen auf den Gesundheitszustand wasserlebender Organismen und auf die Integrität aquatischer Lebensgemeinschaft haben, und dass sich die Entnahme der Stoffe über die 4. Reinigungsstufe positiv auf die Gewässerorganismen auswirkt. Zudem konnte die Präsenz von Spurenstoffen mit toxischen (z. B. genotoxischen) und hormonellen (z. B. östrogenartigen) Potentialen sowie tatsächlichen Wirkungen in Gewässerorganismen in Verbindung gebracht werden (Triebskorn et al., 2013, 2017, 2019, Maier et al., 2015). Auf der Basis von Plausibilität wurden somit im Rahmen dieser Projekte Reaktionen von Organismen auf suborganismischer oder organischer Ebene mit Effekten auf der Ebene von Populationen oder Biozönosen in Verbindung gebracht. Dies war sowohl für Fische als auch für Gammariden der Fall (Triebskorn et al., 2004; Peschke et al., 2019).

Basierend auf einer Literaturrecherche und Expertenbefragung empfehlen auch Kienle et al. (2015) für die Bewertung von Oberflächenwasser eine Biotestbatterie, anhand welcher neben allgemeiner Toxizität und phytotoxischen Effekten (nachzuweisen durch den Algen-Wachstumshemmtest und den Algen-Photosynthesehemmtest) auch östrogene (mittels YES-Assay), genotoxische (mittels Ames -Fluktuationstest und Mikrokerntest), dioxin-ähnliche (mittels H4IIE-Zelltests und EROD) und neurotoxische Wirkpotentiale (mittels Acetylcholinesterase-Test) erfasst werden können. Eine ähnliche Bewertung wurde in einer Studie vorgenommen, die von der Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg in Auftrag gegebenen wurde: Unter Berücksichtigung der in baden-württembergischen Gewässern vorkommenden Spurenstoffe wurden hier bereits verfügbare Methoden zur Abschätzung von Wirkpotentialen im Oberflächenwasser

zusammengetragen und eine modulare Biotestbatterie für den Einsatz im aquatischen Umweltmonitoring entwickelt (Schmidt et al., 2017). Hierbei enthält das erste Modul den Daphnien-Akutttest, den Fischembryotest mit *Danio rerio*, den Algenwachstumshemmtest mit *Raphidocelis subcapitata* (veraltete Bezeichnung: *Pseudokirchneriella subcapitata*), den hER α -HeLa-9903-Assay zum Nachweis östrogen-ähnlicher Wirkungen sowie den Ames-Test zur Detektion genotoxischer Effekte. Diese Testverfahren werden anschließend im Modul II durch den DR-CALUX-Assay (dioxin-ähnliche Wirkungen), den Imaging-PAM-Assay (phytotoxische Effekte) und den Acetylcholinesterase-Inhibitionsassay potenziell ergänzt. Das dritte Modul erweitert die Palette um Methoden, welche dem Nachweis anti-androgener (Anti-AR-CALUX) und oxidativer Wirkungen (Nrf2/ARE-cisFACTORIAL) sowie der spezifischen Bindung von Chemikalien an bestimmte Rezeptoren (Glucocorticoid-Rezeptor: GR-CALUX, PPAR γ : PPAR γ -transFACTORIAL-Assay) dienen.

Im Rahmen des Projektes DEMEAU wurde eine Palette an *in vitro* Bioassays auch zur kostengünstigen Bewertung der Trinkwasserqualität erstellt (Schriks et al., 2015). Diese enthält zusätzlich zu den Biotests, die dem Nachweis endokriner, genotoxischer und dioxin-ähnlicher Effektpotentiale dienen, auch Zelltests zur Detektion von oxidativem Stress.

Zur Bewertung von Abwasserreinigungstechniken wurden zeitgleich in der Schweiz und in Deutschland Methodenpaletten erprobt und etabliert, um Auswirkungen der Spurenstoffentnahme auf Wirkpotentiale darzustellen (Kienle et al., 2011, 2015; Tribskorn et al., 2015). Von Tribskorn et al. (2015) wurde schließlich eine sog. „Ökotox-Box“ zum Nachweis von Spurenstoffwirkungen in Anlehnung an die „Tox-Box“ zur Trinkwasserbewertung (Grummt et al., 2018) erarbeitet. Dass Biotestverfahren trotz der häufigen Notwendigkeit der Probenanreicherung eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse z. B. im Rahmen der Überwachung von Ozonanlagen liefern, wird von Stapf et al. (2017) betont. Die Autoren sehen zudem auch die Kosten- und Zeiteffizienz der *in vitro*-Tests als großen Vorteil an. Sie empfehlen, beim Nachweis hormoneller Wirkungen auch antagonistische Endpunkte zu betrachten, und favorisieren bei der Durchführung des Ames-Test zum Nachweis genotoxischer Effekte den Stamm YG7108. Zudem halten sie den Fish early life stage Test mit Regenbogenforellen trotz hoher Kosten und zeitlichem Aufwand für am besten geeignet, sowohl die Verringerung als auch die Entstehung von Toxizität im Abwasser durch eine Ozonierung abzubilden. Luckenbach (2002) empfiehlt diesen Test, vor allem mit Bachforellen, generell zur Bewertung von Gewässerbelastungen.

Biomarker kamen als Instrumente des Umweltmonitorings in mehreren Internationalen Forschungsprojekten (BEST: Biomonitoring of Environmental Status and Trends; JAMP: Joint Assessment and Monitoring Programme; MEDPOL: Programme for the Assessment and Control of Pollution in the Mediterranean Region) zum Einsatz. Untersucht wurden hierbei Parameter wie die EROD- und Acetylcholinesterase-Aktivität, der Gehalt an Vitellogenin, die lysosomale Stabilität sowie DNA-Schäden mittels verschiedener Analyseansätze (Sanchez et al., 2009). Der Monitoring-Ansatz des „International Council for the Exploration of the Sea (ICES)“ erweitert diese Methoden unter anderem um die Analyse des Metallothioneingehaltes, durch histopathologische Untersuchungen der Leber, das Vorkommen von Im- und Intersexausprägungen, die Induktion von Mikrokernen und die Analyse von Stressproteingehalten. Informationen zu etablierten Biomarkeruntersuchungen, welche eventuell in Gewässeruntersuchungen im Rahmen der EU-WRRRL angewendet werden könnten, sind zudem in einem Bericht, der im Rahmen der gemeinsamen Umsetzungsstrategie der EU (Common Implementation Strategy) erstellt wurde, enthalten (Wernersson et al., 2015).

Das nachfolgend vorgestellte Monitoringkonzept empfiehlt in Anlehnung an Tribskorn et al., (2015) eine „Ökotox-Box“ als Werkzeugkasten für ein investigatives effektbezogenes Spurenstoffmonitoring in kleinen und mittleren Fließgewässern, das sowohl Metrics als auch Biotests und Biomarker integriert, wobei Erfahrungen aus den o. g. Projekten genutzt wurden.

3.3.3 Nachweis von Spurenstoffwirkungen im Rahmen eines effektbasierten Monitorings

Das erarbeitete Monitoringkonzept basiert auf einer Kombination aus Methoden, die (1) den Zustand der Biozönose und den Gesundheitsstatus von im Gewässer vorhandenen Organismen integrativ erfassen, (2) zwischen Freiwasser und Sedimentbelastungen differenzieren, (3) Hinweise auf Taxa-spezifische Wirkungen liefern und (4) auf der Basis Wirkmechanismus-basierter Biotests und spezifischer Biomarker Aussagen zu möglicherweise für die beobachteten Wirkungen verantwortlichen Stoffgruppen erlauben. Genutzt werden können hierdurch sowohl die toxikologische Relevanz stoffgruppenspezifischer Nachweise als auch die ökologische Relevanz von auf organischer oder biozönotischer Ebene indizierender Verfahren. Vor- und Nachteile der betrachteten Methoden sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden zum Nachweis von Effektpotenzialen und Effekten beim Spurenstoffmonitoring

	Vorteile	Nachteile
Metrics	<ul style="list-style-type: none"> • Integrierend über verschiedene Stressoren (Mischungstoxizität von Chemikalien, Wirkungen von Transformationsprodukten und andere exogene und endogene Faktoren) • Auch Effekte von nicht bekannten Stoffen werden nachgewiesen • Integrierend über längere Zeiträume • Indikativ für betroffene Artengruppen • Hohe ökologische Relevanz 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Spurenstoff-spezifische Indikationskraft → keine bis geringe toxikologische Relevanz • Detaillierte Artenkenntnis erforderlich
Gesundheits- bzw. Stressmarker	<ul style="list-style-type: none"> • Integrierend über verschiedene Stressoren (Mischungstoxizität von Chemikalien, Wirkungen von Transformationsprodukten und andere exogene und endogene Faktoren) • Auch Effekte von nicht bekannten Stoffen werden nachgewiesen • Untersuchung verschiedener Organe erlaubt Hinweise auf Stoffgruppen über Qualität des Syndroms → in Kombination mittlere toxikologische Relevanz • Je nach Biomarker unterschiedlich lange Integrationszeiträume (kurz bis mittelfristig) • Nachweis des Gesundheitszustandes (noch) vorhandener Arten (Frühwarnsystem) • Mittlere ökologische Relevanz 	<ul style="list-style-type: none"> • Als Effektmarker nur geringe Spurenstoff-spezifische Indikationskraft • Als Einzelmarker geringe toxikologische Relevanz • Bei Fischen: Entnahmegenehmigung bzw. Tierversuchsgenehmigung erforderlich • Evolutiv-adaptive Prozesse können in langfristig kontaminierten Gebieten die übliche Kinetik dieser Marker beeinflussen
In vivo (in situ) Biotests	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalisierung der Belastung (Sediment / Freiwasser) • Integrierend über verschiedene Stressoren (Mischungstoxizität von Chemikalien, Wirkungen von Transformationsprodukten und andere exogene und endogene Faktoren) • Auch Effekte von nicht bekannten Stoffen werden nachgewiesen • Hinweise auf Taxa-spezifische Wirkungen, da verschiedene trophische Ebenen über Test abgedeckt werden können • Mittlere ökologische Relevanz, da Reaktionen auf organischer Ebene 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Spurenstoff-spezifische Indikationskraft • Geringe toxikologische Relevanz

<p>Stoffgruppenspezifische Biomarker</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Gute stoffgruppenspezifische Indikationskraft • Auch die Präsenz von unbekanntem Stoffen mit gleichem Target im Organismus wird nachgewiesen • Je nach Biomarker unterschiedlich lange Integrationszeiträume (kurz bis mittelfristig) • Mittlere ökologische und toxikologische Relevanz 	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Fischen: Entnahmegenehmigung bzw. Tierversuchsgenehmigung erforderlich • Als Expositionsmarker nur geringe Aussagekraft bzgl. des Gesundheitszustandes des Monitororganismus • Evolutiv-adaptive Prozesse können in langfristig kontaminierten Gebieten die übliche Kinetik dieser Marker beeinflussen
<p>Wirkmechanismusspezifische Biotests</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Gute stoff- bzw. stoffgruppenspezifische Indikationskraft • Auch Effekte von unbekanntem Stoffen mit gleichem Wirkmechanismus werden nachgewiesen • Meist relativ geringer Zeit- und Kostenaufwand • Hohe toxikologische Relevanz 	<ul style="list-style-type: none"> • Oft Anreicherung von Chemikalien aus Proben notwendig • Anfälligkeit für Störfaktoren • Geringe ökologische Relevanz

Vorteil des Einsatzes von **über die Summe vorhandener Stressoren (incl. Spurenstoffen) integrierenden Verfahren** (Metrics, individuelle Gesundheits- bzw. Stressmarker für z. B. oxidativen Stress, Gewebeintegrität, Mikrokerntest für gentoxische Effekte) ist es, dass sie auch Auswirkungen der Interaktion von Stoffen miteinander (Mischungstoxizität), das Zusammenspiels biotischer und abiotischer Faktoren mit Stoffwirkungen sowie Effekte von möglichen Transformationsprodukten abbilden. Zudem integrieren die Antworten über längere Zeiträume, so dass auch Auswirkungen von Ereignissen in der Vergangenheit nachgewiesen werden können.

Dieser entscheidende Vorteil der stressorübergreifend indizierenden Methoden hat jedoch gleichzeitig den Nachteil, dass Informationen zu spezifischen, einzelstofflichen oder stoffgruppenspezifischen Ursachen für die Effekte, die z. B. im Rahmen der Chemikalienregulation, für Maßnahmenplanungen oder im Zusammenhang mit der Verursacherhaftung benötigt werden, über diese Analysen nur unzureichend zur Verfügung gestellt werden können. Im vorgeschlagenen Monitoringkonzept wird deshalb ihre **Kombination mit stoffgruppenspezifischeren Biomarkern** (wie z. B. die Hemmung der Cholinesterase für Insektizidwirkungen, die Induktion von Biotransformationsenzymen für koplare organische Verbindungen, die Vitellogeninsynthese für östrogen wirksame Substanzen) **und Wirkmechanismus-basierten Biotests** (z. B. Hefezellassays für (anti)östrogene Wirkungen, NSAID-Biosensor für Schmerzmittelwirkungen, AhR-CALUX Assay für dioxinähnliche Wirkungen, AChE-Hemmtest für neurotoxische Effekte) empfohlen. Allerdings sollte beachtet werden, dass sowohl die stoffgruppenspezifischeren Biomarker als auch die Gesundheitsmarker in langzeitkontaminierten Ökosystemen mit Vorsicht interpretiert werden müssen, da evolutiv-adaptive Prozesse die übliche Kinetik dieser Marker beeinflussen können (Arts et al., 2004; Tenji et al., 2020).

Während Biomarkerantworten von Organismen auch dann noch Hinweise auf Chemikalienwirkungen erlauben, wenn die entsprechenden Stoffgruppen zum Zeitpunkt der Probenahmen nicht mehr im Gewässer vorhanden waren (zeitliche Integrationsfähigkeit von Biomarkern, Triebkorn et al., 2002), ist die Erfassung von Wirkpotentialen über *in vivo*-Biotests und Wirkmechanismus-basierte Biotests abhängig von der Präsenz der jeweiligen Stoffgruppen in der Probe zum Zeitpunkt der Entnahme. Hinsichtlich dieses Aspekts und darüber hinaus aufgrund der nicht seltenen Notwendigkeit einer Probenanreicherung und einem damit möglicherweise verbundenen Verlust an toxischen Potenzialen (Informationen hierzu in der vorletzten Spalte der in Anlage 1 enthaltenen Tabellen) sind solche Biotests vergleichbar mit der chemischen Target-Analytik. Allerdings zeigen sie, anders als diese, Stoffwirkungen auch dann an, wenn

kein Verdachtsmoment für solche als Grundlage für ihren Nachweis vorhanden ist. Auch können zytotoxische Eigenschaften der Probe oder bestimmte Probeninhaltsstoffe Biotests beeinflussen. Informationen hierzu sind für die einzelnen recherchierten Tests in den in Anlage 1 enthaltenen Tabellen unter der Spalte „Störfaktoren“ enthalten.

In Anlage 1 sind alle recherchierten Daten zu Biotests und Biomarkern zusammengestellt, die in den letzten zwanzig Jahren im Rahmen von Forschungsvorhaben weltweit zum Einsatz kamen (z. B. Adams, 2000; Adams und Greeley, 2000; Adams et al., 2001; Tribskorn et al., 2001; Abegglen und Siegrist, 2012; Tribskorn, 2017). Sie sind entsprechend ihrer Indikationskraft für bestimmte Wirkmechanismen bzw. Spezifität gruppiert. Die Tabellen enthalten zusätzlich zum Testnamen und dem verwendeten Testmaterial auch Informationen zum analysierten Endpunkt, zur möglichen Testmatrix (Oberflächenwasser, Abwasser, Trinkwasser oder Sediment) sowie Angaben zum Standardisierungsgrad und zum Zeitaufwand bei der Durchführung der Tests, was einen Anhaltspunkt für die jeweiligen Kosten bietet. In den Tabellen sind überdies Informationen zu Robustheit bzw. Sensitivität der Methoden, zu möglichen Störfaktoren, zum generellen Etablierungsstatus und zur Notwendigkeit der Probenanreicherung für den Test enthalten. Detaillierte Informationen zu Verfahren der Probenanreicherung sind Grummt et al. (2017) zu entnehmen. Zudem wird in den Tabellen angegeben, welche Referenzwerte für die jeweiligen Tests zu berücksichtigen sind.

Die nachfolgend in Tabelle 3 und Tabelle 4 genannten Biotests und Biomarkerstudien stellen eine Auswahl an Methoden dar, die bereits in einigen Fachlaboratorien in Deutschland etabliert sind. Die jeweiligen Einsatzorte sind in den jeweils letzten Spalten der beiden Tabellen genannt.

Tabelle 5 und Tabelle 6 enthalten schließlich eine Auswahl an Biotests und Biomarkern, die auf Basis der in Kap. 2.2 genannten Kriterien von den Autorinnen dieses Berichts als geeignet für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring erachtet werden. Hierbei wurden auch die zuvor in diesem Abschnitt beschriebenen Vor- und Nachteile von eher spezifischen bzw. stressorübergreifend indizierenden Tests berücksichtigt.

Das vorgeschlagene kombinierte effektbasierte Monitoringkonzept stellt insgesamt gesehen eine gute Basis für eine nachgeschaltete fokussierte chemische Target-Analytik zur spezifischen Ursachenfindung dar.

Tabelle 3: In einigen Behörden* für spezifische Fragestellungen angewendete Biotests

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Test- matrix	Methode	Einsatzort
Gentoxizität	Ames Platteninkorporations-Test	Bakterien: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	ISO 16240:2005	UBA
	Ames-Fluktuationstest	Bakterien: Salmonella typhimurium (TA98, TA100)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	ISO 11350:2012	LUBW, LANUV
	Mikrokerntest	verschiedene Zelllinien: Mensch: HepG2; Hamster: CHO, V79; Fisch: RTG-2, RTL-W1, PLHC1	klastogene und aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	TW, OW	DIN EN ISO 21427-2:2009, OECD 487	UBA, LANUV
	umuC Test	Bakterien: Salmonella typhimurium TA1535/pSK 1002, NM1001, NM3009, NM2009, OY1002/1A1, OY1002/1A2, OY1002/1B1, OY1002/2C9, OY1002/2D6	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	TW, OW, ABW, Sediment-extrakte	ISO 13829:2000, DIN 38415-3:1996	LANUV, LfU Bayern, LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, NLWKN
Neurotoxizität	RTCA Proliferation	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Proliferation (elektrische Widerstandsmessung)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt	UBA
	Neuritenwachstumstest	etablierte Zelllinie: SH-SY5Y (Mensch)	Ausbildung / Hemmung des Neuritenwachstums (Fluoreszenzmessung und optische Auswertung)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt	UBA
	Nekrose PI	etablierte Zelllinie: Jurkat (Mensch)	Zelltod (Fluoreszenzmessung des Farbstoffs PI)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt	UBA
	Acetylcholinesterase-Hemmtest	Acetylcholinesterase	Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität (Enzymaktivität)	OW, ABW	DIN 38415-1:1995; Ellman et al. (1961)	LW
Endokrine Wirkung	Yeast Estrogen Screen (Östrogene Wirkung)	Hefe: rekombinante Saccharomyces cerevisiae	Induktion eines Reportergens für humanen Estrogenrezeptor (β-Galaktosidaseaktivität)	OW, ABW	ISO 19040-1:2018; Routledge et al. (1996), Wagner et al. (2013); Weiss et al. (2017)	LfU Bayern, LUBW

Tabelle 3: Fortsetzung

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode	Einsatzort
Endokrine Wirkung	(anti) ER α -CALUX ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Bindung an estrogenen Rezeptor (Lumineszens)	TW, OW, ABW	ISO 19040-3:2018, OECD 455	UBA, LANUV
	(anti) AR-CALUX ((Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	OECD 458	LANUV
Oxidativer Stress	Nachweis von ROS mit DCFHDA	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Bildung von ROS (Fluoreszenzmessung des umgesetzten Farbstoffs)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt	UBA
Phytoxizität	Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: <i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstumshemmung (Zelldichte, optische Dichte)	OW, ABW	DIN EN ISO 8692:2012	LfU Bayern, LUBW
	Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstumshemmung (fluorometrische Messung der Biomasse)	OW, ABW	DIN 38412-33:1991	LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, NLWKN
	Algentest	einzellige Grünalgen	Wachstumshemmung	OW, ABW, Sedimenteluat	Entwurf DIN 38412-59	LUBW
	<i>Myriophyllum</i> Toxizitätstest	Pflanzen: <i>Myriophyllum aquaticum</i>	Wachstumshemmung (Nassgewicht)	Sediment	DIN ISO 16191:2013	LUBW
Reproduktions- und Entwicklungstoxizität	<i>Daphnia magna</i> Reproduktionstest	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Reproduktion (Anzahl Jungtiere pro Weibchen)	TW, OW, ABW	ISO 10706:2000, OECD 211	LfU Bayern
Zytotoxizität	CellTiter-Glo® 2.0	etablierte Zelllinie: HepG2 (Mensch)	Zellviabilität (ATP-Produktion metabolisch aktiver Zellen)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt	UBA
	Leuchtbakterientest	Bakterien: <i>Vibrio fischeri</i>	Hemmung der Lumineszens	OW, ABW	DIN EN ISO 11348-1:2008, DIN EN ISO 11348-2:2008, DIN EN ISO 11348-3:2008, Weiss et al. (2017)	LfU Bayern, LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, NLWKN

Tabelle 3: Fortsetzung

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode	Einsatzort
Zytotoxizität	pBS	Bakterien: <i>Bacillus subtilis</i>	Zellviabilität	TW	Weiss et al. (2017)	LW
	Laktat-Dehydrogenase-Assay	etablierte Zelllinien: CHO (Hamster)	Zellviabilität (Membranintegrität)	OW, ABW	Kumar et al. (2018)	LANUV
Zytotoxizität	XTT-Assay	etablierte Zelllinien: CHO (Hamster), L929 (Maus)	Zellviabilität (mitochondriale Aktivität)	OW, ABW	ISO 10993-5:2009	LANUV
allgemeine Toxizität	Daphnia magna Akut-test	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	OW, ABW	DIN EN ISO 6341:2013, OECD 202	LfU Bayern, NLWKN
	Daphnientest (Verdünnungsstufen)	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	ABW	DIN 38412-30:1989	LHW Sachsen-Anhalt, LUBW
	Fish Acute Embryo Test	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Mortalität, Entwicklungsdefizite	OW, ABW	DIN EN ISO 15088:2008, OECD 236	LfU Bayern; LHW Sachsen-Anhalt, NLWKN
	Chronischer Fischttest unter Berücksichtigung der CRED-Kriterien	Fische: je nach Fragestellung unterschiedliche Lebensstadien	Hämatologie, klinische Chemie, Biomarker, Histopathologie qualitativ, semiquantitativ, Quantitativ (Stereologie)	OW	Moermond et al. (2016)	LfU Bayern

* basierend auf der Umfrage im LAWA-Expertenkreis Biologie Fließgewässer (Dezember 2021), vgl. Kap. 2.2.

ABW: Abwasser, OW: Oberflächenwasser, TW: Trinkwasser

Tabelle 4: In einigen Behörden * für spezifische Fragestellungen angewendete Biomarkerstudien

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode	Einsatzort
Endokrine Wirkung	Vitellogenin-Synthese	Fische: Blut und Lebergewebe von männlichen Tieren	Induktion der Vitellogenin-Synthese (Vitellogeninkonzentration)	OW	ISO 23893-3:2013, OECD 234, Sumpter und Jobling (1995)	LfU Bayern
	Fish 11-Ketotestosteron-Assay	Fische: Blut und Lebergewebe von männlichen Tieren	11-Ketotestosteron-Konzentration	OW	Fish 11-ketotestosterone ELISA kit (Cayman Chemicals)	LfU Bayern
	Fish Testosteron-Assay	Fische: Blut und Lebergewebe von männlichen Tieren	Testosteron-Konzentration	OW	Fish Testosterone ELISA kit (Cusabio Technology LLC)	LfU Bayern
	Fish Estradiol-Assay	Fische: Blut und Lebergewebe von männlichen Tieren	Estradiol-Konzentration	OW	Fish estradiol (E2) ELISA kit (Cusabio Technology LLC)	LfU Bayern
	Fish Aromatase-Assay	Fische: Blut und Lebergewebe von männlichen Tieren	Aromatase-Konzentration	OW	Aromatase Elisa kit (Cusabio Technology LLC)	LfU Bayern
Arzneimittelwirkung (NSAID)	Fish Prostaglandin E2-Assay	Fische: Blut	Prostaglandinkonzentration	OW	Prostaglandin Elisa kit (Cusabio Technology LLC)	LfU Bayern
Proteotoxizität	Fish HSP70-Assay	Fische: Blut, verschiedene Gewebe	Induktion oder Hemmung der Hsp70 Produktion	OW, ABW	Fish heat shock protein 70 (HSP-70) ELISA kit (Cusabio Technology, LLC)	LfU Bayern
Dioxin-ähnliche Wirkung	Fish CYP1A1- Assay	Fische: Blut, Gewebshomogenate	CYP1A1-Konzentration	OW	Fish cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) ELISA kit (Cusabio Technology LLC)	LfU Bayern
unspezifische Toxizität	Medizinisch-toxikologische Untersuchungen	Fische: Blut, Gewebeproben	Hämatologie, klinische Chemie, Histopathologie qualitativ, semi-quantitativ, quantitativ (Stereo-logie)	OW	Fiedler et al. (2020)	LfU Bayern

* basierend auf der Umfrage im LAWA-Expertenkreis Biologie Fließgewässer (Dezember 2021), vgl. Kap. 2.2.

ABW: Abwasser, OW: Oberflächenwasser

Tabelle 5: Biotests, die auf Basis der in Kap. 2.2 genannten Kriterien für das Monitoring von Spurenstoffwirkungen empfohlen werden

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Test- matrix	Methode
Gentoxizität	Ames Platteninkorporations-Test	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	ISO 16240:2005
	Ames-Fluktuationstest	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	ISO 11350:2012
	Mikrokerntest	verschiedene etablierte Zelllinien: HepG2 (Mensch); CHO, V79 (Hamster); RTG-2, RTL-W1, PLHC1 (Fisch)	klastogene und aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	TW, OW, ABW	DIN EN ISO 21427-2:2009, OECD 487
	umuC Test	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK 1002, NM1001, NM3009, NM2009, OY1002/1A1, OY1002/1A2, OY1002/1B1, OY1002/2C9, OY1002/2D6	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	TW, OW, ABW, Sedimentextrakte	ISO 13829:2000, DIN 38415-3:1996
Neurotoxizität	RTCA Proliferation	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Proliferation (elektrische Widerstandsmessung)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt
	Neuritenwachstumstest	etablierte Zelllinie: SH-SY5Y (Mensch)	Ausbildung/Hemmung des Neuriten- wachstums(Fluoreszenzmessung und optische Auswertung)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt
	Nekrose PI	etablierte Zelllinie: Jurkat (Mensch)	Zelltod (Fluoreszenzmessung des Farbstoffs PI)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt
	Acetylcholinesterase- Hemmtest	Acetylcholinesterase	Hemmung der Acetylcholinesterase- Aktivität (Enzymaktivität)	OW, ABW	DIN 38415-1:1995; Ellman <i>et al.</i> (1961)
Dioxin- ähnliche Wirkung	DR-CALUX	etablierte Zelllinie: H4IIE (Ratte)	Induktion des Arylhydrocarbon- Rezeptors (Lumineszens)	OW, ABW, Sedi- mentextrakte	Murk <i>et al.</i> (1996)
	AhR-CALUX	etablierte Zelllinien: H4IIE (Ratte); HepG2 (Mensch)	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (Lumineszens)	OW, ABW, Sedi- mentextrakte	Brennan <i>et al.</i> (2015)

Tabelle 5: Fortsetzung

Dioxin-ähnliche Wirkung	Reporterassay mit H4IIE-luc Zellen	etablierte Zelllinie: H4IIE (Ratte)	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (Lumineszens)	OW, ABW, Sedimentextrakte	Garrison et al. (1996)
Endokrine Wirkung	Yeast Estrogen Screen (Östrogene Wirkung)	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion eines Reportergens für humanen Estrogenrezeptor (β -Galaktosidaseaktivität)	OW, ABW	ISO 19040-1:2018; Routledge et al. (1996), Wagner et al. (2013); Weiss et al. (2017)
	Era-CALUX ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Bindung an estrogenen Rezeptor (Lumineszens)	TW, OW, ABW	ISO 19040-3:2018, OECD 455
	AR-CALUX ((Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	OECD 458
	E-Screen (Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: MCF-7 (Mensch)	Östrogen-induzierte Proliferation	OW, ABW	Soto et al. (1995)
	Reporterassay mit MDA-kb2-Zellen ((Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: MDA-kb2 (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	Wilson et al. (2002)
	Reporterassay mit Era-HeLa-9903 Zellen ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: hERalpha-HeLa-9903 (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Östrogenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	OECD 455
Arzneimittelwirkung	NSAID Biosensor (Schmerzmittel): Cox-1/roGFP3	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	Cox-1 Inhibition (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	Bernhard et al. (2017)
	Betablocker Biosensor: b1-Adrenozeptor / CEPAC	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	b1-Adrenozeptor Inhibition (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	Bernhard et al. (2017)
Oxidativer Stress	Nachweis von ROS mit DCFHDA	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Bildung von ROS (Fluoreszenzmessung des umgesetzten Farbstoffs durch ROS)	TW, OW, ABW	SOP Umweltbundesamt
	AREc32	etablierte Zelllinie: AREc32 (Mensch)	Induktion von Nrf2	TW, OW, ABW	Escher et al. (2012)

Tabelle 5: Fortsetzung

Oxidativer Stress	AREGeneBLAzer	etablierte Zelllinie: ARE-bla HepG2 (Mensch)	Induktion von Nrf2	TW, OW, ABW	König et al. (2017)
Reproduktions- und Entwicklungstoxizität	Daphnia magna Reproduktionstest	Krebstiere: Daphnia magna	Fortpflanzung (Anzahl Jungtiere pro Weibchen)	TW, OW, ABW	ISO 10706:2000, OECD 211
	Fortpflanzungstest mit Ceriodaphnia dubia	Wasserfloh (Ceriodaphnia dubia)	Anzahl Nachkommen, Mortalität	OW	AFNOR 2000 NFT 90-376, ISO 20665:2008
	Fish Early Life Stage Test	Fisch-Embryonen: oft Danio rerio, aber auch Oncorhynchus mykiss, Pimephales promelas, Oryzias latipes	Mortalität, Schlupfrate, Entwicklungsdefizite, Herzschlagrate, Verhaltensänderungen	OW, ABW	OECD 210
	Sediment-Wasser Lumbriculus – Toxizitätstest	Ringelwurm: Lumbriculus variegatus	Fortpflanzung (Biomasse, Anzahl Würmer)	OW, Sediment	OECD 225
	Reproduktionstest mit Potamopyrgus antipodarum	Schnecke: Potamopyrgus antipodarum	Fortpflanzung (Anzahl Embryonen pro Weibchen), Mortalität	OW, ABW, Sediment	OECD 242
Phytotoxizität	Algen- und Cyanobakterien-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: Raphidocelis subcapitata, Desmodesmus subspicatus; Cyanobakterien: Anabaena flos-aquae, Synechococcus leopoliensis	Wachstumshemmung (Trockengewicht, Zellzahl)	OW, ABW	OECD 201
	Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: Raphidocelis subcapitata, Desmodesmus subspicatus	Wachstumshemmung (Zelldichte, optische Dichte)	OW, ABW	DIN EN ISO 8692:2012
	Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: Desmodesmus subspicatus	Wachstumshemmung (fluorometrische Messung der Biomasse)	OW, ABW	DIN 38412-33:1991
	Imaging PAM-Assay	einzellige Grünalgen: Chlorella vulgaris	Hemmung der Photosynthese (Quantenausbeute gemessen mit IPAM-Gerät)	OW, ABW	Durand et al. (2009)
	kombinierter Algentest	einzellige Grünalgen: Raphidocelis subcapitata	Wachstumshemmung nach 2 und 24 Stunden (kolorimetrische Messung)	OW, ABW	Glauch et al. (2020)

Tabelle 5: Fortsetzung

Phytotoxizität	Lemna sp. Wachstumshemmtest	Pflanzen: Lemna sp.	Wachstumshemmung (Fron-Anzahl, Trockengewicht, Nassgewicht)	OW, ABW	OECD 221, DIN EN ISO 20079
Zytotoxizität	Leuchtbakterientest	Bakterien: Vibrio fischeri	Hemmung der Lumineszenz (Störung der ATP-Bildung)	OW, ABW	DIN EN ISO 11348-1:2008, DIN EN ISO 11348-2:2008, DIN EN ISO 11348-3:2008, Weiss et al. (2017)
	Laktatdehydrogenase-Assay	etablierte Zelllinien: CHO (Hamster)	Zellviabilität (Membranintegrität)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Kumar et al. (2018)
	XTT-Assay	etablierte Zelllinien: CHO (Hamster), L929 (Maus)	Zellviabilität (mitochondriale Aktivität)	OW, ABW	standardisiert: ISO 10993-5:2009
allgemeine Toxizität	Daphnia magna Akut-test	Krebstiere: Daphnia magna	Immobilisierung	OW, ABW	DIN EN ISO 6341:2013, OECD 202
	Daphnientest (Verdünnungsstufen)	Krebstiere: Daphnia magna	Immobilisierung	ABW	DIN 38412-30:1989
	Fish Acute Embryo Test	Fisch-Embryonen: Danio rerio	Mortalität, Entwicklungsdefizite	OW, ABW	DIN EN ISO 15088:2008, OECD 236
	Akuter Chironomiden-test	Zuckmückenlarven: Chironomus riparius (bevorzugt), aber auch C. dilutus, C.yoshimatsui	Immobilisierung	OW, ABW	OECD 235
	Chronischer Chironomidentest	Zuckmückenlarven: Chironomus riparius (bevorzugt), aber auch C. dilutus, C.yoshimatsui	Larven: Mortalität, Wachstum; Adulte: Zeit bis zum Schlupf, Anzahl geschlüpfte Tiere	OW, ABW, Sediment	OECD 218 und 219
	Chironomiden Life-Cycle Toxizitätstest	Zuckmückenlarven: Chironomus riparius (bevorzugt), aber auch C. dilutus, C.yoshimatsui	Larven: Mortalität, Wachstum; Adulte: Zeit bis zum Schlupf, Anzahl geschlüpfte Tiere, Geschlechterverhältnis, Fertilität, Fekundität	OW, ABW, Sediment	OECD 233

ABW: Abwasser, OW: Oberflächenwasser, TW: Trinkwasser

Tabelle 6: Biomarker, die auf Basis der in Kap. 2.2 genannten Kriterien für das Monitoring von Spurenstoffwirkungen empfohlen werden

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode
Gentoxizität	Mikrokerntest	Fische: Erythrozyten, Kiemen- und Lebergewebe; PflanzenAmphibien: Erythrozyten; Muscheln: Hämozyten, Kiemengewebe	klastogene & aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	OW, ABW, Sediment-extrakte	OECD 474
	Comet Assay	Algen; Pflanzen; Muscheln: Kiemengewebe, Hämozyten; Amphibien: verschiedene Gewebe; Fische: Erythrozyten, Kiemen- und Lebergewebe	DNA-Strangbrüche (Schweifbildung)	OW, ABW	Singh et al. (1988)
Neurotoxizität	Acetylcholinesterase-Hemmung	Fische: Hirn, Muskelgewebe; Muscheln: Kiemengewebe; Krebstiere: ganze Tiere	Hemmung der Acetylcholinesterase (Enzymaktivität pro mg Protein nach Exposition)	OW, ABW	Fulton et al. (2001)
	Carboxylesterase-Hemmung	Fische: Hirn	Hemmung der Carboxylesterase (Enzymaktivität pro mg Protein nach Exposition)	OW, ABW	Chanda et al. (1997)
Dioxin-ähnliche Wirkungen	EROD Aktivität	Fische: Lebergewebe, seltener Kiemengewebe	CYP1A1 Induktion (Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität)	OW, ABW	ISO/TS 23893-2:2007
	Fish CYP1A1- Assay	Fische: Blut, verschiedene Gewebe	CYP1A1-Konzentration	OW	Fish cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) ELISA kit (Cusabio Technology LLC)
Endokrine Wirkungen	Vitellogenin-Synthese	Fische: Blutplasma, Lebergewebe von männlichen Tieren; Ganzkörperhomogenate von Larven; Mucusproben	Induktion der Vitellogeninsynthese (Vitellogeningehalt)	OW	ISO 23893-3:2013, OECD 234, Sumpter und Jobling (1995)
	Fish 11-Ketotestosteron-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	11-Ketotestosteron-Konzentration	OW	Fish 11-ketotestosterone ELISA kit (Cayman Chemicals)
	Fish Testosteron-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Testosteron-Konzentration	OW	Fish Testosterone ELISA kit (Cusabio Technology LLC)

Tabelle 6: Fortsetzung

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode
Endokrine Wirkungen	Fish Estradiol-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Estradiol-Konzentration	OW	Fish estradiol (E2) ELISA kit (Cusabio Technology LLC)
	Fish Aromatase-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Aromatase-Konzentration	OW	Aromatase Elisa kit (Cusabio Technology LLC)
Arzneimittel-wirkung	Fish Prostaglandin E2-Assay	Fische: Blut	Prostaglandinkonzentration	OW	Prostaglandin Elisa kit (Cusabio Technology LLC)
Oxidativer Stress	Glutathion-S- Transferase-Assay	Fische, Muscheln, Pflanzen: verschiedene Gewebe	Aktivität der Glutathion-S-Transferase (Substratumsatz)	OW, ABW	Habig et al. (1974)
	Lipidperoxidation	Fische: Ganzkörperhomogenate von Larven; Krebstiere: Ganzkörperhomogenate	Aktivität der Lipidperoxidase (Substratumsatz)	ABW	Hermes-Lima et al. (1995)
	Superoxid-Dismutase Aktivität	Fische, Muscheln, Pflanzen: verschiedene Gewebe	Aktivität der Superoxid-Dismutase (Substratumsatz)	OW	Wdzięczak et al. (1982)
Proteotoxizität	Stressproteingehalt (Hsp70)	Fische: Kiemen-, Leber- und Nierengewebe; Krebstiere: Ganzkörperhomogenate	Induktion oder Hemmung der Hsp70 Produktion (Hsp70 Level relativ zu einem Standard)	OW, ABW	Köhler et al. (2001), Peschke et al. (2014)
	Fish HSP70-Assay	Fische: Blut, verschiedene Gewebe	Induktion oder Hemmung der Hsp70 Produktion	OW, ABW	Fish heat shock protein 70 (HSP-70) ELISA kit (Cusabio Technology, LLC)
Gewebetoxizität	Histopathologische Veränderungen in der Kieme	Fische: Kiemengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	Triebskorn et al. (2008)
	Histopathologische Veränderungen in der Leber	Fische: Lebergewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	Triebskorn et al. (2008)

Tabelle 6: Fortsetzung

Test auf	Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Methode
Gewebetoxizität	Histopathologische Veränderungen in der Niere	Fische: Nierengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	Triebskorn et al. (2008)
	Histopathologische Veränderungen in den Gonaden	Fische: Gonadengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	Triebskorn et al. (2008)
Wirkung von Metallen	Metallothioneine	Fische: Leber; Muscheln: ganze Tiere, Kiemen	Metallothioneininduktion	OW, ABW	OSPAR Commission (2007)

ABW: Abwasser, OW: Oberflächenwasser

4 Empfehlungen für die Durchführung eines investigativen und effektbasierten Spurenstoffmonitorings

Auf Grundlage der recherchierten Informationen zur Eignung der etablierten, gesetzlich verankerten EU-WRRL-Metrics sowie von effektbasierten Methoden zum Nachweis von Spurenstoffen werden nachfolgend Vorschläge und Empfehlungen für Aufbau, Planung und Durchführung eines anlassbezogenen, investigativen und effektbasierten Spurenstoffmonitorings dargestellt. Allerdings ist stets zu berücksichtigen, dass die nachfolgend vorgeschlagene „Toolbox“ (Kap. 4.3) nicht starr, sondern an die jeweiligen Vor-Ort-Bedingungen adaptierbar ist. Wenn z. B. der Verdacht besteht, dass bestimmte Stoffgruppen ursächlich für Belastungen in bestimmten Szenarien verantwortlich sein könnten, können entsprechende Methoden auch in ein Untersuchungsprogramm zusätzlich integriert werden, auch wenn sie unter den hier formulierten Empfehlungen für diese Szenarien (s. Kap. 4.3.) nicht explizit genannt sind.

Zur Ableitung von bestimmten ökologischen Indizes, die durch Fokussierung auf spurenstoffsensitive Arten indikativ für bestimmte Spurenstoffgruppen sind, , ähnlich wie der SPEAR-pesticides-Index (Liess et al., 2005; 2008), ist nach Einschätzung der Autorinnen dieses Berichts ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring hilfreich. Hierzu ist notwendig, dass im Rahmen des vorgeschlagenen Monitoringkonzepts zunächst in einem ersten Schritt („Basis-Check“) an den ausgewählten Gewässern Einflussfaktoren, wie Saprobie, Versauerung, mangelnde Sauerstoffversorgung, durch z. B. von Ammoniak oder Nitrit ausgelöste unspezifische Toxizität oder die Gewässerstruktur als determinierende Einflussfaktoren ausgeschlossen werden, damit für die bestehenden Defizite in der Biozönose geprüft werden kann, ob sie spezifisch auf die Wirkungen von Spurenstoffen bezogen werden können.

Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die aus dieser umfassenden Literaturstudie erarbeitete Empfehlung für ein modular aufgebautes, integratives und effektbasiertes Monitoringkonzept zur Erfassung von Spurenstoffwirkungen in kleinen und mittleren Fließgewässern. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Einzelschritte spezifiziert und das Vorgehen anhand von Fallbeispielen präzisiert.

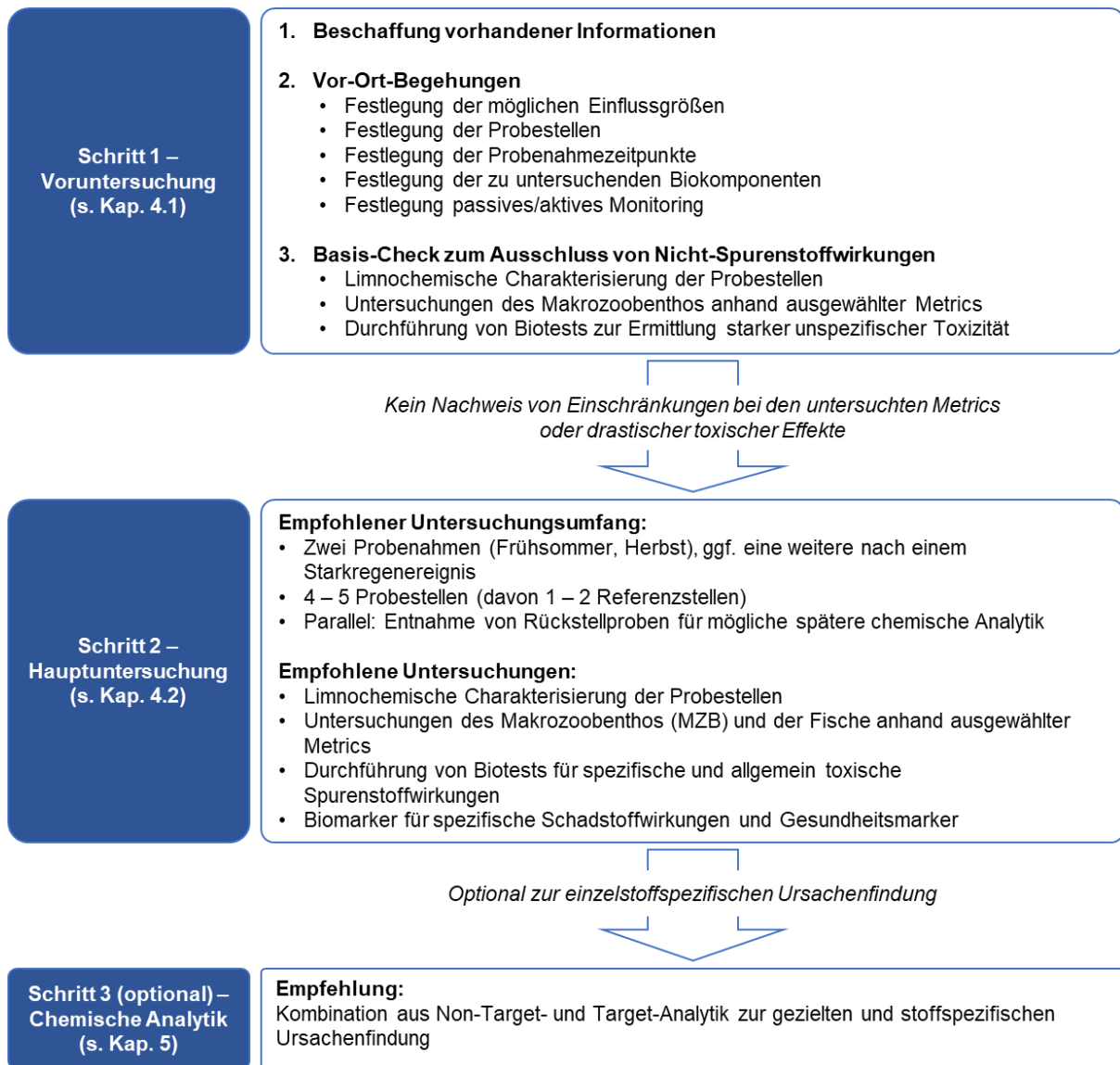


Abbildung 1: Schematische Übersicht über das Monitoringkonzept

4.1 Voruntersuchung

4.1.1 Beschaffung vorhandener Informationen

Informationen zur Vor-Ort-Situation werden zusammengestellt und mögliche Eintragsquellen von Spurenstoffen ermittelt. Bereits vorhandene Untersuchungsergebnisse inklusive chemisch-analytische Daten (z. B. aus dem Monitoring der EU-WRRL) werden beschafft. Hierfür können ggf. Behörden kontaktiert werden.

4.1.2 Vor-Ort-Begehungen

Festlegung der möglichen Einflussgrößen

Punktquellen: Direkt- und Indirekteinleiter (kommunale Kläranlagen, Gewerbe, Industrie) sowie Abläufe aus RÜB, RKB und RÜ sind zu lokalisieren. Möglichkeiten der Einleitung spezifischer Stoffe durch Indirekteinleiter sind zu erfragen. Im Zusammenhang mit Mischwasserentlastungen soll der Ausbaugrad ermittelt und das Entlastungsverhalten (Häufigkeit und zeitliche

Dauer der RÜB-Entlastungen) in trockenen und feuchten Jahren ausgewertet und in Beziehung zum mittleren Niedrigwasserabfluss des Gewässers (MNQ) gesetzt werden. Hinsichtlich des Einflusses der Straßenentwässerung sollte abgeklärt werden, inwieweit von größeren Straßen (Bundesstraße, Autobahn) Direkteinleitungen erfolgen.

Diffuse Einträge: Im Zusammenhang mit möglichen Einträgen aus der Landwirtschaft ist abzuklären, welche Nutzpflanzen angebaut werden, ob Tierhaltung stattfindet, ob und wann Gülle ausgebracht wird und welche Pestizide oder Veterinärpharmaka zum Einsatz kommen (ggf. durch Befragung von Landwirten oder Raiffeisenmärkten). Sonderkulturen (Intensiv-Obstanbau, Weinbau, etc.) spielen hier eine wichtige Rolle. Des Weiteren ist der mögliche Eintrag über den Sickerwasserpfad (Drainagen) und Oberflächeneinschwemmungen (Hangneigung, ausreichende Gewässerrandstreifen als Puffer, etc.) aus Deponien oder Altlasten abzuklären.

Festlegung der Probestellen

Unter Berücksichtigung der möglichen Einflussgrößen ist zu entscheiden, wie viele und welche Probestellen notwendig sind, um (a) stoffspezifische Effekte von solchen der Gewässerstruktur oder (b) Einträge aus Punktquellen von diffusen Einträgen trennen zu können. Messstellen des operativen Monitorings gemäß WRRL sollten, falls im Untersuchungsgebiet vorhanden, in das Monitoring einbezogen werden.

Bei der Auswahl der Probestellen ist darauf zu achten, dass die abiotischen Parameter, v. a. die Strömungs- und Substratdiversität, zwischen den einzelnen Stellen, die für die Bewertung einer Untersuchungsstelle im Gewässer herangezogen werden, (möglichst) nicht erheblich abweichen, damit potenziell nachweisbare Unterschiede in den Konsequenzen der stofflichen Gewässerbelastung nicht von Effekten durch Strukturunterschiede überdeckt werden. Zudem sollten immer mindestens eine, besser zwei anthropogen unbeeinflusste bzw. zumindest von der in Verdacht stehenden Belastungsquelle unbeeinflusste Referenzstelle mit beprobt werden, die sich im Gewässer oberhalb des Siedlungsgebietes befindet und vergleichbare morphologische Bedingungen wie die Untersuchungsstelle(n) aufweist.

Empfohlen werden insgesamt mindestens 4 – 5 Probestellen für den zu untersuchenden Gewässerabschnitt, die oberhalb und unterhalb möglicher Eintragsquellen liegen.

Festlegung der Probenahmezeitpunkte und Methoden der Probenahme

Die erste Probenahme (Basischeck; s. nachfolgende Beschreibung der Vorgehensweise) sollte im Frühjahr bzw. Frühsommer bei mindestens mittlerem Niedrigwasserstand (MNQ) als „Worst-case-Szenario“ durchgeführt werden. Nach Auswertung der Ergebnisse folgt im Rahmen der Hauptuntersuchung noch jeweils eine weitere Probenahme im Sommer und im Herbst ebenfalls bei Niedrigwasser, sowie nach einem Starkregenereignis, wenn RÜ und RÜB im Fokus stehen, um die hydraulische und jahreszeitliche Dynamik der Belastungssituation zu erfassen. Die Probenahme von Wasser- und Sedimentproben soll nach LAWA (2018) erfolgen. Für Wasser sind Sammelproben (24 h-Mischproben oder Mischungen aus 5 Stichproben, s. Tribskorn, 2020) einzelnen Stichproben vorzuziehen.

Festlegung der zu untersuchenden biologischen Qualitätskomponenten und Methoden der Probenahme

Es ist zu Beginn der Studie auch zu entscheiden, welche Art(en) im Zentrum des Interesses steht/stehen. An diese Fragestellung muss die Probenahmestrategie angepasst werden. Die Probenahme für Biomarkeruntersuchungen sollte für Fische gemäß VDI (2018) und für Wirbellose nach VDI (2022) erfolgen. Metrics zum Makrozoobenthos werden nach Perlodes und Daten zu Makrophyten und Phytoplankton nach PHYLIB erhoben.

Entscheidung, ob nur ein passives oder auch ein aktives Monitoring durchgeführt werden soll

Je nach Fragestellung bzw. vor-Ort-Situation können die Probenahmen (passives Monitoring) durch ein aktives Monitoring ergänzt werden. Die Kombination beider Monitoringstrategien erlaubt es, mögliche Adaptions- und erfolgte Selektionsprozesse innerhalb der abundanten Populationen aufzudecken. Dies wäre dann der Fall, wenn die im aktiven Monitoring eingesetzten (primär unbelasteten) Tiere stärkere Reaktionen als die im Gewässer lebenden Organismen zeigen. Vor- und Nachteile der beiden Monitoringarten sind in VDI 4230 Blatt 5 beschrieben (Tabelle 7). Zu beachten ist, dass das aktive Monitoring mit Fischen einen Tierversuch darstellt, der entsprechend beantragt werden und für den eine Genehmigung vorliegen muss.

Tabelle 7: Passives und aktives Monitoring: Vor- und Nachteile nach VDI 4230 Blatt 5

	Vorteile	Nachteile
Passives Monitoring	<ul style="list-style-type: none"> • integrative Erfassung aller Stressoren • kein Hälterungsstress, relativ geringer Stress durch (Zwischen-)Hälterung und Entnahme (Elektrofischung, Netzfang) • hohe Umweltrelevanz der Ergebnisse 	<ul style="list-style-type: none"> • integrative Erfassung aller Stressoren, deshalb Rückschlüsse auf einzelne Faktoren schwierig • „Vorgeschichte“ der Tiere unbekannt • hohe Variabilität (z. B. durch unterschiedliches Alter, Geschlechtsreife) • oft zu geringe Tierzahl für statistisch abgesicherte Aussagen • Probenahmen zum Teil witterungsabhängig • gegebenenfalls Reduzierung natürlicher Bestände (bei mehrfacher Befischung)
Aktives Monitoring	<ul style="list-style-type: none"> • homogenes Probenkollektiv als Versuchstiere, dadurch geringere Variabilität • genügend große Tierzahl möglich • experimenteller Zugang möglich: Minimierung des Einflusses externer Stressoren (z. B. Gleichschaltung von Temperatur, Sedimentfallen) • bessere Korrelation Ursache – Wirkung 	<ul style="list-style-type: none"> • gegebenenfalls Hälterungsstress (besonders mit Expositions Käfigen); besser Fließgewässerbypässe (siehe Abschnitt 2) • hoher Investitions- und Wartungsaufwand • Fließgewässerbypässe: Vorhandensein geeigneter örtlicher Rahmenbedingungen als Voraussetzung • geringere Umweltrelevanz der Ergebnisse • höherer Aufwand für die Genehmigung des Tierversuchs

4.1.3 Basis-Check zum Ausschluss von Nicht-Spurenstoffwirkungen

Zum Ausschluss von Nicht-Spurenstoffwirkungen wird im Rahmen des „Basis-Checks“ eine Probenahme im Frühjahr bzw. Frühsommer bei Niedrigwasser an vier bis fünf zuvor festgelegten Probestellen durchgeführt. Wenn die Auswirkungen punktförmiger Einleitungen (KA, RÜB) zu beurteilen sind, sind eine bis zwei oberstromige, von der in Verdacht stehenden Belastungsquelle unbeeinflusste Referenzstellen mit vergleichbaren morphologischen Bedingungen als Vergleichsbasis zur Bewertung heranzuziehen.

Durch die anschließenden Untersuchungen soll die Dominanz von Einflussgrößen anderer Natur als Spurenstoffe ausgeschlossen und sehr starke, unspezifisch toxische Einflüsse (z. B. Metall- oder Stickstoffbelastungen) erkannt werden.

Durchgeführt werden folgende Untersuchungen:

1. Limnochemische Charakterisierung der Probestellen (Stickstoffverbindungen, Phosphorverbindungen, Leitfähigkeit, pH, Temperatur, BSB₅, Sauerstoff, etc.)

Unter den chemisch-physikalischen Einflussfaktoren haben Ammonium bzw. Ammoniak als Schadfaktoren für die Biozönose eine große Bedeutung. Neben chemischen Analysen sollten beim Vorliegen einer Kläranlageneinleitung die Ammoniumkonzentrationen deshalb auch im Kläranlagenablauf überprüft und zum mittleren Niedrigwasserabfluss des

Gewässers in Beziehung gesetzt werden. In Verbindung mit dem pH-Wert und der Temperatur der Abwasserprobe kann auf der Basis der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration im Gewässer immissionsseitig das Auftreten toxischer Ammoniakkonzentrationen abgeschätzt werden.

2. Untersuchungen des Makrozoobenthos: Beprobung nach Perloides; Metrics zum Ausschluss von anderen Faktoren als Spurenstoffen.

In der Auswertung durch ASTERICS sollten in erster Linie folgende Metrics berücksichtigt werden:

- Saprobienindex, um die Relevanz der biologisch leicht abbaubaren organischen Belastung zu ermitteln.
- Sauerstoffversorgungsstufe anhand der Bioindikatortaxa *Ecdyonurus* spp. (Heptageniidae) als Vertreter der Eintagsfliegen, Plecoptera (Steinfliegen) und Elmidae (Hakenkäfer).
- Versauerungsgrad (Säureklasse) (hier auch Diatomeen-Modul „Versauerungszeiger“ (PHYLIB) berücksichtigen).
- Fauna-Index zur Ermittlung des Anteils der Referenzarten des entsprechenden Gewässertyps an der Biozönose der jeweiligen Untersuchungsstelle.

3. Biotests für starke Toxizität

Wasser- und Sedimentproben werden entnommen und mit *in vivo*-Biotests auf starke toxische Effekte hin untersucht. Diese Biotests können zwar auch auf Spurenstoffe reagieren, dies allerdings nur dann, wenn sie in sehr hohen Konzentrationen vorliegen. Hierfür kommen *in vivo* Tests mit Repräsentanten verschiedener trophischer Ebenen zum Einsatz, die die Bewertung von Freiwasser und Sedimentqualität erlauben. Empfohlen werden folgende akute Toxizitätstests:

- Der Algen-Wachstumshemmtest nach DIN EN ISO 8692:2012 mit Wasser.
- Der *Daphnia magna* Akuttest nach DIN EN ISO 6341:2013 bzw. OECD 202 mit Wasser.
- Der akute Fisch-Embryotest nach DIN EN ISO 15088:2008 bzw. OECD 236 (mit Wasser und Sediment).
- Der akute Toxizitätstest mit Zuckmücken in Anlehnung an OECD 235 (mit Wasser und Sediment).

4. Sonstiges

Steinunterseiten sollten auf das Vorhandensein bzw. den Grad von Schwarzfärbungen durch Eisensulfide und Faulschlammablagerungen untersucht werden.

Wenn durch diesen Basischeck keine Einschränkungen bezüglich der untersuchten Metrics und keine drastischen toxischen Effekte nachweisbar sind, ist es wenig wahrscheinlich, dass vorhandene Defizite im qualitativen und quantitativen Artenbestand auf akute stoffliche Belastung zurückzuführen sind. Es kann überdies davon ausgegangen werden, dass die Auswirkungen von Spurenstoffen durch o. g. Gewässerparameter nicht stark beeinflusst werden, so dass der Fokus beim weiteren Vorgehen auf Spurenstoffwirkungen gerichtet werden kann. Würden nur die unter Punkt 1 und 2 genannten Untersuchungen keine Hinweise auf Nicht-Spurenstoff-Belastungen liefern, bestimmte Biotests aber deutlich reagieren, läge die Vermutung nahe, dass bestimmte Spurenstoffe (z. B. Pestizide) in sehr hohen Konzentrationen im Gewässer vorhanden sein könnten. Die weitergehenden Untersuchungen können dann in Abhängigkeit vom Antwortmuster der Biotests ausgerichtet werden.

4.2 Hauptuntersuchung (effektbasiertes Spurenstoffmonitoring)

Basierend auf den Ergebnissen des Basis-Checks werden in dieser Phase Indikatoren untersucht, durch die einerseits spurenstoffliche Ursachen für Defizite detektiert und andererseits die negativen Auswirkungen der stofflichen Belastung auf den Gesundheitszustand von im Ökosystem lebenden Organismen näher charakterisiert werden sollen.

Empfohlen werden in jedem Fall **zwei Probenahmen**, je eine im Frühsommer und eine im Herbst nach längerer Niedrigwasserphase. Wenn Einträge aus RÜB oder RÜ im Verdacht stehen, ist eine weitere Probenahme nach einem Starkregenereignis (mit Entlastung des RÜB/RÜ) notwendig.

Empfohlen werden außerdem, entsprechend der in Kap. 4.1.2 dargestellten Voraussetzungen, **4 – 5 Probestellen**, von denen mindestens eine, besser zwei als Referenz dienen sollen. An allen Stellen sollten neben den jeweiligen Organismen das Oberflächenwasser (und wenn möglich auch das Sediment) mit den vorgeschlagenen Wirkpotentialtests untersucht werden. Stehen Kläranlagen im Fokus, sollten auch Abwasserproben entnommen und mit den vorgeschlagenen Tests auf potenziell zu erwartende Wirkungen hin untersucht werden.

Parallel zu den Proben für Biotests sollen Rückstellproben für mögliche spätere chemische Analysen entnommen und entsprechend konserviert werden.

Folgende Untersuchungen werden vorgeschlagen:

1. **Limnochemische Charakterisierung der Probestellen (s. Punkt 4.1.3)**
2. **Untersuchungen des Makrozoobenthos (MZB) und der Fische:** Beprobung nach Perioden für das MZB und Fische, wenn möglich, entsprechend dem fischbasierten Bewertungs-System für Fließgewässer – fiBS.

In der Auswertung durch ASTERICS sollten nun in erster Linie Metrics untersucht werden, die vorzugsweise Spurenstoffwirkungen indizieren:

- Sensitive Taxa: Hierbei kommt es nicht nur auf das Vorhandensein oder das Fehlen sensibler Arten an, sondern auch auf quantitative Veränderungen in der Abundanz dieser Arten (Besiedlungsdichte). Zum Vergleich mehrerer Untersuchungsstellen ist das prozentuale Verhältnis von sensitiven zu insensitiven Arten auf Basis der Häufigkeitsklassen sinnvoll. Die Austria-Liste (Moog & Hartmann, 2017) der sensitiven Arten sollte dazu für die verschiedenen Gewässertypen in Deutschland überprüft und gegebenenfalls ergänzt werden. Sobald weitere Erkenntnisse zur Empfindlichkeit bzw. Toxizität einzelner Taxa des MZB hinsichtlich bestimmter Gruppen oder einzelnen Spurenstoffen vorliegen, sollten diese in die Gruppe der sensitiven Taxa mitaufgenommen werden.
- Die Bestimmung des SPEAR_{pesticides}-Index kann zumindest bei kleineren Fließgewässern Hinweise auf die Präsenz von Pestiziden geben. Am sichersten ist dieser Befund bei einer Aufnahme innerhalb der Ausbringungsperiode von Pestiziden. Der Index sollte ggf. für die verschiedenen Belastungsszenarien entsprechend Ganatra et al. (2021) modifiziert werden.

3. **Biotests für spezifische und allgemein toxische Spurenstoffwirkungen**

In Wasser- und Sedimentproben werden Wirkpotentiale bestimmter Spurenstoffgruppen untersucht. Zusätzlich werden Biotests eingesetzt, die Wirkpotentiale für unspezifische Wirkendpunkte, wie z. B. oxidativen Stress, indizieren können, durch welche Organismen subletal in ihrer Resilienz negativ beeinflusst werden können.

4. Biomarker für spezifische Schadstoffwirkungen und Gesundheitsmarker

Biomarker und Gesundheitsmarker sollen an Organismen (v. a. Gammariden und abundanten Fischen, v. a. Bachforellen) durchgeführt werden, die im Rahmen der unter Punkt 2 beschriebenen Untersuchungen dem Gewässer entnommen wurden.

4.3 Werkzeugkasten für ein anlassbezogenes, gewässerspezifisches und effektbasiertes Spurenstoffmonitoring

Für sechs verschiedene Vor-Ort-Szenarien (mit dominanter Beeinflussung durch die häufigen Belastungsquellen Landwirtschaft, Industrie, Kläranlagen sowie Misch- oder Niederschlagswassereinleitungen, Krankenhäuser, Straßenentwässerung von großen Straßen oder im Bereich von Renaturierungsmaßnahmen bzw. Naturschutzgebieten) wird jeweils eine gestaffelte, dreistufige Toolbox zum effektbasierten Spurenstoffmonitoring vorgeschlagen. Je nach Vor-Ort-Situation und vor allem in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Ausstattung der Analyselabors, können die empfohlen Tests durch andere Assays, die vergleichbare Wirkmechanismen abdecken, ausgetauscht werden. Auch für den Fall, dass Defizite nur bei ganz bestimmten Taxa aufgetreten sind, können die nachfolgend vorgeschlagenen Methodenpaletten entsprechend auf Wirkmechanismen bei diesen Taxa angepasst werden.

Ein „kleines Paket“ enthält hierbei jeweils eine Basispalette an Tests zur Eingrenzung möglicher Spurenstoffwirkungen. Mit dem „mittleren Paket“ können Spurenstoffwirkungen mit größerer Genauigkeit identifiziert und ihre Relevanz für die Gewässerorganismen eingeschätzt werden. Eine optimale Palette an Tests enthält das „große Paket“, das in der Regel aufwändigere Untersuchungen *in vivo*, vor allem auch mit Fischen enthält. Stehen Arzneimittelwirkungen im Fokus, wird die Integration von Untersuchungen an Fischen in die Testpalette bereits zu einem frühen Zeitpunkt empfohlen. Hierfür müssen allerdings zunächst tierschutzrechtliche Voraussetzungen erfüllt sein.

Die Empfehlungen basieren auf den in den unter Anlage 1 aufgeführten Tabellen genannten Eigenschaften der Tests sowie auf persönlichen Erfahrungen der beiden Autorinnen im Rahmen durchgeführter Forschungsprojekte.

Die Empfehlungen sind in Tabelle 8 und

Tabelle 9 zusammengefasst.

4.3.1 Szenario 1: Gebiete mit Einfluss von Landwirtschaft

Gewässer, die durch landwirtschaftlich intensiv genutzte Gebiete fließen, können, v. a. dann, wenn Vorschriften für Gewässerrandstreifen nicht eingehalten werden, über Abdrift nach Regen oder über Lufteinträge während der Applikation diffus mit Pflanzenschutzmitteln belastet werden. Der für dieses Szenario empfohlene Werkzeugkasten enthält Wirkpotentialtests, Biomarker und Metrics, die neurotoxische Wirkungen von v. a. Insektiziden, phytotoxische Wirkungen von v. a. Herbiziden, mögliche hormonelle Wirkungen, die Populationsstrukturen verändern und zytotoxische Wirkungen, welche *in vitro*-Tests generell negativ beeinflussen. Im großen Paket sind zudem histologische Diagnosen integriert, die den Gesundheitszustand im Gewässer vorhandener Organismen erfassen und darstellen können.

4.3.2 Szenario 2: Gebiete mit Einfluss von Industrie

Kommen als Ursache für biozönotische Defizite mögliche Indirekteinleitungen aus der Industrie in Frage, stehen vor allem solche Wirkungen im Vordergrund, die für die möglicherweise eingeleiteten Stoffe zu erwarten wären, falls diese bekannt sind. Von genereller Bedeutung sind jedoch im Zusammenhang mit Abwässern, die über Industrie beeinflusst werden, vor allem genotoxische Effekte und dioxinähnliche Wirkungen, die auf Entgiftungsaktivitäten für bestimmte Stoffgruppen hinweisen. Hormonelle und zytotoxische Effekte sollen aus den o. g. Gründen betrachtet werden.

4.3.3 Szenario 3: Gebiete im Siedlungsraum

Da über Kläranlagen und RÜB komplexe Stoffgemische mit sehr unterschiedlichen Wirkmöglichkeiten in Gewässer eingeleitet werden, enthält dieses Szenario ein größeres Spektrum an empfohlenen Tests als die übrigen Szenarien. Viele der Methoden haben sich u. a. auch im Rahmen der von den Autorinnen dieser Studie durchgeführten Projekte als sinnvoll erwiesen, um Effekte der Spurenstoffentnahme über weitergehende Abwasserreinigung zu zeigen. Vor diesem Hintergrund sollen im Zusammenhang mit Abwasser- und Mischwassereinleitungen besonders auch ökotoxikologische Arzneimittelwirkungen, Parameter für oxidativen Stress und die Reproduktionstoxizität, betrachtet werden.

Untersuchungen mit Fischen werden hier bereits im mittleren Paket empfohlen, da, wie in Kap. 3.3 beschrieben, Fische als Wirbeltiere besonders sensitive Indikatoren für Medikamentenwirkungen darstellen. Obgleich bekannt ist, dass auch Pflanzenschutzmittel zu gewissen Anteilen über Kläranlagen eingetragen werden, wird bei diesem Szenario nicht auf solche fokussiert. Kläranlagen sind zwar mögliche Eintragsquellen von Pestiziden, aber nicht die Hauptquellen. Wollte man in allen Szenarien alle möglichen Ursachen abbilden, wäre stets eine äußerst umfangreiche Palette an Tests nötig. Besteht allerdings ein Verdacht, dass Pflanzenschutzmittel am Wirkungsspektrum beteiligt sind, können im Szenario 1 empfohlene Tests zusätzlich integriert werden.

4.3.4 Szenario 4: Gebiete mit Einfluss von Krankenhäusern als Indirekteinleiter

In diesem Szenario wird vor allem auf Effekte fokussiert, die im Zusammenhang mit Arzneimittelwirkungen stehen. Die empfohlene Palette entspricht damit zum Teil der für den Siedlungsraum empfohlenen Testbatterie.

4.3.5 Szenario 5: Gebiete mit Einfluss von Straßenverkehr

Liegt der Gewässerabschnitt, für den ein Defizit beobachtet wurde, im Bereich von Einleitungen aus Regenklärbecken oder Straßenabläufen ohne Einfluss von anderen Quellen, kann vermutet werden, dass Reifen- und Straßenabrieb sowie, v. a. im Winter, Streusalz für mögliche Schadwirkungen verantwortlich sein können. Die empfohlenen Tests beziehen sich auf Effekte, die durch Inhaltsstoffe von Reifen- und Straßenabrieb (z. B. PAH, Metalle) hervorgerufen werden können. Über Tests zu oxidativem Stress und zur Reproduktionstoxizität können Aussagen zur generellen toxischen Wirkung solcher Stoffe gemacht werden.

4.3.6 Szenario 6: Gebiete in renaturierten Gewässerbereichen bzw. Naturschutzgebieten

Treten trotz erfolgter Renaturierungsmaßnahmen in bestimmten Gewässerabschnitten Defizite auf, deren mögliche Ursachen unbekannt sind, kann dies möglicherweise an Stoffeinträgen liegen, die diffus oder z. B. über Kläranlagen stromaufwärts erfolgt sind. Wenn beispielsweise Stillwasserbereiche in der Folge von Renaturierungsmaßnahmen geschaffen werden, können in diesen Bereichen oberhalb eingetragene Stoffe an Feinsedimente binden und unter bestimmten Bedingungen wieder freigesetzt werden.

Die für dieses Szenario empfohlene Methodenpalette betrachtet sowohl mögliche Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln als auch von eingetragenen Stoffen aus Punktquellen, die für Instabilität von Populationen verantwortlich sein können.

Tabelle 8: Werkzeugkasten für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring in Gebieten mit Einfluss von Landwirtschaft oder Industrie sowie im Siedlungsraum

 Kleines Paket (Minimalpalette): **Rot fett**

 Mittleres Paket: **Rot fett + Schwarz fett**

 Großes Paket (Optimale Palette): **Rot fett + Schwarz fett + schwarz**

Vorort-Situation	Mögliche Belastungsquellen	Mögliche Wirkmechanismen	Empfohlene Wirkpotentialtests	Empfohlene Biomarker	Metrics / sensitive TAXA
Landwirtschaft	Run-off Landwirtschaft	Neurotoxizität	Acetylcholinesterase-Hemmtest Nekrose-P1-Test	Acetylcholinesterase-, Carboxylesterase-Hemmung (Fischhirn, Gammariden in toto)	Spear-Index Sensitive/EPT Taxa Gammariden Diatomeen
		Phytotoxizität	Myriophyllum spicatum Toxizitätstest (Wasser, Sediment) oder alternativ Lemna sp. Wachstumshemmtest (Wasser)		
		Hormonelle Wirkungen	YES / YAES ((anti)östrogene Wirkung) ER α -CALUX ((anti)-östrogene Wirkung)	Fekundität und Geschlechterverhältnis (Gammariden) Vitellogenin-Synthese (Fisch: Blut, Leber) Histologie Gonaden (Fisch)	
Industrie	Direkteinleiter Industrie, Run-off von Flächen (Materiallager)	Genotoxizität	Ames-Fluktuationstest Mikrokerntest umuC Test	Mikrokerntest (Fischblut)	Sensitive/EPT Taxa Gammariden Fischfauna/Salmoniden
		Dioxinähnliche Toxizität	AhR-CALUX EROD-Assay <i>in vitro</i>	EROD Aktivität (Fischleber)	
		Hormonelle Wirkungen	YES / YAES ((anti)östrogene Wirkung) ER α -CALUX ((anti)-östrogene Wirkung)	Fekundität und Geschlechterverhältnis (Gammariden) Vitellogenin-Synthese (Fisch: Blut, Leber) Histologie Gonaden (Fisch)	
		Gewebetoxizität / Cytotoxizität	CellTiter-Glo® 2.0	Histopathologie (Fisch: Leber, Kieme, Niere)	
Siedlungsraum	Kläranlagen, RÜB	Gewebetoxizität / Cytotoxizität	CellTiter-Glo® 2.0	Histopathologie (Fisch: Leber, Kieme, Niere)	Spear-Index Sensitive/EPT Taxa Gammariden Fischfauna/Salmoniden Diatomeen
		Spez. Arzneimittelwirkungen	NSAID Biosensor (Schmerzmittel) Biosensor: b1-Adrenozeptor (Betablocker)	Fish Prostaglandin E2-Assay (Fisch: Blut)	
		Hormonelle Wirkungen	YES / YAES ((anti)östrogene Wirkung) ER α -CALUX ((anti)-östrogene Wirkung)	Vitellogenin-Synthese (Fisch: Blut, Leber) Histologie Gonaden (Fisch) Fekundität und Geschlechterverhältnis (Gammariden)	
		Dioxinähnliche Toxizität	AhR-CALUX, EROD-Assay <i>in vitro</i>	EROD Aktivität (Fischleber)	
		Genotoxizität	Ames-Fluktuationstest Mikrokerntest umuC Test	Mikrokerntest (Fischblut)	
		Oxidativer Stress	Nachweis von Oxiradikalen mit DCFHDA	Glutathion-S- Transferase, Superoxiddismutase, Lipidperoxidation (Fisch, Gammariden)	
		Reproduktionstoxizität	Reproduktionstest mit Potamopyrgus antipodarum (Wasser) Fish Early Life Stage Test (Wasser, Sediment) <i>Lumbriculus variegatus</i> - Toxizitätstest (Sediment)		

Tabelle 9: Werkzeugkasten für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring in Gebieten mit Einfluss von Krankenhäusern, Straßenverkehr sowie in renaturierten Gewässerbereichen bzw. Naturschutzgebieten

 Kleines Paket (Minimalpalette): **Rot fett**

 Mittleres Paket: **Rot fett + Schwarz fett**

 Großes Paket (Optimale Palette): **Rot fett + Schwarz fett + schwarz**

Vorort-Situation	Mögliche Belastungsquellen	Mögliche Wirkmechanismen	Empfohlene Wirkpotentialtests	Empfohlene Biomarker	Metrics / sensitive TAXA
Stark befahrene Straßen	Regenklärbecken, Straßen-Runoff	Dioxinähnliche Toxizität	AhR-CALUX Assay <i>in vitro</i>	EROD- EROD Aktivität (<i>Fisch: Leber</i>)	Sensitive/EPT Taxa Spear- Index Gammariden Fischfauna/Salmoniden
		Genotoxizität	Ames-Fluktuationstest Mikrokerntest umuC Test	Mikrokerntest (<i>Fisch: Blut</i>)	
		Reproduktionstoxizität	Lumbriculus variegatus - Toxizitätstest (Sediment) Chironomus riparius (Wasser und Sediment)		
		Oxidativer Stress	Oxidativer Stress durch Nachweis von ROS mit DCFHDA	Glutathion-S- Transferase, Superoxiddismutase, Lipidperoxidation (<i>Fisch: div. Organe; Gammariden in toto</i>)	
Naturschutzgebiet, Renaturierungsmaßnahme	unbekannt	Hormonelle Wirkungen	YES/YAES ((anti)östrogene Wirkung) ER α -CALUX ((anti)-östrogene Wirkung)	Vitellogenin-Synthese (<i>Fisch: Blut, Leber</i>) Histologie Gonaden (<i>Fisch</i>) Fekundität und Geschlechterverhältnis (Gammariden)	Sensitive/EPT Taxa Gammariden Fischfauna/Salmoniden
		Neurotoxizität	Acetylcholinesterase-Hemmtest Nekrose-P1-Test	Acetylcholinesterase-, Carboxylesterase-Hemmung (<i>Fischhirn, Gammariden in toto</i>)	
		Phytotoxizität	Myriophyllum spicatum Toxizitätstest (Wasser, Sediment) oder alternativ Lemna sp. Wachstumshemmtest (Wasser)		
		Hormonelle Wirkungen	YES / YAES ((anti)östrogene Wirkung) ER α -CALUX ((anti)-östrogene Wirkung)	Fekundität und Geschlechterverhältnis (Gammariden) Vitellogenin-Synthese (Fisch: Blut, Leber) Histologie Gonaden (Fisch)	
		Reproduktionstoxizität	Fish Early Life Stage Test (Wasser, Sediment) Lumbriculus variegatus - Toxizitätstest (Sediment) Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i> (<i>Wasser</i>)		
		Gewebetoxizität / Cytotoxizität	CellTiter-Glo® 2.0	Histopathologie (Fisch: Leber, Kieme, Niere)	

4.4 Chemische Analytik zur Ursachen-Spezifizierung für nachgewiesene Spurenstoffwirkungen

Die vorgeschlagenen Empfehlungen für die Durchführung eines investigativen und effektbasierten Spurenstoffmonitorings haben zum Ziel, Ursachen für auftretende Defizite im Gewässer bestimmten Stoffgruppen zuordnen zu können. Ohne begleitende chemisch-analytische Untersuchungen wird eine einzelstoffspezifische Zusammenhangsanalyse in der Regel jedoch nicht möglich sein. Bereits vorliegende chemische Messdaten im Bereich des Untersuchungsgebiets sollten mit Beginn der Untersuchung ausgewertet und in die Interpretation einbezogen werden.

Falls eine gezielte und stoffspezifische Ursachenfindung gewünscht ist, kann im Anschluss an das Effektmonitoring gezielt innerhalb der als relevant bestimmten Stoffklassen nach den für die Effekte relevanten Einzelstoffen gesucht werden. Hierfür sollten während der Probenahmen für das Effektmonitoring Rückstellproben entnommen, konserviert und bei Bedarf mit einer Kombination aus Non-Target- und Target-Analytik ausgewertet werden.

5 Zusammenfassung

Unsere Gewässerökosysteme werden durch multiple Stressoren beeinflusst. Diese beinhalten neben strukturellen und saprobiellen Defiziten komplexe stoffliche Belastungen u. a. mit nicht explizit in der OGWV geregelten Stoffen bzw. deren Mischungen, die in geringen Konzentrationen in Oberflächengewässern nachweisbar sind und als Spurenstoffe bezeichnet werden. In welchem Ausmaß diese Spurenstoffe tatsächlich dazu beitragen, dass sehr viele unserer Fließgewässer nicht den Anforderungen der EU-WRRL genügen und keinen guten chemischen bzw. ökologischen Zustand aufweisen, ist derzeit nicht ausreichend bekannt.

Effektstudien bieten den Vorteil, sowohl stoffgruppenspezifische Ursachen für Defizite zu detektieren, als auch integrierend Auswirkungen der Spurenstoffmischungen inklusive nicht bekannter Verbindungen auf den Gesundheitszustand der im Gewässer abundanten Organismen charakterisieren zu können. Dies beinhaltet ebenfalls die Erfassung von Interaktionen von Spurenstoffen mit natürlichen Stressoren (*confounding factors*, z. B. Temperatur, pH-Wert des Wassers, etc.), die für Modulationen der Toxizität verantwortlich sein können.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der aktuelle Stand des Wissens zu möglichen Spurenstoffwirkungen bei aquatischen Organismen ausgewertet, und es wurde recherchiert, welche Effekt-basierten Methoden in der Literatur beschrieben sind, um solche Wirkungen nachzuweisen. Die gesammelten Daten wurden darauffolgend entsprechend der jeweils adressierten Wirkmechanismen sortiert und tabellarisch zusammengefasst. Die so generierten Tabellen enthalten u. a. Informationen zum Indikationsspektrum und den Untersuchungsendpunkten, zu möglichen Untersuchungsmatrizes sowie zum Etablierungsstatus, zur Robustheit bzw. zu Störfaktoren, zum Zeitaufwand bei der Durchführung und zur Notwendigkeit der Probenanreicherung. Detaillierte Informationen zu Verfahren der Probenanreicherung sind Grummt et al. (2017) zu entnehmen. Aus diesen umfassenden Tabellen wurde anschließend eine Auswahl an generell für ein Monitoring von Spurenstoffwirkungen geeigneten, möglichst robusten und überwiegend sehr gut etablierten Tests getroffen. Darüber hinaus wurde gesondert zusammengestellt, welche effektbasierten Methoden derzeit in entsprechenden Fachlaboratorien für spezifische Fragestellungen bereits angewendet werden.

Aufbauend auf diesen Tabellen wurde im Anschluss ein mehrstufiges Programm für ein effektbasiertes Spurenstoffmonitoring in kleinen und mittleren Fließgewässern vorgeschlagen. Hierbei muss zunächst in einem ersten Schritt (Basis-Check) die Dominanz von Nicht-Spurenstoffwirkungen ausgeschlossen werden. Für den dann folgenden zweiten Schritt (Hauptuntersuchung) wurde der empfohlene Untersuchungsumfang definiert und für sechs verschiedene Vor-Ort-Szenarien mit dominanter Beeinflussung durch Landwirtschaft, Industrie, Kläranlagen und Mischwasserentlastungen, Krankenhäuser, große Straßen oder im Bereich von Renaturierungsmaßnahmen bzw. Naturschutzgebieten jeweils eine gestaffelte, dreistufige Toolbox zum effektbasierten Spurenstoffmonitoring vorgeschlagen. Diese enthält in allen Fällen eine Kombination aus in der EU-WRRL etablierten Metrics auf biozönotischer Ebene, Biomarkern als Gesundheitsindikatoren für die im Gewässer präsenten Organismen und laborbasierten Biotests. Die vorgeschlagenen Methoden wurden bereits in zahlreichen Projekten zur Bewertung der Belastung von Fließgewässern oder zur Beurteilung des Erfolgs der weitergehenden Abwasserreinigungsstufe auf Kläranlagen für die angeschlossenen Gewässer eingesetzt. Für die Priorisierung der jeweils empfohlenen Methoden wurden (1) die zu erwartenden Wirkmechanismen bzw. Wirkorte für mögliche Spurenstoffwirkungen und die für diese sensitiven Arten, (2) der Etablierungsgrad und die Robustheit der Methoden, (3) tierschutzrechtliche Aspekte, (4) entstehende Kosten sowie (5) der Zeitaufwand für die durchzuführenden Analysen

berücksichtigt. Zudem wurde der Erfahrungsschatz der Autorinnen im Zusammenhang mit dem effektbasierten Monitoring berücksichtigt.

Im Rahmen dieser Studie wurde somit ein innovatives Monitoringkonzept zur Differenzierung und Erfassung von Spurenstoffwirkungen erarbeitet, das relevanten Akteuren als Instrument zur Ursachenfindung im Rahmen von Defizitanalysen, der Maßnahmenplanung oder auch anschließenden Erfolgskontrollen zur Verfügung gestellt werden kann.

Literaturverzeichnis

- Adams, S.M. (2000). Assessing sources of stress to aquatic ecosystems using integrated biomarkers. In: Balázs E. *et al.* (Hrsg.), Biological resource management connecting science and policy. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04033-1_2
- Adams, S.M., Greeley, M.S. (2000). Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut* 123:103-115. <https://doi.org/10.1023/A:1005217622959>
- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T. (2001). The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology, *Biomarkers*, 6(1):1-6. <https://doi.org/10.1080/135475001452724>
- Abegglen, C., Siegrist, H. (2012). Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser – Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. *Umwelt-Wissen* 1214. Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern, Schweiz.
- Aborgiba, M., Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Elbahi, S., Knežević-Vukčević, J., Lenhardt, M., Paunović, M., Gačić, Z., Vuković-Gačić, B. (2016). Flooding modifies the genotoxic effects of pollution on a worm, a mussel and two fish species from the Sava River. *Sci Total Environ* 540:358-367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.120>
- AFNOR 2000 NF T 90-376 (2008). Water quality – determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test. Normalisation française, Saint Denis, Frankreich.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), *Methods of enzymatic analysis* (Second Edition). Academic Press, New York.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. (2006): Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76(2):160-202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., de Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S.M.T. (2017). Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J Appl Toxicol* 37(9):1098-1107. <https://doi.org/10.1002/jat.3461>
- ARGE (Hrsg.) (2015). Mikroschadstoffentfernung machbar? Zusammenstellung wesentlicher Inhalte einer Machbarkeitsstudie für Anlagen zur Mikroschadstoffelimination. ARGE Kompetenzzentrum Mikroschadstoffe Nordrhein-Westfalen. https://nrw-mikro.amit-services.de/fileadmin/user_upload/Broschueren_PDFs_und_Titel_JPGs/Machbarkeitsstudie_11_2016.pdf
- Arts, M.-J.S.J., Schill, R.O., Kniggem T., Eckwert, H., Kammenga, J.E., Köhler, H.-R. (2004). Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13(8):739-755. <https://doi.org/10.1007/s10646-003-4473-5>
- Ashauer, R. (2016). Post-ozonation in a municipal wastewater treatment plant improves water quality in the receiving stream. *Environ Sci Eur* 28(1):1

- Asterics (2013). Deutsches Bewertungssystem auf Grundlage des Makrozoobenthos einschließlich Perlodes. Version 4. <https://docplayer.org/17187109-Software-handbuch-asterics-version-4-1-asterics-einschliesslich-perlodes-deutsches-bewertungssystem-auf-grundlage-des-makrozoobenthos.html>
- Asterics-Perlodes (2020). Dokumentation Teil III, Beschreibung der Indizes Version 5. https://www.gewaesser-bewertung-berechnung.de/files/downloads/perlodes/PerlodesOnline_Dokumentation_Teil_III_Beschreibung_Indizes.pdf
- Babu, T.S., Akhtar, T.A., Lampi, M.A., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (2003). Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant Cell Physiol* 44(12):1320-1329. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg160>
- Bader, K. (2013). Abschätzung des Belastungszustandes der Erms mit Hilfe von biochemischen und histologischen Biomarkern bei der Groppe (*Cottus gobio*). Dissertation, Universität Tübingen.
- Barry, M.J., Logan, D.C. (1998). The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquat Toxicol* 41(1):101-124. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00063-5).
- Batista, N.J.C., de Carvalho Melo Cavalcante, A.A., de Oliveira, M.G., Medeiros, E.C.N., Machado, J.L., Evangelista, S.R., Dias, J.F., dos Santos, C.E.I., Duarte, A., da Silva, F.R., da Silva, J. (2016). Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere*, 164:134-141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.091>
- Beijer, K., Björlenius, B., Shaik, S., Lindberg, R.H., Brunström, B., Brandt, I. (2017). Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: evaluation using biomarker responses and chemical analysis. *Chemosphere* 176:342-351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.127>
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T. Burkhardt-Holm, P. (2004). Evaluation of two monitoring approaches to assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. *Hydrobiologia* 524:53-66. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000036196.84682.27>
- Bernhard, K., Stahl, C., Martens, R., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Scheurer, M., Frey, M. (2017). Two novel real time cell-based assays quantify beta-blocker and NSAID specific effects in effluents of municipal wastewater treatment plants. *Water Res* 115:74-83. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.036>
- Binuramesh, C., Michael, R.D. (2011). Diel variations in the selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol* 30(3):824-829. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.004>
- Blechinger, S.R., Kusch, R.C., Haugo, K., Matz, C., Chivers, D.P., Krone, P.H. (2007). Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 224(1):72-80. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.025>

BMU/UBA (Hrsg) (2017). Policy Paper: Empfehlungen des Stakeholder-Dialogs „Spurenstoffstrategie des Bundes“ an die Politik zur Reduktion von Spurenstoffeinträgen in die Gewässer. Hillenbrand, T., Tettenborn, F., Bloser, M., Fligge, F., Anton J.; Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit, Bonn; Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

BMU/UBA (Hrsg.) (2019a). Ergebnispapier – Ergebnisse der Phase 2 des Stakeholder-Dialogs »Spurenstoffstrategie des Bundes« zur Umsetzung von Maßnahmen für die Reduktion von Spurenstoffeinträgen in die Gewässer. Hillenbrand, T., Tettenborn, F., Bloser, M.; Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit, Bonn; Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

BMU/UBA (Hrsg.) (2019b). Wasserwirtschaft in Deutschland. Grundlagen, Belastungen, Maßnahmen. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

BMU (2021). Nationale Wasserstrategie. Entwurf des Bundesumweltministeriums. https://www.bmu.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Binnengewasser/langfassung_wasserstrategie_bf.pdf

Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P.S., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010). Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 700(1):11-17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.04.016>

Bolcsfoldi, G. (1995). The DNA alkaline unwinding genotoxicity test. In: O'Hare, S., Atterwill, C.K. (Hrsg.), *In vitro* toxicity testing protocols. Humana Press, Totowa.

Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., Herráez, D.L., Miège, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Rüdél, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P.J., van Gils, J., van Wezel, A.P., Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., Ohe, P.C., Vrana, B. (2017). Towards the review of the European Union Water Framework Directive: recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci Total Environ* 576:720–737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.104>

Brack, W., Escher, B.I., Müller, E., Schmitt-Jansen, M., Schulze, T., Slobodnik, J., Hollert, H. (2018). Towards a holistic and solution-oriented monitoring of chemical status of European water bodies: how to support the EU strategy for a non-toxic environment? *Environ Sci Eur* 30(1):33. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0161-1>

Brack, W. (2019). Solutions for present and future emerging pollutants in land and water resources management. Policy briefs summarizing scientific project results for decision makers. *Environ Sci Eur* 31:74. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0252-7>

Brack, W., Ait-Aissa, S., Altenburger, R., Cousins, I., Dulio, V., Escher, B., Focks, A., Ginebreda, A., Hering, D., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kortenkamp, A., de Alda, M.L., Posthuma, L., Schymanski, E., Segner, H., Slobodnik, J. (2019a). Let us empower the WFD to prevent risks of chemical pollution in European rivers and lakes. *Environ Sci Eur* 31(1):47. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0228-7>

- Brack, W., Ait-Aissa, S., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B.I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, T.-B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A.J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X., Altenburger, R. (2019b). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Env Sci Eur* 31:10. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>
- Brain, R., Cedergreen, N. (2009). Biomarkers in aquatic plants: selection and utility. *Rev Environ Contam Toxicol* 198:49-109. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_2
- Brauch H.-J., (2011). Organische Spurenstoffe in Gewässern. *gwf-Wasser/Abwasser*, 12:1206-1211.
- Brennan, J.C., He, G., Tsutsumi, T., Zhao, J., Wirth, E., Fulton, M.H., Denison, M.S. (2015). Development of species-specific Ah receptor-responsive third generation CALUX cell lines with enhanced responsiveness and improved detection limits. *Environ Sci Technol* 49(19):11903-11912. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02906>
- Brettschneider, D.J., Misovic, A., Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Oehlmann, J. (2019a). Poison in paradise: increase of toxic effects in restored sections of two rivers jeopardizes the success of hydromorphological restoration measures. *Environ Sci Eur* 31:36. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0218-9>
- Brettschneider, D.J., Misovic, A., Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Oehlmann, J. (2019b). 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. *Environ Sci Eur* 31:7. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0190-4>
- Brinke, M., Bänsch-Baltruschat, B., Keller, M., Szöcs, E., Schäfer, R., Foit, K., Liess, M. (2017). Umsetzung des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pestiziden Bestandsaufnahme zur Erhebung von Daten zur Belastung von Kleingewässern der Agrarlandschaft. UBA TEXTE 89/2017. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C., Vulule, J. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc* 13(3):233-237.
- BUND (2017). Standpunkt 11: Mikroschadstoff-Strategie. https://www.bund.net/fileadmin/user_upload_bund/publikationen/fluesse/fluesse_mikroschadstoffe_standpunkt.pdf
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Seitz, F., Stang, C., Schulz, R. (2011a). Ecotoxicological evaluation of three tertiary wastewater treatment techniques via meta-analysis and feeding bioassays using *Gammarus fossarum*. *J Hazard Mater* 192(2):772-778. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.079>
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Schulz, R. (2011b). The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. *Environ Pollut* 159(1):244-249. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.030>
- Buchberger, A.-K., Brettschneider, D., Berg, K., Jungmann, D., Oehlmann, J., Scheurer, M., and Oetken, M. (2018). Effects of metoprolol on aquatic invertebrates in artificial indoor streams. *J Environ Sci Health, Part A*, 53(8): 728-739. doi:10.1080/10934529.2018.1444964

- Cahill, P.A., Knight, A.W., Billinton, N., Barker, M.G., Walsh, L., Keenan, P.O., Williams, C.V., Tweats, D.J., Walmsley, R.M. (2004). The GreenScreen® genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis* 19(2):105-119. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh015>.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250(14): 5475-5480.
- Cavalcante, D.G., Martinez, C.B., Sofia, S.H. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655(1-2): 41-6. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>
- Celi, M., Filiciotto, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Quinci, E.M., Maccarrone, V., Mazzola, S., Vazzana, M., Buscaino, G. (2016). Vessel noise pollution as a human threat to fish: assessment of the stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758). *Fish Physiol Biochem* 42(2):631-641. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0165-3>
- Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Moser, V.C., Padilla, S. (1997). Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundam Appl Toxicol* 38(2):148-157. <https://doi.org/10.1006/faat.1997.2329>
- Chaumot, A., Coulaud, R., Olivier, A., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O. (2019). *In Situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1-Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. *Environ Toxicol Chem* 39(3):667-677. <https://doi.org/10.1002/etc.4655>
- Coe, T.S., Hamilton, P.B., Hodgson, D., Paull, G.C., Stevens, J.R., Sumner, K., Tyler, C.R. (2008). An environmental estrogen alters reproductive hierarchies, disrupting sexual selection in group-spawning fish. *Environ Sci Technol* 42 (13): 5020-5025. <https://doi.org/10.1021/es800277q>
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles S., Chaumot, A. (2011). *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res* 45(19):6417-6429. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.035>
- Danabas, D., Yildirim, N., V., Yildirim, N., Aksu, O. (2019). Congo red effects on detoxification and metabolic enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Turk J Agric Food Sci Technol* 7(9):1424-1428. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1424-1428.2727>
- von Dassel-Scharf, J. (2020). Fischbestandserfassungen in Oberweser und Werra. Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezernat Binnenfischerei – Fischereikundlicher Dienst, Hannover.
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., Madigou, C., Delmas, F. (2009). Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat Toxicol* 93(1): 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.02.014>
- Deutschmann, B., Kolarevic, S., Brack, W., Kaisarevic, S., Kostic, J., Kracun-Kolarevic, M., Liska, I., Paunovic, M., Seiler, T.-B., Shao, Y., Sipos, S., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Vukovic-Gacic, B., Hollert, H. (2016). Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube

on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. *Sci Total Environ* 573:1441-1449. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.175>

Deutschmann, B. (2020): Potential and challenge: biomarker response analyses in environmental risk assessment - case studies with fish. Dissertation, RWTH Aachen, Aachen.

DIN 38412-30:1989. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L): Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (L 30) (DIN 38412-30:1989-03). Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/2314203>

DIN 38415-1:1995. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest) (T1) (DIN 38415-1:1995-02). Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/2739219>

DIN 38415-3:1996. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T3) (DIN 38415-3:1996-12). Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/7294420>

DIN EN ISO 11348-2:2009. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 2: Verfahren mit flüssig getrockneten Bakterien (ISO 11348-2:2007); Deutsche Fassung EN ISO 11348-2:2008. Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/1495362>

DIN EN ISO 15088:2009. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007); Deutsche Fassung EN ISO 15088:2008. Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/1495364>

DIN EN ISO 21427-2:2009. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Gentoxizität mit dem *In-vitro*-Mikrokerntest - Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (ISO 21427-2:2006); Deutsche Fassung EN ISO 21427-2:2009. Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/1518949>

DIN EN ISO 6341:2013. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Akuter Toxizitäts-Test (ISO 6341:2012); Deutsche Fassung EN ISO 6341:2012. Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/1911255>

DIN ISO 16191:2019. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Sedimenten auf das Wachstumsverhalten von *Myriophyllum aquaticum* (ISO 16191:2013). Deutsches Institut für Normung e.V. <https://doi.org/10.31030/3061665>

DIN EN ISO 20079:2006. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) - Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005); Deutsche Fassung EN ISO 20079:2006. Deutsches Institut für Normung e.V.

- Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.D. (2002). The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays, and selected biomarkers. *Chemosphere* 46(2): 225-233. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00062-5)
- Durand, A.M., Rotteveel, S.G.P., Collombon, M.T., van der Grinten, E., Maas, J.L., Verweij, W. (2009). RIVM Report 607013010/2009: Toxicity measurements in concentrated water samples - Evaluation and validation. Abrufbar unter: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/607013010.pdf>
- DWA-Themen T3/2015 - Möglichkeiten der Elimination von anthropogenen Spurenstoffen.
- Eder, K.J., Clifford, M.A., Hedrick, R.P., Köhler, H.-R., Werner, I. (2008). Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 25(5):508-516. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.003>
- Eggen, R.I.L., Hollender, J., Joss, A., Schärer, M., Stamm, C. (2014). Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: the benefits of upgrading wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* 48(14):7683–7689. <https://doi.org/10.1021/es500907n>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2): 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ergene, S., Çavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Aymak, C. (2007). Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 48(6):421-429. <https://doi.org/10.1002/em.20291>
- Escher, B.I., Aït-Aïssa, S., Behnisch, P.A., Brack, W., Brion, F., Brouwer, A., Buchinger, S., Crawford, S.E., Du Pasquier, D., Hamers, T., Hettwer, K., Hilscherová, K., Hollert, H., Kase, R., Kienle, C., Tindall, A.J., Tuerk, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E., Neale, P.A. (2018). Effect-based trigger values for *in vitro* and *in vivo* bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Sci Total Environ*, 628-629: 748-765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.340>.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L. (2014). Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with *in vitro* bioassays. *Environ Sci Technol* 48(3):1940-1956. <https://doi.org/10.1021/es403899t>
- Escher, B.I., Dutt, M., Maylin, E., Tang, J.Y.M., Toze, S., Wolf, C.R., Lang, M. (2012). Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *J Environ Monit* 14(11):2877-2885. <https://doi.org/10.1039/C2EM30506B>

- Escher, B.I., Glauch, L., König, M., Mayer, P., Schlichting, R. (2019). Baseline toxicity and volatility cutoff in reporter gene assays used for high-throughput screening. *Chem Res Toxicol* 32(8): 1646-1655. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00182>
- Escher, B.I., Neale, P.A. (2021). Effect-based trigger values for mixtures of chemicals in surface water detected with *in vitro* bioassays. *Environ Toxicol Chem* 40(2): 487-499. <https://doi.org/10.1002/etc.4944>
- EU (2013). RICHTLINIE 2013/39/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik. OJ, L226/1.
- Farcy, E., Burgeot, T., Haberkorn, H., Auffret, M., Lagadic, L., Allenou, J.-P., Budzinski, H., Mazzella, N., Pete, R., Heydorff, M., Menard, D., Mondeguer, F., Caquet, T. (2013). An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France. *Environ Sci Pollut Res* 20(2):630-650. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1316-z>
- Farmen, E., Harman, C., Hylland, K., Tollefsen, K.E. (2010). Produced water extracts from North Sea oil production platforms result in cellular oxidative stress in a rainbow trout *in vitro* bioassay. *Mar Pollut Bull* 60(7):1092-1098. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.015>
- Fiedler, S., Wünnemann, H., Hofmann, I., Theobalt, N., Feuchtinger, A., Walch, A., Schwaiger, J., Wanke, R., Blutke, A. (2020). A practical guide to unbiased quantitative morphological analyses of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ecotoxicological studies. *PLoS One* 15(12): e0243462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243462>
- Fischer, S., Fischer, M., Schirmer, K., Werner, I. (2017). Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: Biomonitoring mit Forellen. Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU). Ökotoxzentrum Dübendorf, Schweiz.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102(1):99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Flohé, L., Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-121. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Ford, A.T., LeBlanc, G.A. (2020): Endocrine disruption in invertebrates: a survey of research progress. *Environ Sci Technol* 54(21): 13365-13369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04226>
- Fulton, M.H., Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 20(1):37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Gan, T.J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin* 26(7):1715-1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Ganatra, A.A., Kandie, F.J., Fillinger, U., McOdimba, F., Torto, B., Brack, W., Liess, M., Hollert, H., Becker, J.M. (2021). Calibration of the SPEARpesticides bioindicator for cost-effective pesticide monitoring in East African streams. *Environ Sci Eur* 33: 58. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00497-9>

- Garrison, P.M., Tullis, K., Aarts, J.M.M.J.G., Brouwer, A., Giesy, J.P., Denison, M.S. (1996). Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like chemicals. *Fundam Appl Toxicol* 30(2):194-203. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0056>
- Giebner, S., Ostermann, S., Straskraba, S., Oetken, M., Oehlmann, J., Wagner, M. (2018). Effectivity of advanced wastewater treatment: reduction of *in vitro* endocrine activity and mutagenicity but not of *in vivo* reproductive toxicity. *Environ Sci Pollut Res* 25(5):3965-3976. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7540-1>
- Glauch, L., Escher, B.I. (2020). The combined algae test for the evaluation of mixture toxicity in environmental samples. *Environ Toxicol Chem* 39(12):2496-2508. <https://doi.org/10.1002/etc.4873>
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo, P.F., Duarte, M.F., Vieira, V.L. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Saf* 65(2):237-241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Loro, V.L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146(4): 519-24. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004>
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G. (2001): Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int* 26(7): 483-495. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00031-9)
- Greulich, K., Pflugmacher, S. (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquat Toxicol* 65(3):329-36. doi: 10.1016/s0166-445x(03)00153-x
- Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M., Salamone, M.F. (1992): The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat Res* 270(1): 53-64. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90101-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90101-7)
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, D., Crane, M. (2001). Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environ Toxicol Chem* 20(8): 1792-1797. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200824>
- Grummt, T., Hansen, P.-D., Rettberg, P., Waldmann, P., Zipperle, J. (2004). Unerwünschte Wirkungen im Gewässer: Gentoxizität als prioritärer Messparameter. *Chemie in unserer Zeit* 38(4): 248-255. <https://doi.org/10.1002/ciuz.200400303>
- Grummt, T., Triebkorn, R., Oehlmann, J., Braunbeck, T., Happel, O. (2017). RiSKWa - Statuspapier: Methoden zur (öko-)toxikologischen Bewertung von Spurenstoffen im Wasserkreislauf - Ergebnisse des Querschnittsthemas "(Öko-) Toxikologie". DECHEMA e.V., Frankfurt am Main.
- Grummt, T., Braunbeck, T., Hollert, H., Kramer, M. (2018). RiSKWa - Leitfaden: Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box). Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

- Gulati, D.K., Witt, K., Anderson, B., Zeiger, E., Shelby, M.D. (1989). Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells *in vitro* III: Results with 27 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 13(2):133-193. <https://doi.org/10.1002/em.2850130208>
- Gunatilaka, A., Diehl, P. (2001). A brief review of chemical and biological continuous monitoring of rivers in Europe and Asia. In: Butterworth, F. M., Gunatilaka, A., Gonsebatt, M. E. (Hrsg.), *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*, Vol. 2, Kluwer Academic/Plenum Publishing Corp, New York.
- Gutendorf, B., Westendorf, J. (2001). Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166(1):79-89. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00437-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00437-1)
- Gutleb, A.C., Meerts, I.A.T.M., Bergsma, J.H., Schriks, M., Murk, A.J. (2005). T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environ Toxicol Pharmacol* 19(2):231-238. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.06.003>
- Guzzella, L., Monarca, S., Zani, C., Feretti, D., Zerbini, I., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Richardson, S.D. (2004). *In vitro* potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. *Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutagen* 564(2):179-193. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.08.006>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases - The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249(22): 7130 - 7139.
- Halbach, K., Möder, M., Schrader, S., Liebmann, L., Schäfer, R.B., Schneeweiss, A., Schreiner, V.C., Vormeier, P., Weisner, O., Liess, M., Reemtsma, T. (2021). Small streams—large concentrations? Pesticide monitoring in small agricultural streams in Germany during dry weather and rainfall. *Water Res* 203: 117535. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117535>
- Han, Y.N., Li, N., Oda, Y., Ma, M., Rao, K.F., Wang, Z.J., Jin, W., Hong, G., Li, Z.G., Luo, Y. (2016). Evaluation of genotoxic effects of surface waters using a battery of bioassays indicating different mode of action. *Ecotox Environ Saf* 133:448-456. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.022>
- Hanson, N., Halling, M., Norin, H. (2013). Biomarkers for environmental monitoring - suggestions for Norwegian monitoring programs. <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m88/m88.pdf>
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y. (1998): Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res* 399(2): 125-133. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00251-0)
- 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):e98307. <https://doi.org/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*). *Environ Sci Eur* 27(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0056-3>
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic Biol Med* 19(3): 271-280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X)
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L. (2011). Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: a field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol eng* 37(9):1283-1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L. (2011): Effects of pretreated domestic wastewater supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: a field study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecol Engineer* 37(9): 1283-1291. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.03.027>
- Hillenbrand, T., Tettenborn, F., Menger-Krug, E., Marscheider-Weidemann, F., Fuchs, S., Toshovski, S., Kittlaus, S., Metzger, S., Tjoeng, I., Wermter, P., Kersting, M., Abegglen, C. (2014). Maßnahmen zur Verminderung des Eintrages von Mikroschadstoffen in die Gewässer. UBA-TEXTE 85/2014. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.
- Howe, C.A., Butterworth, J., Smout, I.K., Duffy, A.M., Vairavamoorthy, K. (2011). Sustainable water management in the city of the future - findings from the SWITCH project 2006 - 2011. <http://www.switchurbanwater.eu/outputs/pdfs/SWITCH-Final Report.pdf>
- Huang, R., Sakamuru, S., Martin, M.T., Reif, D.M., Judson, R.S., Houck, K.A., Casey, W., Hsieh, J.-H., Shockley, K.R., Ceger, P., Fostel, J., Witt, K.L., Tong, W., Rotroff, D.M., Zhao, T., Shinn, P., Simeonov, A., Dix, D.J., Austin, C.P., Kavlock, R.J., Tice, R.R., Xia, M. (2014). Profiling of the Tox21 10K compound library for agonists and antagonists of the estrogen receptor alpha signaling pathway. *Sci Rep* 4(1): 5664. <https://doi.org/10.1038/srep05664>
- IKSR (2019). Empfehlungen zur Reduktion von Mikroverunreinigungen in Gewässern. Bericht 253. https://www.iksr.org/fileadmin/user_upload/DKDM/Dokumente/Fachberichte/DE/rp_De_0253.pdf
- ISO 10706:2000 (2000). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Langzeit-Toxizität von Stoffen gegenüber *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 10706:2000-04, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 10993-5:2009 (2009). Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009), Internationale Organisation für Normung.
- ISO 11350:2012 (2012). Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser – Verfahren mittels Salmonella/Microsomen-Fluktuationstest (Ames-Fluktuationstest). ISO 11350:2012-05, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 13829:2000 (2000). Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des erbgutverändernden Potentials in Wasser und Abwasser mittels umu-Test. ISO 13829:2000-03, Internationale Organisation für Normung.

- ISO 16240:2005 (2005). Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser – Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames-Test). ISO 16240:2005-04, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 19040-1:2018 (2018). Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser – Teil 1: Hefebasierter Östrogentest (*Saccharomyces cerevisiae*). ISO 19040-1:2018-08, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 19040-3:2018 (2018). Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des östrogenen Potentials von Wasser und Abwasser – Teil 3: *In vitro* Reporteragentest mit humanen Zellen. ISO 19040-3:2018-08, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 20665:2008 (2008). Water quality – Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. ISO 20665:2008, Internationale Organisation für Normung.
- ISO/TS 23893-2:2007 (2007). Wasserbeschaffenheit – Biologische und physiologische Messungen an Fischen – Teil 2: Bestimmung des EROD. ISO/TS 23893-2:2007-11, Internationale Organisation für Normung.
- ISO 23893-3:2013 (2013). Wasserbeschaffenheit – Biologische und physiologische Messungen an Fischen – Teil 3: Bestimmung von Vitellogenin. ISO 23893-3:2013-04, Internationale Organisation für Normung.
- Ittner, L.D., Junghans, M., Werner, I. (2018): Aquatic Fungi: A disregarded trophic level in ecological risk assessment of organic fungicides. *Front Environ Sci* 6(105). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00105>.
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K. (2014): What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ Int* 64: 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.009>
- Jekel, M., Ruhl, A.S. (2016). Anthropogene Spurenstoffe und Krankheitserreger im urbanen Wasserkreislauf – Bewertung, Barrieren und Risikokommunikation (ASKURIS). <http://doi.org/10.14279/depositonce-4979>
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K. (2010): Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res* 17(3): 571-581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Sepčić, K. (2010): Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res* 17(3): 571-581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>
- Jeong, T.-Y., Yuk, M.-S., Jeon, J., Kim, S.D. (2016). Multigenerational effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the individual fitness and population growth of *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 569-570: 1553-1560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.249>.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32(17):2498-2506. <https://doi.org/10.1021/es9710870>

- Jobling, S., Tyler, C.R. (2003): Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl Chem* 75(11-12): 2219-2234. <https://doi.org/10.1351/pac200375112219>
- Kanayama, T., Mamiya, S., Nishihara, T., Nishikawa, J. (2003). Basis of a high-throughput method for nuclear receptor ligands. *J Biochem* 133(6):791-797. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg101>
- Karrow, N.A., Boermans, H.J., Dixon, D.G., Hontella, A., Solomon, K.R., Whyte, J.J., Bols, N.C. (1999). Characterizing the immunotoxicity of creosote to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – a microcosm study. *Aquat Toxicol* 45(4):223-239. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00108-8)
- Kase, R., Kunz, P., Gerhardt, A. (2009). Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen. *Environ Sci Eur* 21(4):339-378. <https://doi.org/10.1007/s12302-009-0072-2>
- Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R. (2010). Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J Appl Ecol* 47:498–504.
- Kienle, C., Kase, R., Werner, I. (2011). Evaluation of bioassays and wastewater quality: *in vitro* and *in vivo* bioassays for the performance review in the Project “Strategy MicroPoll”. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kienle, C., Gauch, R., Vermeirssen, E., Werner, I. (2015). Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests - Ergebnisse einer Literaturrecherche und einer Expertenbefragung. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf. <https://www.dora.lib4ri.ch/eawag/islandora/object/eawag:14811>
- Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S. (2012). Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicol in Vitro* 26(3):500-510. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.001>
- Kim, M.-K., Zoh, K.-D. (2016). Occurrence and removals of micropollutants in water environment. *Environ Eng Res* 21(4): 319–332. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.115>
- Klobučar, G.I.V., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzović Hackenberger, B., Hylland, K. (2009). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 19(1):77. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0390-6>
- Köhler, H.-R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Gränzer, S., Knigge, T., Kunz, N. (2001). The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J Aquat Ecosys Stress Recov* 8(3):261-279. <https://doi.org/10.1023/A:1012935931161>
- Kolarević, S., Aborgiba, M., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Simonović, P., Simić, V., Milošković, A., Reischer, G., Farnleitner, A., Gačić, Z., Milačić, R., Zuliani, T., Vidmar, J., Pergal, M., Piria, M., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2016). Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PLoS One* 11(9):e0162450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162450>

- Köllner, B., Wasserrab, B., Kotterba, G., Fischer, U. (2002). Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - how can environmental influences be detected? *Toxicol Lett* 131(1): 83-95. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00044-9)
- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W. (2017). Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of *in vitro* bioassays and chemical analysis. *Environ Poll* 220:1220-1230. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011>
- 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. *J Aquat Ecosyst Stress Recov* 8(3-4):215-229. <https://doi.org/10.1023/A:1012976800922>
- Kontana, A., Papadimitriou, C.A., Samaras, P., Zdragas, A., Yiangou, M. (2009). Effectiveness of ozonation and chlorination on municipal wastewater treatment evaluated by a battery of bioassays and biomarkers. *Water Sci Technol* 60(6):1497-1505. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.478>
- Koponen, K., Ritola, O., Huuskonen, S., Linder, D., Monostory, K., Lindström-Seppä, P. (1997). Intrastrain and interstrain variability in biotransformation enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci* 54(12): 2901-2906. <https://doi.org/10.1139/f97-191>
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., de Faria Valle, S., de Oliveira Silva, T., Anziliero, D., dos Santos, E.D., Pivato, M., Zanatta, R. (2011). Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol* 30(1): 51-7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.012>
- Kulzer, E. (1986): Toxizität der Pyrethroide bei Süßwasserorganismen. *Agrar- und Umweltforschung in Baden-Württemberg*, Band 15. Ulmer GmbH, Stuttgart.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H.-R., Licht, O., Ludwichowski, K.-U., Schirling, M., Triebkorn, R., Nagel, R. (2006). Effects of bisphenol A on *Gammarus fossarum* and *Lumbriculus variegatus* in artificial indoor streams. *Toxicol Environ Chem* 88(4): 649-664. <https://doi.org/10.1080/02772240600834539>
- Langer, M., Junghans, M., Spycher, S., Koster, M., Baumgartner, C., Vermeirssen, E., Werner, I. (2017). Hohe ökotoxikologische Risiken in Schweizer Bächen. *Aqua & Gas* 4, 58-68. https://www.eawag.ch/fileadmin/Domain1/News/2017/04/04/a-g_junghans.pdf
- Langston, W.J. (2020). Endocrine disruption and altered sexual development in aquatic organisms: an invertebrate perspective. *J Mar Biol Assoc* 100(4): 495-515. <https://doi.org/10.1017/S0025315420000533>.
- Launay, M. (2020). Spurenstoffelimination in Baden-Württemberg – Strategie des Landes, Sonderausgabe wwt Modernisierungsreport 2020/21 "Krisenmanagement und Zukunftsgestaltung". https://koms-bw.de/cms/content/media/MDR2020_21_Launay%20November%202020.pdf

- Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R., Porte, C. (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 196(2):247-257. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.12.012>
- LAWA (1996): Empfehlung zum Einsatz von kontinuierlichen Biotestverfahren für die Gewässerüberwachung. Kulturbuchverlag Berlin, 1-38.
- LAWA (2000). Einsatzmöglichkeiten des Biomonitorings zur Überwachung von Langzeit-Wirkungen in Gewässern. Bearbeitet vom LAWA-Arbeitskreis. „Biomonitoring“
- LAWA (2012). AQS - Merkblatt P-8/3 zu den Rahmenempfehlungen der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen P-8/3.
- LAWA (2016). Mikroschadstoffe in Gewässern. Beschlossen auf der 151. LAWA-VV am 17./18. März 2016 in Stuttgart vom ständigen Ausschuss „Oberirdische Gewässer und Küstengewässer“ (LAWA-AO).
- Legault, R., Blaise, C., Rokosh, D., Chong-Kit, R. (1994). Comparative assessment of the SOS Chromotest kit and the Mutatox test with the *Salmonella* plate incorporation (Ames test) and fluctuation tests for screening genotoxic agents. *Environ Toxicol Water Qual* 9(1): 45-57. <https://doi.org/10.1002/tox.2530090107>
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682(1):71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
- Leusch, F.D.L., Khan, S.J., Gagnon, M.M., Quayle, P., Trinh, T., Coleman, H., Rawson, C., Chapman, H.F., Blair, P., Nice, H., Reitsema, T. (2014): Assessment of wastewater and recycled water quality: A comparison of lines of evidence from *in vitro*, *in vivo*, and chemical analyses. *Water Res* 50: 420-431. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.056>
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M. (2017): Analysis of the sensitivity of *in vitro* bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid, and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ Int* 99: 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.014>
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Arnal, C., Aneck-Hahn, N.H., Balaguer, P., Bruchet, A., Escher, B.I., Esperanza, M., Grimaldi, M., Leroy, G., Scheurer, M., Schlichting, R., Schriks, M., Hebert, A. (2018). Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. *Water Res* 139:10-18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.056>
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.-A., Boshra, H., Gelman, A.E., LaPatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O. (2006). B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7(10):1116-1124. <https://doi.org/10.1038/ni1389>
- Li, M.H., Ruan, L.Y., Zhou, J.W., Fu, Y.H., Jiang, L., Zhao, H., Wang, J.S. (2017). Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat Toxicol* 188:159-169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.004>
- Liess, M., von der Ohe, P.C. (2005). Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ Toxicol Chem* 24(4):954-965. <https://doi.org/10.1897/03-652.1>

- Liess, M., Schäfer, R.B., Schriever, C.A. (2008). The footprint of pesticide stress in communities - species traits reveal community effects of toxicants. *Sci Total Environ* 406(3):484-490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.054>
- Liess, M., Liebmann, L., Vormeier, P., Weisner, O., Altenburger, R., Borchardt, D., Brack, W., Chatzinotas, A., Escher, B., Foit, K., Gunold, R., Henz, S., Hitzfeld, K.L., Schmitt-Jansen, M., Kamjunke, N., Kaske, O., Knillmann, S., Krauss, M., Küster, E., Link, M., Lück, M., Möder, M., Müller, A., Paschke, A., Schäfer, R.B., Schneeweiss, A., Schreiner, V.C., Schulze, T., Schüürmann, G., von Tümpling, W., Weitere, M., Wogram, J., and Reemtsma, T. (2021). Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. *Water Res* 201:117262. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117262>
- Lindström-Seppä, P., Urban, K., Honkalampi-Hämäläinen, U., Roy, S. (2001). Biochemical responses in aquatic plants as markers of environmental contamination. *Altern Lab Anim* 29(3):277-282. <https://doi.org/10.1177/026119290102900312>
- Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42(8):656-666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
- Logeshwaran, P., Sivaram, A.K., Surapaneni, A., Kannan, K., Naidu, R., Megharaj, M. (2021). Exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) but not perfluorooctanoic acid (PFOA) at ppb concentration induces chronic toxicity in *Daphnia carinata*. *Sci Total Environ*, 769: 144577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144577>.
- Loske, M. (2017). Möglichkeiten zur Bewertung der Zusammensetzung der Gewässerbiozönose unter dem Einfluss von Schadstoffen am Beispiel des SPEAR-Index. Masterarbeit am Fachbereich Architektur und Bauingenieurwesen, Studiengang Umweltmanagement und Stadtplanung in Ballungsräumen (UMSB), Hochschule Rhein / Main, Wiesbaden, Rüsselsheim
- Lyko, S., Nafo, I., Evenblij, H., Benetto, E., Cornelissen, A., Igos, E., Klepiszewski, K., Venditti, S., Kovalova, L., McArdeall, C. (2012). Pharmaceutical input and elimination from local sources: final report of the European co-operation project PILLS. Gelsenkirchen.
- Luckenbach, T., Kilian, M., Tribskorn, R., Oberemm, A. (2001). Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *J Aquat Ecosys Stress Recov* 8(3):355-370. <https://doi.org/10.1023/A:1012976809450>
- Luckenbach, T. (2002). Untersuchungen zu den Auswirkungen von Gewässerbelastungen auf die frühe Entwicklung einheimischer Süßwasserfische. Dissertation, Universität Tübingen.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76: 932-937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>
- Maier, D., Blaha, L., Giesy, J.P., Henneberg, A., Köhler, H.-R., Kuch, B., Osterauer, R., Peschke, K., Richter, D., Scheurer, M., Tribskorn, R. (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 Res* 72:127-144. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.050>

- Mak, P., Cruz, F.D., Chen, S. (1999). A yeast screen system for aromatase inhibitors and ligands for androgen receptor: yeast cells transformed with aromatase and androgen receptor. *Environ Health Perspect* 107(11):855-860. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107855>
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C. (2015). A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *WIREs Water* 2(5):457-487. <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chèvre, N., Schärer, M., Barry, D.A. (2013). Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Sci Total Environ* 461-462:480-498. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.034>
- Marić, J.J., Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Sunjog, K., Kostić-Vuković, J., Deutschmann, B., Hollert, H., Tenji, D., Paunović, M., Vuković-Gačić, B. (2020). Selection of assay, organism, and approach in biomonitoring significantly affects the evaluation of genotoxic potential in aquatic environments. *Environ Sci Pollut Res* 27(27):33903-33915. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09597-0>
- Marten, M., Schwörer, R. (2000). Stand der Entwicklung kontinuierlicher Biotestverfahren zur Überwachung von Stoßbelastungen in der Bundesrepublik Deutschland aus der Sicht des Anwenders im Labor- und Messstationsbetrieb. - Deutsche Gesellschaft für Limnologie e. V. (2001), Tagungsbericht, Kaltenmeier Söhne, Krefeld,.
- Moermond, C.T.A., Kase, R., Korkaric, M., Ågerstrand, M. (2016). CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. *Environ Toxicol Chem* 35(5):1297-1309. <https://doi.org/10.1002/etc.3259>
- Mohaupt, V., Völker, J., Altenburger, R., Birk, S., Kirst, I., Kühnel, D., Küster, E., Semerádová, S., Subelj, G., Whalley, C. (2020). Pesticides in European rivers, lakes and groundwaters - Data assessment. ETC/ICM Technical Report 1/2020: European Topic Centre on Inland, Coastal and Marine waters.
- Moog, O., Hartmann, A. (2017). *Fauna Aquatica Austriaca*, 3rd edition. A comprehensive species inventory of Austrian aquatic organisms with ecological notes. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien. ISBN: 978-3-85174-074-5
- Mor, J.R., Dolédec, S., Acuna, V., Sabater, S., Munoz, I. (2019). Invertebrate community responses to urban wastewater effluent pollution under different hydro-morphological conditions. *Env Poll* 252: 483-492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.114>
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455(1):29-60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met* 65(1):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Müller, Y. (2014). The value of small-scaled cell-based bioassays on micronucleus formation and p53 induction for assessing genotoxicity of emerging environmental pollutants and their mixtures. Masterarbeit, RWTH Aachen.
- Münze, R., Hannemann, C., Orlinskiy, P., Gunold, R., Paschke, A., Foit, K., Becker, J., Kaske, O., Paulsson, E., Peterson, M., Jernstedt, H., Kreuger, J., Schüürmann, G., Liess, M. (2017).

- Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *Sci Total Environ* 599: 387-399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.008>
- Murata, T., Yamauchi, K. (2008). 3,3',5-Triiodo-L-thyronine-like activity in effluents from domestic sewage treatment plants detected by *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol* 226(3):309-317. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.09.003>
- Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., van de Guchte, C., Brouwer, A. (1996). Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX). A Novel *in vitro* bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol* 33(1):149-160. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0152>
- Nakayama, K., Kitamura, S.-I., Murakami, Y., Song, J.-Y., Jung, S.-J., Oh, M.-J., Iwata, H., Tanabe, S. (2008). Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil. *Mar Pollut Bull* 57(6):445-452. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.021>
- Navas, J.M., Segner, H. (2006): Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquat Toxicol* 80(1): 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.013>
- Neale, P.A., Leusch, F.D.L., Escher, B.I. (2018). What is driving the NF- κ B response in environmental water extracts? *Chemosphere* 210:645-652. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.052>
- Nebert, D.W., Gelboin, H.V. (1968). Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J Biol Chem* 243(23):6242-6249. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94484-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94484-4)
- Oda, Y. (2016). Development and progress for three decades in umu test systems. *Genes Environ* 38:24-24. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0054-8>
- OECD (2010). No. 123: Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)14&doclanguage=en)
- OECD 202 (2004). Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD 210 (2013). Test No. 210: Fish early-life stage test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>
- OECD 211 (2012). Test No. 211: *Daphnia magna* reproduction test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
- OECD 218 (2004). Test No. 218: Sediment-water Chironomid toxicity using spiked sediment. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>
- OECD 219 (2004). Test No. 219: Sediment-water Chironomid toxicity using spiked water. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070288-en>
- OECD 221 (2006). Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>

- OECD 225 (2007). Test No. 225: Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264067356-en>
- OECD 234 (2011). Test No. 234: Fish sexual development test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264122369-en>
- OECD 235 (2011). Test No. 235: *Chironomus* sp. acute immobilisation test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>
- OECD 236 (2013). Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD 238 (2014). Test No. 238: Sediment-free *Myriophyllum spicatum* toxicity test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264224131-en>
- OECD 239 (2014). Test No. 239: Water-sediment *Myriophyllum spicatum* toxicity test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264224155-en>
- OECD 242 (2016). Test No. 242: *Potamopyrgus antipodarum* reproduction test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264311-en>
- OECD 455 (2016). Test No. 455: Performance-based test guideline for stably transfected transactivation *in vitro* assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- OECD 456 (2011). Test No. 456: H295R steroidogenesis assay. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264122642-en>
- OECD 458 (2020). Test No. 458: Stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assay for detection of androgenic agonist and antagonist activity of chemicals. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264366-en>
- OECD 471 (2020). Test No. 471: Bacterial reverse mutation test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- OECD 473 (2016). Test No. 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264649-en>
- OECD 474 (2014): Mammalian erythrocyte micronucleus test. Paris: OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071520-en>
- OECD 476 (1997). Test No. 476: *In vitro* mammalian cell gene mutation test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071322-en>
- OECD 479 (1986). Test No. 479: *In vitro* sister chromatid exchange assay in mammalian cells. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071384-en>
- OECD 480 (1986). Test No. 480: Genetic toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene mutation assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071407-en>
- OECD 486 (1997). Test No. 486: Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells *in vivo*. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071520-en>

- OECD 487 (2016). Test No. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J. (2004). Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int Rev Cytol* 236: 1-44. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)36001-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)36001-8)
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J. (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Arch Environ Contam Toxicol* 49(3): 353-361. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0211-0>
- OGewV (2016). "Oberflächengewässerverordnung vom 20. Juni 2016 (BGBl. I S. 1373), zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 4 des Gesetzes am 9. Dezember 2020 (BGBl. I S. 2873)
- Omeje, V., Lambrechts, H., Brink, D. (2019). Hormonal profile and reproductive parameters of pre-vitellogenic Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) on pawpaw (*Carica papaya*) seed meal. *J Agric Sci* 11:524. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n2p524>
- OSPAR Commission (2002). Survey on genotoxicity test methods for the evaluation of wastewater within whole effluent assessment. <https://www.ospar.org/documents?v=6932>
- OSPAR Commission. (2007). JAMP Guidelines for contaminant-specific biological effects. Ab-rufbar unter: <https://www.ospar.org/work-areas/cross-cutting-issues/cemp>
- Oxborough, K. (2004). Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J Exp Bot* 55(400):1195-1205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh145>
- Pawert, M.(1998). Zelluläre und proteinchemische Reaktionen von Fischkiemen (Bachschmer-len und Bachforellen) sowie Anwendung limnochemischer Methoden zur Bewertung der Be-lastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien. Dissertation, Universität Tübingen.
- Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C. (2006). A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat Toxicol* 77(1):1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.010>
- Perrodin, Y., Christine, B., Sylvie, B., Alain, D., Jean-Luc, B.-K., Cécile, C.-O., Audrey, R., Elodie, B. (2013). A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital. *Chemosphere* 90(3):1037-1046. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.049>
- Peschke, K., Geburzi, J., Köhler, H.-R., Wurm, K., Triebkorn, 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. *Ecotox Environ Saf* 106:115-125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.011>
- Peschke, K., Capowiez, Y., Köhler, H.-R., Wurm, K., Triebkorn, R. (2019). Impact of a wastewater treatment plant upgrade on amphipods and other macroinvertebrates: individual and community responses. *Front Environ Sci* 7(64). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00064>
- Petala, M., Kokokiris, L., Samaras, P., Papadopoulos, A., Zouboulis, A. (2009). Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. *Water Res* 43(20):5063-5074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.043>

- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F. (1989). Differences in the sensitivity of brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to physiological doses of cortisol. *J Fish Biol* 34(5): 757-768. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03355.x>
- Pieterse, B., Felzel, E., Winter, R., van der Burg, B., Brouwer, A. (2013). PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environ Sci Technol* 47(20): 11651-11659. <https://www.doi.org/10.1021/es403810w>
- Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I., Harris, W.A. (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina *in vivo*. *J Cell Biol* 171(6):991-999. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509098>
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975(3):384-394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8(4): 275-285. <https://doi.org/10.1080/02757549408038554>.
- Quillardet, P., Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res* 147(3):65-78. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90020-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90020-2)
- Radio, N.M., Mundy, W.R. (2008). Developmental neurotoxicity testing *in vitro*: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology* 29(3):361-376. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.02.011>
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L. (2017). 20 Years of fish immunotoxicology – what we know and where we are. *Crit Rev Toxicol* 47(6):516-542. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>
- Reifferscheid, G., Grummt, T. (2000). Genotoxicity in german surface waters - results of a collaborative study. *Water Air Soil Pollut* 123:67-79. <https://doi.org/10.1023/A:1005201207088>
- Rogall, E.T., Jacob, S., Tribskorn, R., Schwartz, T. (2020). The impact of the anti-diabetic drug metformin on the intestinal microbiome of larval brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Environ Sci Eur* 32(1):65. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00341-6>
- Rossi, F., Artigas, J., Mallet, C. (2017). Structural and functional responses of leaf-associated fungal communities to chemical pollution in streams. *Freshwater Biol* 62(7):1207-1219. <https://doi.org/10.1111/fwb.12937>.
- Rotroff, D.M., Martin, M.T., Dix, D.J., Filer, D.L., Houck, K.A., Knudsen, T.B., Sipes, N.S., Reif, D.M., Xia, M., Huang, R., Judson, R.S. (2014). Predictive endocrine testing in the 21st century using *in vitro* assays of estrogen receptor signaling responses. *Environ Sci Technol* 48(15):8706-8716. <https://doi.org/10.1021/es502676e>

- Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15(3):241-248. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>
- Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L. (2004). Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environ Toxicol Chem* 23(4):857-864. <https://doi.org/10.1897/03-286>
- Saha, S., Kaviraj, A. (2008). Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some fresh-water organisms. *Bullet Environ Contam Toxicol* 80(1): 49-52. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9314-4>
- Saladin, G., Clément, C. (2005). Physiological side effects of pesticides on non-target plants. *Agriculture and soil pollution: New research*: 53-86
- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J. (2004). Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry. *Ecotox Environ Saf* 59(1):64-69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.002>
- Sanchez, W., Porcher, J.-M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends Anal Chem* 28(2): 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.012>
- Schäfer, R.B., von der Ohe, P., Rasmussen, J., Kefford, B., Beketov, M., Schulz, R., Liess, M. (2012). Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environ Sci Technol* 46:5134-5142. <https://doi.org/10.1021/es2039882>
- Schaffer, J.D., Sebetich, M.J. (2004). Effects of aquatic herbicides on primary productivity of phytoplankton in the laboratory. *Bullet Environ Contam Toxicol* 72(5):1032-1037. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0347-7>
- Schill, R.O. (2002). Stressreaktionen von Invertebraten unter dem Einfluss von habitatspezifischen Umweltfaktoren: Interaktionen natürlicher und anthropogener Stressoren. Dissertation, Universität Tübingen.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Tribskorn, R., Köhler, H.-R. (2005). Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Importance of wastewater effluents, temporal variability and spatial aspects on natural populations. *Arch Environ Contam Toxicol* 49(1):53-61. <http://doi.org/10.1007/s00244-004-0153-6>
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.-U., Nagel, R., Köhler, H.-R., Tribskorn, R. (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 15(2):143-156. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0044-2>
- Schmidt, S., Busch, W., Altenburger, R. (2017). Biotestverfahren zur Abschätzung von Wirkpotenzialen in der aquatischen Umwelt - Vorschlag einer modularen Biotestbatterie für das aquatische Umweltmonitoring als Ergebnis einer systematischen Literaturrecherche und Bewertung. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, im Auftrag der Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg.

- Schmidt-Posthaus, H., Bernet, D., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P. (2001). Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to polluted river water. *Dis Aquat Org* 44(3): 161-170. <https://doi.org/10.3354/dao044161>
- Schmitz, M., Deutschmann, B., Markert, N., Backhaus, T., Brack, W., Brauns, M., Brinkmann, M., Seiler, T.B., Fink, P., Tang, S., Beitel, S., Doering, J., Hecker, M., Shao, Y., Schulze, T., Weitere, M., Wild, R., Velki, M., Hollert, H. (2021). Demonstration of an aggregated biomarker response approach to assess the impact of point and diffuse contaminant sources in feral fish in a small river case study. *Sci Total Env* 804:150020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150020>
- Schramm, M. (1998). Zur Ökotoxikologie von kleinen Fließgewässern - Leberultrastruktur und hämatologische Parameter als Biomarker bei Fischen. Dissertation, Universität Tübingen.
- Schriever, C.A., Callaghan, A., Biggs, J.P., Liess, M. (2008). Freshwater biological indicators of pesticide contamination. Science Report - SC030189/SR3. Environment Agency, UK. http://ea-lit.freshwaterlife.org/archive/ealit:4824/OBJ/44796_ca_object_representations_media_545_original.pdf
- Schriks, M., Braken, K., Simon, E., Besselink, H., van der Linden, S.C., Kienle, C., van der Burg, B. (2015). DEMEAU - Selection criteria to select *in vitro* bioassays for implementation and use. <https://demeau-fp7.eu/content/d411-selection-criteria-select-vitro-bioassays-implementation-and-use.html>
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour, and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Sci Total Environ* 607-608:1026-1036. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.042>.
- Schwarz, S., Gildemeister, D., Hein, A., Schröder, P., Bachmann, J. (2021). Environmental fate and effects assessment of human pharmaceuticals: lessons learnt from regulatory data. *Environ Sci Eur* (2021) 33:68. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00503-0>
- Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., and Oehlmann, J. (2012). Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Enviro Sci Pollut Res* 19(5): 1781-1790. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0705-z>
- Segner, H., Wenger, M., Möller, A.M., Köllner, B., Casanova-Nakayama, A. (2012). Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish - how to assess them? *Environ Sci Pollut Res* 19(7):2465-2476. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0978-x>
- Seifert, M., Haindl, S., Hock, B. (1999). Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Anal Chim Acta* 386(3):191-199. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00044-6)
- Shao, Y., Hollert, H., Tarcai, Z., Deutschmann, B., Seiler, T.B. (2019). Integrating bioassays, chemical analysis and in silico techniques to identify genotoxicants in surface water. *Sci Total Environ* 650:3084-3092. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.288>

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. (1993). An easy spectrophotometric assay for determining total protein and immunoglobulin levels in fish sera: correlation to fish health. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (Hrsg.), *Techniques in fish immunology*. SOS Publications, Fair Haven.
- Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A.C., Brouwer, A., van der Burg, B. (2004): Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci* 83(1): 136-148. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi005>
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7):113-122. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7113>
- de Souza, R.M., Seibert, D., Quesada, H.B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M.R., Bergamasco, R. (2020). Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Proc Saf Environ Protec* 135: 22-37. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035>.
- Šrut, M., Traven, L., Štambuk, A., Kralj, S., Žaja, R., Mićović, V., Klobučar, G.I.V. (2011). Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicol In Vitro* 25(1):308-314. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.015>
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J. (2011). Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Res* 45(3):1015-1024. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.008>
- Stapf, M., Schumann, P., Völker, J., Miehe, U. (2017): Studie über Effekte und Nebeneffekte bei der Behandlung von kommunalem Abwasser mit Ozon. Senatsverwaltung für Umwelt, Verkehr und Klima, Berlin. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10585.42083>
- Stengel, D., Zindler, F., Braunbeck, T. (2017). An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 193:18-29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.11.001>
- Sumi, N., Chitra, K.C. (2020). Possible role of C60 fullerene in the induction of reproductive toxicity in the freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Environ Sci Pollut Res* 27(16):19603-19615. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08509-6>
- Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7):173-178. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7173>
- Swenberg, J.A. (1981). Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens. Paper presented at the short-term tests for chemical carcinogens, New York.
- Tabrez, S., Shakil, S., Urooj, M., Damanhour, G.A., Abuzenadah, A.M., Ahmad, M. (2011). Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: an overview of the techniques

and their efficacies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 29(3):250-275. <https://doi.org/10.1080/10590501.2011.601849>

Tenji, D., Micic, B., Sipos, S., Miljanovic, B., Teodorovic, I., Kaisarevic, S. (2020). Fish biomarkers from a different perspective: evidence of adaptive strategy of *Abramis brama* (L.) to chemical stress. *Environ Sci Eur* 32:47. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00316-7>

Thellmann, P., Kuch, B., Wurm, K., Köhler, H., Tribskorn, R. (2017a). Water quality assessment in the "German River of the years 2014/2015": how a case study on the Impact of a storm water sedimentation basin displayed impairment of dish health in the Argen River (Southern Germany). *Environ Sci Eur* 29:10. <https://doi.org/10.1186/s12302-017-0108-y>

Thellmann, P., Greiner-Perth, K., Jacob, S., Knoll, M., Schäfer, M., Stängle, M., Ziegler, M., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Tribskorn, R. (2017b). Does wastewater treatment plant upgrading with powdered activated carbon result in reduced water and sediment toxicity of the receiving stream? *Int Water Wastewater Treat* 3(2). <https://doi.org/10.16966/2381-5299.141>

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

Tolan, V., Otludil, B. (2007). Genotoxic assessments of Tigris river surface water with *Salmonella* mutagenicity and SOS-chromotests. *Fresenius Environ Bull* 16(11A):1319-1324.

Tollefsen, K., Mathisen, R., Stenersen, J. (2003). Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: a sensitive *in vitro* bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals. *Biomarkers* 8(5):394-407. <https://doi.org/10.1080/13547500310001607827>

Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., Ceyhun, S.B. (2015). Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotox Environ Saf* 111:206-214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>

Tribskorn, R., Böhmer, J., Braunbeck, T., Honnen, W., Köhler, H.-R., Lehmann, R., Oberemm, A., Schwaiger, J., Segner, H., Schüürmann, G., Traunspurger, W. (2001). The project VALIMAR (VALIdation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *J Aquat Ecosys Stress Recov* 8(3-4): 161-178. <https://doi.org/10.1023/A:1012902209178>

Tribskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Köhler H.-R. (2002): Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11(6):451-465. <http://doi.org/10.1023/A:1021009418421>

Tribskorn, 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., Silig-

- ato, S., Traunspurger, W. (2003). Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: the VALIMAR project. *Human Ecol Risk Ass* 9(1): 171-194. <https://doi.org/10.1080/713609858>
- Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., and Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 68(2):151-166. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.015>
- Triebskorn, R., Casper, H., Scheil, V., and Schwaiger, J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Anal Bioanal Chem* 387(4): 1405-1416. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1033-x>
- Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H.-R. (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environ Monit Assess* 141(1):177-188. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9886-9>
- Triebskorn 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. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-8>
- Triebskorn, R., Blaha, L., Engesser, B., Güde, H., Henneberg, A., Hetzenauer, H., Köhler, H.-R., Kraus, S., Kuch, B., Maier, D., Oehlmann, J., Peschke, K., Rault, M., Rey, P., Richter, D., Sacher, F., Suchail, S., Thellmann, P., Weyhmüller, M., Wurm, K., Vogel, H.-J. (2013). SchussenAktiv - Eine Modellstudie zur Effizienz der Reduktion der Gehalte an anthropogenen Spurenstoffen durch Aktivkohle in Kläranlagen: Expositions- und Effektmonitoring vor Inbetriebnahme der Adsorptionsstufe auf der Kläranlage Langwiese des AZV Mariatal, Ravensburg. *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 8: 427-436.
- Triebskorn, R., Schwarz, S., Köhler, H.-R., Berg, K., Jungmann, D., Frey, M., Oehlmann, J., Oetken, M. (2014a). From theory to reality – Evaluation of suitable organisms and test systems for the biomonitoring of pharmaceuticals. Part I: Literature review. *UBA-TEXTE* 64/2014. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.
- Triebskorn, R., Thellmann, P., Vogel, H.-J., Wurm, K. (2014b). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: Aktivkohlefilterung im Vollstrom seit 1992. Ein langfristiger Erfolg für die Fischgesundheit und die Gewässerökologie? *Korrespondenz Wasserwirtschaft* 7(10):587-593.
- Triebskorn, R., Thellmann, P., Escher, B., Gartiser, S., Knauer, M., Kuch, B., Wagner, M., (2015). Nachweis biologischer Wirkungen in Proben aus der Kläranlage Mannheim. Ein Vergleich zwischen konventionell und adsorptiv behandeltem Abwasser. Abschlussbericht Universität Tübingen. In: Neef, J., Metzger, S., Erfolgskontrolle der adsorptiven Abwasserreinigung mittels biologischer Wirktests – Untersuchungsbericht – im Auftrag des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg. UM-Vorhaben-Nr. 378/2015.
- Triebskorn, R. (Hrsg.) (2017). Weitergehende Abwasserreinigung: Ein wirksames und bezahlbares Instrument zur Verminderung von Spurenstoffen und Keimen im Wasserkreislauf - gemeinsamer Schlussbericht der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie vom

Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg geförderten Projekte SchussenAktiv, SchussenAktiv*plus* und SchussenAktiv*plus+*. Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen. <http://doi.org/10.15496/publikation-15721>

Triebskorn, R., Schwarz, S., Schmiege, H., Köhler, H.-R., Jungmann, D., Berg, K., Buchberger, A., Frey, M., Scheurer, M., Sacher, F., Oetken, M., Oehlmann, J. (2017). Eff-Pharm: Effects of pharmaceuticals (nonsteroidal anti-inflammatory drugs and beta-blockers) in fish and invertebrates and their detection by newly developed *in vitro*-bioassays - Final report. UBA TEXTE 44/2017. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

Triebskorn, R., Bláha, L., Gallert, C., Giebner, S., Hetzenauer, H., Köhler, H.-R., Kuch, B., Lüddecke, F., Oehlmann, J., Peschke, K., Sacher, F., Scheurer, S., Schwarz, S., Thellmann, P., Wurm, K., Wilhelm, S. (2019). Freshwater ecosystems profit from activated carbon-based wastewater treatment across various levels of biological organisation in a short timeframe. *Environ Sci Eur* 31: 85. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0267-0>

Triebskorn, R. (2020). Wissenschaftliche Begleituntersuchungen zum Ausbau der Kläranlage Tübingen mit einer 4. Reinigungsstufe auf Basis einer Ozonierung in Kombination mit einem Sandfilter. Ergebnisse aus Phase 1: Zustand vor dem Ausbau der Kläranlage. Abschlussbericht RP Tübingen.

UBA/LAWA (2021). www.gewaesser-bewertung.de; abgerufen im November 2021

Ulitzur, S., Lahav, T., Ulitzur, N. (2002). A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. *Environ Toxicol* 17(3):291-296. <https://doi.org/10.1002/tox.10060>

Ulitzur, S., Weiser, I., Yannai, S. (1980). A new, sensitive, and simple bioluminescence test for mutagenic compounds. *Mutat Res* 74(2):113-124. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(80\)90237-X](https://doi.org/10.1016/0165-1161(80)90237-X)

UM-BW (2012). Anthropogene Spurenstoffe im Gewässer - Spurenstoffbericht Baden-Württemberg 2012. Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg. https://um.baden-wuerttemberg.de/fileadmin/redaktion/m-um/intern/Dateien/Dokumente/2_Presse_und_Service/Publikationen/Umwelt/Anthropogene_Spurenstoffe_im_Gewasser_-_Spurenstoffbericht_Baden-Wuerttemberg_2012.pdf

Umweltbundesamt (2015). Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern - Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge. Positionspapier März 2015, Dessau-Roßlau. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/organische_mikroverunreinigungen_in_gewassern_vierte_reinigungsstufe_0.pdf

Umweltbundesamt (2017): Gewässer in Deutschland: Zustand und Bewertung. Dessau-Roßlau. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1968/publikationen/170829_uba_fachbroschure_wasse_rwirtschaft_mit_anderung_bf.pdf

Umweltbundesamt (2018). Empfehlungen zur Reduzierung von Mikroverunreinigungen in den Gewässern. Hintergrundpapier April 2018, Dessau-Roßlau. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/uba_pos_mikroverunreinigung_final_bf.pdf

Umweltbundesamt (2021a). The Zero Pollution Action Plan as a chance for a cross-regulatory approach to pollution prevention and reduction. Scientific Opinion Paper, September 2021,

- Dessau-Rosslau. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/20210909_sciopap_zpa-aktionsplan_final.pdf
- Umweltbundesamt (2021b). <https://www.umweltbundesamt.de/daten/wasser>; abgerufen im November 2021
- Valenzuela-Nieto, G. E., Leal, C., Schwaiger, J., Ferling, H., Vargas-Chacoff, L., Kausel, G. (2021). Aquatic pollution from anthropogenic discharges modulates gene expression in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Austral J Vet Sci* 53(2):99-108. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322021000200099>
- van der Oost, R., Lopes, S.C.C., Komen, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. (1998). Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): Use of a bioactivation:detoxication ratio as a Biotransformation Index (BTI). *Mar Environ Res* 46(1): 315-319. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00096-2)
- van der Oost, R., Sileno, G., Suárez-Muñoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H., Brouwer, A. (2017). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values. *Environ Toxicol Chem* 36(9): 2385-2399. <https://doi.org/10.1002/etc.3836>
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Leitão, A.C., Henriques, J.A.P. (1990). Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. *Mutat Res* 240(1):13-18. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(90\)90003-K](https://doi.org/10.1016/0165-1218(90)90003-K)
- Vasanth, S., Arul, G., Karthikeyeni, S., Kumar, T.S.V., Vignesh, V., Manimegalai, M., Bupesh, G., Thirumurugan, R., Subramanian, P. (2015). Influence of triazine herbicide exposure on guppies (*Poecilia sphenops*) aromatase activities, altered sex steroid concentration and vitellogenin induction. *Indian J Pharm Sci* 77(2): 156-162. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.156549>
- VDI (2018). Richtlinie 4230 - Blatt 5, Biologische Verfahren zur Erfassung von Umweltbelastungen (Bioindikation): Fische als Wirkungsindikatoren, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
- VDI (2022). Richtlinie 4230 - Blatt 6, Biologische Verfahren zur Erfassung von Umweltbelastungen (Biomonitoring): Wirbellose als Wirkungsindikatoren im Monitoring limnischer Ökosysteme, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss. Im November 2021 kurz vor dem Gründruck
- Verbruggen, B., Gunnarsson, L., Kristiansson, E., Österlund, T., Owen, S.F., Snape, J.R., Tyler, C.R. (2018). ECOdrug: a database connecting drugs and conservation of their targets across species. *Nucleic Acids Research* 46(D1): D930–D936. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1024>
- Völker, J., Stapf, M., Miehe, U., Wagner, M. (2019). Systematic review of toxicity removal by advanced wastewater treatment technologies via ozonation and activated carbon. *Environ Sci Technol* 53: 7215-7233 <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00570>
- Vogel, H.-J., Baur, S., Tribskorn, R., Rößler, A., Metzger, S. (2014). Die Kläranlage Albstadt-Ebingen: 20 Jahre Pulveraktivkohleinsatz im Vollstrom. *Abwassertechnische Besonderheiten*

und Effizienz für die Elimination von Spurenstoffen. Korrespondenz Abwasser, Abfall 61. <https://doi.org/10.3242/kae2014.10.005>

Vonk, J.A., Kraak, M.H.S. (2020). Herbicide exposure and toxicity to aquatic primary producers. In: de Voogt, P. (Hrsg.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 250* (pp. 119-171). Springer International Publishing, Cham.

Vuković-Gačić, B., Kolarević, S., Sunjog, K., Tomović, J., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Gačić, Z. (2014). Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels *Unio tumidus* and *Unio pictorum* to environmental stress. *Hydrobiologia* 735(1):221-231. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1513-x>

Wagner, M., Schlüsener, M.P., Ternes, T.A., Oehlmann, J. (2013). Identification of putative steroid receptor antagonists in bottled water: combining bioassays and high-resolution mass spectrometry. *PLoS One* 8(8):e72472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072472>

Wang, H., Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27(5):612-616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)

Wdzięczak, J., Zaleśna, G., Wujec, E., Pérès, G. (1982). Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 73(2):361-365. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90298-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90298-X)

Webster, T.M., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 48(2): 1271-1279. <https://doi.org/10.1021/es404258h>

Webster, T.M., Santos, E.M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics* 16:32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>.

Weiss, S.C., Egetenmeyer, N., Schulz, W. (2017). Coupling of *in vitro* bioassays with planar chromatography in effect-directed analysis. In: Reifferscheid, G., Buchinger, S. (Hrsg.), *In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment* (pp. 187-224). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 157., Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/10_2016_16

Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.G.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R. (2015). The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ Sci Eur* 27(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4>

- Westerink, W.M.A., Schirris, T.J.J., Horbach, G.J., Schoonen, W.G.E.J. (2011). Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. *Mutat Res* 724(1):7-21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.007>
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30(4):347-570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>
- Wick, A., Bänsch-Baltruschat, B., Keller, M., Scharmüller, A., Schäfer, R., Foit, K., Liess, M., Maaßen, S., Lischeid, G. (2019). Umsetzung des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pestiziden Teil 2: Konzeption eines repräsentativen Monitorings zur Belastung von Kleingewässern in der Agrarlandschaft. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau. UBA-TEXTE 08/2019
- Wilhelm, S., Henneberg, A., Köhler, H.-R., Rault, M., Richter, D., Scheurer, M., Suchail, S., Triebkorn, R. (2017). Does wastewater treatment plant upgrading with activated carbon result in an improvement of fish health? *Aquat Toxicol* 192: 184-197; <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.017>
- Wilhelm, S., Jacob, S., Ziegler, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. (2018). Influence of different wastewater treatment technologies on genotoxicity and dioxin-like toxicity in effluent-exposed fish. *Environmental Sciences Europe* 30(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0154-0>
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray, L.E., Jr. (2002). A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci* 66(1):69-81. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.69>
- Wittekindt, E., Saftic, S., Matthes, C., Fischer, B., Hansen, P.D., Schubert, J. (2000). *In situ* investigations for the detection of genotoxic potential in selected surface water with the DNA alkaline unwinding assay using fish cells, early life stage of fish, crustaceae and mussels. In: Grummt, T. (Hrsg.), Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Genotoxizitätstests für Oberflächenwasser. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Projektträger Wassertechnologie und Entsorgung, Außenstelle Dresden.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. In: Armstrong, D. (Hrsg.), *Free Radical and Antioxidant Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Zebal, Y.D., Costa, P.G., de Castro Knopp, B., Lansini, L.R., Zafalon-Silva, B., Bianchini, A., Robaldo, R.B. (2017). Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. *Chemosphere* 185:860-867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.069>
- Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M. (2009). Combination of *in vitro* bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75(11):1453-1460. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.041>
- Ziegler, M., Knoll, S., Köhler, H., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C., Triebkorn, R. (2020a). Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout. *PeerJ* 8:e8765. <https://doi.org/10.7717/peerj.8765>

Ziegler, M., Eckstein, H., Ottmann, S., Reinelt, L., Stepinski, S., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. (2020b). Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine. *Environ Sci Eur* 32(1): 158. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z>

Ziegler, M., Banet, M., Bauer, R., Köhler, H.-R., Stepinski, S., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C., Triebkorn, R. (2021a). Behavioral and developmental changes in brown trout after exposure to the antidepressant venlafaxine. *Front Environ Sci* 8(289). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584>

Ziegler, M., Eckstein, H., Köhler, H.-R., Tisler, S., Zwiener, C., Triebkorn, R. (2021b). Effects of the antidepressants citalopram and venlafaxine on the big ramshorn snail (*Planorbis* *corneus*). *Water* 13(13):1722. <https://doi.org/10.3390/w13131722>

Anlagen

Anlage 1 - Übersicht über Biotests und Biomarkeranalysen, die in Gewässeruntersuchungen eingesetzt werden

Anlage 1 - Tabelle 1: Biotests zur Untersuchung von Gentoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
<i>in vitro</i>											
Ames Platteninkorporations-Test	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	standardisiert: ISO 16240:2005	Unterschied zu Negativkontrolle: UBA: positives Testresultat, wenn Induktionsfaktor ≥ 1,2	robust	simpel, 4 Tage	einfach durchführbar, kostengünstig, sensitiv, kommerzielle Testkits erhältlich	es sollte immer eine Sterilfiltration vorgenommen werden; bei Abwasserproben muss zusätzlich Antibiotika hinzugefügt werden	eventuell	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2004), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), LUBW, Mortelmans und Zeiger (2000), Tolan <i>et al.</i> (2007), UBA
Ames-Fluktuationstest	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100)	Genmutation (Bildung von Revertanten)	TW, OW, ABW	standardisiert: ISO 11350:2012	Vergleich mit Referenzsubstanz Benzo[a]pyren (für TA100: EC _{IR1,5} =1062 µg/L; für TA98: EC _{IR1,5} =196 µg/L) (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> , 2018) Schwellenwert für positive Befunde: 20,8% (Tribskorn, 2017); Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Projekt SchussenAktivplus (<i>S. typhimurium</i> YG7108, Giebner <i>et al.</i> , 2018; Tribskorn, 2017): ABW (SPE-Extrakte): Nachklärung und Flockungfiltration: 9,89% Mutagenität Ozon: 25,7% Mutagenität Ozon/GAK: 4,17%	wenig	einfach durchführbar, roboterfähig/ Hochdurchsatz- Screening möglich 2 Tage	einfach durchführbar, kostengünstig, sensitiv, statistisch gesicherte Bewertungskriterien, kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Giebner <i>et al.</i> (2018), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), LANUV, LUBW, Reifferscheid und Grummt (2000), Shao <i>et al.</i> (2019), Schmidt <i>et al.</i> (2017), Tabrez <i>et al.</i> (2011), Track (2016), Tribskorn (2017), Informationen von B. Escher
Mikrokerntest	verschiedene etablierte Zelllinien: HepG2 (Mensch); CHO, V79 (Hamster); RTG-2, RTL-W1, PLHC1 (Fisch)	klastogene und aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	TW, OW, ABW	standardisiert: (für humane und Nagetierzelllinien): DIN EN ISO 21427-2:2009, OECD 487	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn mindestens Verdoppelung der Mikrokernelrate im Vergleich zur spontanen Induktionsrate (Induktionsfaktor >2) bzw. bei Vorliegen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (UBA)	robust	simpel/Gerät anspruchsvoll (FACS), 4 Tage	automatisierte Auswertung möglich, gleichzeitige Erfassung der Zytotoxizität	es sollte immer eine Sterilfiltration vorgenommen werden; bei Abwasserproben muss zusätzlich Antibiotika hinzugefügt werden	ja	Boettcher <i>et al.</i> (2010), European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Grummt <i>et al.</i> (2018), Kienle <i>et al.</i> (2015), LANUV, Müller (2014), OSPAR Commission (2002), Schmidt <i>et al.</i> (2017) Track (2016), UBA
Comet Assay	verschiedene etablierte Zelllinien: HepG2 (Mensch); V79, CHO (Hamster); RTG-W1, RTG-2, RTL-W1, PLHC-1 (Fisch)	DNA-Strangbrüche (Schweifbildung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Singh <i>et al.</i> (1988)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle	mittel	mittel	kleine Probenmenge nötig, schnell und sensitiv		eventuell	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2004), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), Marić <i>et al.</i> (2020), OSPAR Commission (2002), Šrut <i>et al.</i> (2016), Track (2016), Žegura <i>et al.</i> (2009)
umuC Test	Bakterien: <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK 1002, NM1001, NM3009, NM2009, OY1002/1A1, OY1002/1A2, OY1002/1B1, OY1002/2C9, OY1002/2D6	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	TW, OW, ABW, Sediment- extrakte	standardisiert: ISO 13829:2000, DIN 38415-3:1996	Als Ergebnis gilt geringste Verdünnungsstufe innerhalb eines Testansatzes bei der eine Induktionsrate ≤ 1,5 eintritt, Gültigkeitskriterien (LfU, NLWKN): 1. Das Wachstum der Positivkontrollen (4-NQO bzw. 2-AA) und Negativkontrollen (DMSO-Wasser + Teststamm und Wasser + Teststamm) muss ≥ 140 FAU (Formazine Attenuation Units) sein; 2. Die Positivkontrolle (Kontrollansatz, Teststamm in DMSO-H ₂ O und Referenzsubstanz 4NQO bzw. 2-AA) muss eine Induktionsrate von ≥ 2 erreichen.	mittel bis robust	aufwendig, 2 Tage	sensitiv, um native Proben zu untersuchen, S9-Aktivierung möglich, störungsarm	extreme pH-Werte, hohe Leitfähigkeiten, ungelöste Stoffe, gefärbte Proben, zytotoxische Komponenten	ja	Dizer <i>et al.</i> (2002), European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Grummt (2018), Han <i>et al.</i> (2016), Jekel und Ruhl (2016), Kienle <i>et al.</i> (2015), Kolarević <i>et al.</i> (2016), LANUV, LfU, LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, LW, Marić <i>et al.</i> (2020), NLWKN, Oda (2016), Schmidt <i>et al.</i> (2017), Žegura <i>et al.</i> (2009)

Anlage 1 - Tabelle 1: Fortsetzung

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
Alkalische Filterelution	etablierte Zelllinie: V79 (Hamster); Grünalgen	DNA-Strangbrüche (DNA-Gehalt in Filtrat)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Swenberg (1981)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		1 Tag				Reifferscheid und Grummt (2000), OSPAR Commission (2002)
Chromosomen-aberrationstest	verschiedene etablierte Zelllinien: V79, CHO, CHL (Hamster)	klastogene Effekte (Chromatiden-/ Chromosomenaberrationen)	OW, ABW	standardisiert: OECD 473	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn mindestens Verdopplung der Mutationsrate		sehr aufwendig		teuer, Zellen müssen Mitose durchlaufen/Zellkultur notwendig, Gefahr der subjektiven Bewertung der Befunde		OSPAR Commission (2002)
cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	klastogene und aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	OW	Forschung Westerink <i>et al.</i> (2011)	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn Dosis-abhängiger Anstieg der Mikrokernrate				mögliche Interaktion des cytochalasin-B mit Substanzen, Zytotoxizität des cytochalasin-B variiert zwischen Zelltypen	ja	Han <i>et al.</i> (2016)
DNA-Aufwindungstest	etablierte Zelllinien: RTG-2, PLHC-1 (Fisch)	DNA-Strangbrüche (verbleibender Gehalt an DNA-Doppelsträngen)	OW, Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Bolcsfoldi (1995)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		2 Tage				Reifferscheid und Grummt (2000)
Fpg-modified Comet Assay	etablierte Zelllinie: RTL-W1 (Fisch)	DNA-Strangbrüche (Schweifbildung)	ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Kienzler <i>et al.</i> (2012)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		1 bis 2 Tage				Kienle <i>et al.</i> (2015), Perrodin <i>et al.</i> (2013)
GreenScreen Assay	Hefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	OW	Forschung Cahill <i>et al.</i> (2004)	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat wenn Induktionsrate $\geq 1,3$		1 Tag	kommerzielle Testkits erhältlich	stark absorbierende Substanzen		Cahill <i>et al.</i> (2004), European Commission (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015)
Microscreen Phage-Induction Assay	Bakterien: <i>Escherichia coli</i>	DNA-Schäden (Freisetzung lytischer Phagen)	ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Vargas <i>et al.</i> (1990)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		2 bis 3 Tage				OSPAR Commission (2002)
Mutatox Assay	Bakterien: <i>Aliivibrio fischeri</i>	Genmutation (Bildung von Revertanten)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Ulitzur <i>et al.</i> (1980)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle: verschiedene Kriterien: z.B: "relative light units" mindestens 5 mal so hoch wie Induktion der Kontrolle; Induktion zweier aufeinanderfolgender Konzentrationen mindestens 3 mal so hoch wie Induktion der Kontrolle		mittel, 1 Tag	kommerzielle Testkits erhältlich			Guzzella <i>et al.</i> (2004), Kienle <i>et al.</i> (2015), Legault <i>et al.</i> (1994), OSPAR Commission (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene mutation test	Hefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genmutationen (Bildung von Revertanten)	OW, ABW	nicht mehr standardisiert: OECD 480 (gelöscht 2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		5 bis 8 Tage				OSPAR Commission (2002)
SCE (sister chromatid exchange) assay	verschiedene etablierte Zelllinien: Fisch; CHL, CHO (Hamster)	Austausch von DNA-Segmenten zwischen Schwesterchromatiden	OW, ABW	nicht mehr standardisiert: OECD 479 (gelöscht 2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		sehr aufwendig		Zellen müssen Mitose durchlaufen / Zellkultur notwendig		Gulati <i>et al.</i> (1989), OSPAR Commission (2002)
SOS-Chromotest	Bakterien: <i>Escherichia coli</i> K-12 und PQ37	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	OW, ABW, Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Quillardet <i>et al.</i> (1985)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle: positives Testresultat wenn Induktionsrate $\geq 1,5$		1 Tag	kommerzielle Testkits erhältlich			Guzzella <i>et al.</i> (2004), Kienle <i>et al.</i> (2015), Legault <i>et al.</i> (1994), Maier <i>et al.</i> (2015), OSPAR Commission (2002), Tolan <i>et al.</i> (2007)
UDS assay	primäre Hepatozyten: Fisch, Ratte	DNA-Schäden (Induktion der DNA-Reparatur)	OW	standardisiert (für Säugetier-Leberzellen): OECD 486	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat wenn mindestens eine Testkonzentration statistisch signifikante Erhöhung auslöst		aufwendig, 8 bis 15 Tage				Grummt <i>et al.</i> (2004), OSPAR Commission (2002), Reifferscheid und Grummt (2000)
in vivo											
<i>Allium cepa</i> test	Pflanzen: <i>Allium cepa</i>	Genmutation, Chromosomenaberrationen (mitotischer Index, Bildung von Mikrokernen, morphologische Veränderungen der Zellkerne)	TW, OW, ABW, Sediment	etabliert, aber nicht standardisiert: Fiskesjö (1985)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		4 Tage	eukaryotisches System, einfach durchführbar, günstig, sensitiv		nein	Batista <i>et al.</i> (2016), Leme <i>et al.</i> (2009), Tabrez <i>et al.</i> (2011)

Anlage 1 - Tabelle 2: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Gentoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Mikrokerntest	Fische: Erythrozyten, Kiemen- und Lebergewebe; Amphibien: Erythrozyten; Muscheln: Hämozyten, Kiemenzellen; Pflanzen	klastogene & aneugene Effekte (Bildung von Mikrokernen)	OW, ABW, Sediment-extrakte	standardisiert (Test mit Säugetiererythrozyten): OECD 474; sonst etabliert, aber nicht standardisiert	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; z.B. Review von Bolognesi <i>et al.</i> (2011), Projekt SchussenAktivplus Projekt SchussenAktivplus, (Triebskorn (2017), Wilhelm <i>et al.</i> (2018), Blut): Regenbogenforellen (1,5-jährig): Kontrollen: $0,35 \pm 0,34 - 0,81 \pm 0,24\%$ direkt unterhalb dreistufiger KA: $2,3 \pm 1,5\%$ direkt unterhalb KA mit Aktivkohle: $0,45 \pm 0,5\%$ Bachforellen (1,5-jährig) Kontrollen: $0,8 \pm 0,6 - 1,6 \pm 1,0\%$ Argon: $1,4 \pm 1,1\%$ - $1,7 \pm 1,5\%$ Schussen, unterhalb dreistufiger KA: $2,5 \pm 1,3\%$ Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: $0,6 \pm 0,7\%$ Döbel: Argon: $1,0 \pm 1,3\%$ - $1,3 \pm 1,1\%$ Schussen, oberhalb KA: $0,6 \pm 0,7\%$ - $4,2 \pm 4,8\%$ Schussen, unterhalb dreistufiger KA: $3,6 \pm 1,9\%$ Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: $0,5 \pm 0,5\%$ Deutschmann <i>et al.</i> (2016): Ukelei, Referenzstelle Donau: $0,39 \pm 0,25\%$	wenig bis mittel	einige Stunden	einfach durchführbar	Alter des untersuchten Tieres hat Einfluss	Batista <i>et al.</i> (2016), Boettcher <i>et al.</i> (2010), Deutschmann <i>et al.</i> (2016), Ergene <i>et al.</i> (2007), European Commission (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015), Klobučar <i>et al.</i> (2010), Kolarević <i>et al.</i> (2016), Marić <i>et al.</i> (2020), OSPAR Commission (2002), Triebskorn (2017), VDI (2018)
Chromosomen-aberrationstest	Fisch-Embryonen; Pflanzen: <i>Allium cepa</i> , <i>Vicia faba</i>	klastogene Effekte (Chromatiden-/ Chromosomenaberrationen)	ABW, Klärschlamm, Sediment	Forschung Grant <i>et al.</i> (1992), Hayashi <i>et al.</i> (1998)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle		mehrere Tage			Batista <i>et al.</i> (2016), OSPAR Commission (2002)
Comet Assay	Algen; Pflanzen; Muscheln: Kiemengewebe, Hämozyten; Amphibien: verschiedene Gewebe; Fische: Erythrozyten, Kiemen- und Lebergewebe	DNA-Strangbrüche (Schweifbildung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Singh <i>et al.</i> (1988)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: Aborgiba <i>et al.</i> (2016): Muscheln, Hämozyten, Laborkontrollen: $5,2 \pm 0,5$ olive tail moment; Deutschmann <i>et al.</i> (2016): Ukelei, Erythrozyten, Referenzstelle Donau: $5,6 \pm 0,6\%$ tail intensity; Klobučar <i>et al.</i> (2010): Karpfen, Erythrozyten, Referenzstelle im Naturpark Kopački rit: 0- ca. 7% tail DNA; Marić <i>et al.</i> (2020): Karpfen, Erythrozyten, Laborkontrollen: $35,36 \pm 0,98\%$ tail intensity; Muscheln, Hämozyten, Laborkontrollen: $8,03 \pm 0,45\%$ tail intensity; Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2014): Muscheln: Kiemenzellen, Laborkontrollen: $3,5 \pm 0,2\%$ tail intensity; Hämozyten, Laborkontrollen: 3% tail intensity	mittel		kleine Probenmenge nötig; sensitiv	keine Unterscheidung zwischen eigentlichen DNA-Schäden und Induktion der DNA-Reparatur; Wassertemperatur kann Ergebnis beeinflussen	Aborgiba <i>et al.</i> (2016), European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2004), Kienle <i>et al.</i> (2015), Klobučar <i>et al.</i> (2010), Marić <i>et al.</i> (2020), OSPAR Commission (2002), Pellacani <i>et al.</i> (2006), Tabrez <i>et al.</i> (2011), Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2014), VDI (2018)
DNA-Aufwindungstest	Fische: Lebergewebe, ganze Larven; Muscheln: Kiemen- und Muskelgewebe; Krebstiere: ganze Tiere	DNA-Strangbrüche (verbleibender Gehalt an DNA-Doppelsträngen)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Wittekindt <i>et al.</i> (2000)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: Dizer <i>et al.</i> (2002): Regenbogenforellen, Leberzellen: Kontrolle: $(-\log F) = 0,28 \pm 0,04$, 30% Abwasser: $0,43 \pm 0,07$, 40% Abwasser: $0,38 \pm 0,06$					Dizer <i>et al.</i> (2002), Grummt <i>et al.</i> (2004), OSPAR Commission (2002), Reifferscheid und Grummt (2000)

Anlage 1 - Tabelle 3: Biotests zur Untersuchung von Neurotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
RTCA Proliferation	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Proliferation (elektrische Widerstandsmessung)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: SOP vorhanden	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn Zellwachstum < 80% der Negativkontrolle (UBA)	mittel bis robust	simpel, 3 Tage	zeitaufgelöste Erfassung möglich	es sollte immer eine Sterilfiltration vorgenommen werden; bei Abwasserproben muss zusätzlich Antibiotikum hinzugefügt werden	eventuell	Grummt <i>et al.</i> (2017), Grummt <i>et al.</i> (2018), UBA
Neuritenwachstumstest	etablierte Zelllinie: SH-SY5Y (Mensch)	Ausbildung/Hemmung des Neuritenwachstums (Fluoreszenzmessung und optische Auswertung)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: SOP vorhanden	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn Index <0,7 (Fluoreszenz <70% der Negativkontrolle) (UBA)	wenig bis mittel	anspruchsvoll, 4 Tage	spezifischer Neurotoxizitäts-endpunkt		eventuell	Grummt <i>et al.</i> (2017), Radio und Mundy (2008); UBA
Nekrose PI	etablierte Zelllinie: Jurkat (Mensch)	Zelltod (Fluoreszenzmessung des Farbstoffs PI)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: SOP vorhanden	Unterschied zur Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn > 10 % Rotfluoreszenz messbar (nach Abzug des Negativkontroll-wertes) (UBA)	robust	simpel, 2 Tage	geringe Standard-abweichungen		eventuell	Grummt <i>et al.</i> (2017), UBA
Acetylcholinesterase-Hemmtest	Acetylcholinesterase	Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität (Enzymaktivität)	OW, ABW	für Acetylcholinesterase aus Rinder-Erythrozyten: standardisiert: DIN 38415-1:1995; sonst etabliert, aber nicht standardisiert: Elliman <i>et al.</i> (1961)	Vergleich mit Referenzsubstanz Parathion EC ₅₀ =1.9x10 ⁻⁷ M: EBT-PTEQ=26 µg Parathion-EQ/L (Escher <i>et al.</i> (2015))	mittel	mittel; max. 24 Stunden	sensitiv	Querempfindlichkeiten durch Huminstoffe, einige ionische Detergenzien oder durch Schwermetalle können auftreten, wenn diese in höheren Konzentrationen vorliegen	ja	Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), LW, Schmidt <i>et al.</i> (2017)
in vivo											
Neuromasten-Assay	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Schädigung der Neuromasten (Intensität der Fluoreszenzfärbung)	TW, OW	Forschung: Stengel <i>et al.</i> (2015)	vierstufiges Scoring-Verfahren		mehrere Tage				Grummt <i>et al.</i> (2017), Grummt <i>et al.</i> (2018)
Untersuchung der Retina	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Veränderungen der Netzhaut	TW	Forschung: Poggi <i>et al.</i> (2005)	nicht angegeben		aufwendig				Grummt <i>et al.</i> (2017)
Untersuchung des olfaktorischen Systems	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Veränderungen der Riechepithelien	TW	Forschung: Blechinger <i>et al.</i> (2007)	nicht angegeben		aufwendig				Grummt <i>et al.</i> (2017)

Anlage 1 - Tabelle 4: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Neurotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Acetylcholinesterase-Hemmung	Fische: Hirn, Muskelgewebe; Muscheln: Kiemengewebe; Krebstiere: ganze Tiere	Hemmung der Acetylcholinesterase (Enzymaktivität pro mg Protein nach Exposition)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fulton <i>et al.</i> (2001)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; z.B. Projekt SchussenAktivplus (Tribskorn (2017)): Lebergewebe von Fischen: Regenbogenforellen (1,5-jährig, Acetylcholinesterase-Units/mg Protein) Kontrolle: 0,09±0,02 - 0,14±0,05 Argon: 0,08±0,02-0,1±0,02 Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 0,06±0,01 Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 0,11±0,9 Döbel, Schussen und Argon: 97-227 nmol/min*mg Protein Deutschmann (2020): Lebergewebe von Bachforellen, Referenzstelle Holtemme: ca. 9 nmol/min*mg Protein	mittel bis robust		sehr sensitiv	Ernährungszustand des Tieres und Wassertemperatur können Ergebnis beeinflussen; jahreszeitliche Schwankungen der AChE-Aktivität (Reproduktionszeit)	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Hanson <i>et al.</i> (2013), Kienle <i>et al.</i> (2015), OSPAR Commission (2013), Tribskorn (2017), VDI (2018)
Carboxylesterase-Hemmung	Fische: Hirn	Hemmung der Carboxylesterase (Enzymaktivität pro mg Protein nach Exposition)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Chanda <i>et al.</i> (1997)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; z.B. Projekt SchussenAktivplus (Tribskorn (2017)): Lebergewebe von Regenbogenforellen (1,5-jährig, Carboxylesterase-Units/mg Protein): Kontrollen: 0,46±0,01 - 0,06±0,03 Argon: 0,46±0,02 - 0,06±0,01 Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 0,03±0,01 Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 0,06±0,01 Deutschmann (2020): Bachforellen, Lebergewebe, Referenzstelle Holtemme: ca. 650 µmol/min*mg Protein					Grummt <i>et al.</i> (2017), Tribskorn (2017)

Anlage 1 - Tabelle 5: Biotests zur Untersuchung von dioxin-ähnlichen Wirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
DR-CALUX	etablierte Zelllinie: H4IIE (Ratte)	Induktion des Arylhydrocarbon-Rezeptors (Luminiszens)	OW, ABW Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Murk <i>et al.</i> (1996)	Vergleich mit Referenzsubstanz 2,3,7,8-TCDD: EBT=50pg 2,3,7,8-TCDD-EQ/L (van der Oost <i>et al.</i> 2017)	robust	aufwendiger, 2 Tage	sensitiv, kommerzielle Testkits erhältlich		eventuell	European Commission (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015)
AhR-CALUX	etablierte Zelllinien: H4IIE (Ratte); HepG2 (Mensch)	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (Luminiszens)	OW, ABW Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Brennan <i>et al.</i> (2015)	Vergleich mit Referenzsubstanz Benzo[a]pyren (EC ₁₀ =211 ng/L): EBT-B[a]P-EQ=250 ng B[a]P-EQ/L (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> , 2021)	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Brennan <i>et al.</i> (2015), Schmidt <i>et al.</i> (2017), Informationen von L. Bláha, Informationen von B. Escher,
PAH CALUX	etablierte Zelllinie: H4IIE (Ratte)	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (Luminiszens)	OW, ABW Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Pieterse <i>et al.</i> (2013)	Vergleich mit Referenzsubstanz Benzo[a]pyren (PC ₁₀ =50 ng/L): EBT-B[a]P-EQ=6.21 ng B[a]P-EQ/L (Escher <i>et al.</i> , 2018)		mehrere Tage	sensitiv, kommerzielle Testkits erhältlich		eventuell	European Commission (2014)
EROD Assay (in vitro)	verschiedene etablierte Zelllinien: RTL-W1 (Fisch); H4II (Ratte); HepG2 (Mensch)	Cytochrom P450IA1 Induktion (EROD Aktivität)	OW, ABW, Sediment-extrakte	standardisiert: ISO/TS 23893-2:2007	Vergleich mit Referenzsubstanz β -Naphthoflavon; Vergleich mit Literaturwerten: siehe Review von Whyte <i>et al.</i> (2004)	robust	aufwendiger, >1 Tag	sensitiv		eventuell	European Commission (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015), Schmidt <i>et al.</i> (2017)
Reportergenassay mit H4IIE-luc Zellen	etablierte Zelllinie: H4IIE (Ratte)	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (Luminiszens)	OW, ABW, Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Garrison <i>et al.</i> (1996)	Vergleich mit Referenzsubstanz 2,3,7,8-TCDD, Benzo[a]pyren, β -Naphthoflavon; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Projekt SchussenAktivplus : ABW: Nachklärung/Sandfiltration: 0,3±0,2 ng TEQ/L Pulveraktivkohle/Sandfiltration: <0,025 ng TEQ/L OW: Argen: 0,04±0,02 ng TCDD-EQ/L; Schussen (unterhalb dreistufiger KA): 0,07±0,06 ng TCDD-EQ/L Schussen (unterhalb KA mit Aktivkohle): <0,025 ng TEQ/L Sediment: Argen: 0,4±0,5 ng TCDD-EQ/g dm Schussen (unterhalb dreistufiger KA): 0,8±0,4 ng TCDD-EQ/g dm; Schussen (unterhalb KA mit Pulveraktivkohle): 0,4±0,4 ng TCDD-EQ/g dm;	robust	1,5 Tage	sensitiv		eventuell	Grummt <i>et al.</i> (2017), Maier <i>et al.</i> (2015), Tribskorn (2017), Informationen von L. Bláha
Yeast dioxin screen	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion eines Reportergens für den humanen Arylhydrocarbon-rezeptor (β -Galaktosidase-Aktivität)	OW, ABW Sediment-extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Routledge <i>et al.</i> (1996), Stalter <i>et al.</i> (2011)	Vergleich mit Referenzsubstanz 2,3,7,8-TCDD, β -Naphthoflavon (EC ₅₀ =3x10 ⁻⁸ M, Stalter <i>et al.</i> , 2011) Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Stalter <i>et al.</i> (2011): ABW: Nachklärung: 387,1-741,2 ng β -NF-EQ/L Ozon/Sandfilter: 55,6-71,0 ng β -NF-EQ/L		3 Tage	sensitiv, einfach durchführbar		eventuell	Grummt <i>et al.</i> (2017), Tribskorn (2017)

Anlage 1 - Tabelle 6: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von dioxin-ähnlichen Wirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
EROD Aktivität	Fische: Lebergewebe, seltener Kiemengewebe	CYP1A1 Induktion (Ethoxyresorufin-O-deethylase Aktivität)	OW, ABW	standardisiert: ISO/TS 23893-2:2007	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; z.B. Review von Whyte <i>et al.</i> (2000) Projekt SchussenAktivplus (Tribskorn , 2017; Wilhelm <i>et al.</i> , 2018), Lebergewebe von Fischen, pmol/min*mg): Regenbogenforellen (1,5-jährig) Kontrollen: 0,4±0,7 - 1,1±1,4 Schussen, oberhalb KA: 1,2±1,2 - 1,6±1,5 direkt unterhalb dreistufiger KA: 4,9±4,5 direkt unterhalb KA mit Aktivkohle: 1,3±1,1 Bachforellen (1,5-jährig) Kontrollen: 0,5±0,4 - 2,7±2,0 Argen: 1,0±1,0 - 1,4±1,1 Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 2,8±2,3 Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 2,1±3,2		mittel; 1 Tag	sensitiv, einfach durchführbar, kommerzielle Testkits erhältlich	Gegenwart von Hemmstoffen; Alter, Geschlecht, Ernährungszustand des Tieres und Wassertemperatur können Ergebnis beeinflussen; jahreszeitliche Schwankungen der EROD Aktivität (Reproduktionszeit)	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), Tribskorn (2017), VDI (2018), Wilhelm <i>et al.</i> (2018), Whyte <i>et al.</i> (2000)
AHH Assay	Fische: Lebergewebe	CYP1A1 Induktion (Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Nebert und Gelboin (1968)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: Stegemann und Klopper-Sams (1987): Forellen: 0,01 - 1,6 nmol/min		1 bis 2 Tage			Whyte <i>et al.</i> (2000)
Fish CYP1A1- Assay	Fische: Blut, verschiedene Gewebe	CYP1A1-Konzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fish cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) ELISA kit manual (Cusabio Technology LLC, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: CYP P450 A1=271,99 pg/mL - 2162,6 pg/mL	robust	1 bis 2 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich		Danabas <i>et al.</i> (2019), LfU
Benzo(a)pyren-Hydroxylase Aktivität	Muscheln: Verdauungsdrüsen	Benzo(a)pyren hydroxylase-Aktivität (Substratumsatz)	OW	Forschung: Farcy <i>et al.</i> (2013)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle		wenige Stunden			Kienle <i>et al.</i> (2015)

Anlage 1 - Tabelle 7: Biotests zur Untersuchung von endokrinen Wirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
Yeast Estrogen Screen (Östrogene Wirkung)	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion eines Reportergens für humanen Estrogenrezeptor (β-Galaktosidaseaktivität)	ABW, OW	L-YES: standardisiert: ISO 19040-1:2018; Routledge <i>et al.</i> (1996), Wagner <i>et al.</i> (2013); pYES: etabliert, aber nicht standardisiert: Weiss <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17β-Östradiol (EC ₅₀ =39-107 ng/L, LFU); EEQ-SSE _{Langzeit} =0,2 - 0,4 ng/L, EEQ-SSE _{Kurzzeit} =1,2 - 2 ng/L (Jarošová <i>et al.</i> (2014)) Projekt SchussenAktivplus (Giebner <i>et al.</i> , 2018; Triebskorn, 2017): ABW (SPE-Extrakt): Nachklärung: 19% Nachklärung/Sandfiltration: 7% Ozon/GAK und Ozon/Sandfiltration: 2,7% Pulveraktivkohle/Sandfiltration: 0,5% OW: Schussen (oberhalb KA): 0,34-3,91% Schussen (unterhalb dreistufiger KA): 3,25% Schussen (unterhalb KA mit Aktivkohle): 0,35%	mittel bis robust	mittel, 2 bis 3 Tage	sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung	Native Proben: Abwasserproben mit sehr hohen Bakterienkonzentrationen, gleichzeitige Anwesenheit von anti-östrogenen, stark gefärbte oder stark trübe Proben, hoher Salzgehalt. Native Proben und Probenextrakt: generelle Toxizität der Probe können östrogen Aktivität überdecken und die Empfindlichkeit der Tests reduzieren	eventuell	European Commission (2014), Giebner <i>et al.</i> (2018), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), LFU, LUBW, LW, Schmidt <i>et al.</i> (2017), Triebskorn (2017), Informationen von L. Bláha und C. Kienle
Yeast Anti-Estrogen Screen (Anti-Östrogene Wirkung)	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hemmung der Induktion eines Reportergens für humanen Estrogenrezeptor (β-Galaktosidaseaktivität)	ABW, OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Routledge <i>et al.</i> (1996), Wagner <i>et al.</i> (2013)	Vergleich mit Referenzsubstanz Tamoxifen; Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): OW: <50 - 1296 µg TMXEQ/L ABW: 13 - 97 µg TMXEQ/L Projekt SchussenAktivplus (Giebner <i>et al.</i> , 2018; Triebskorn, 2017): ABW: Nachklärung: 40,3% Nachklärung/Sandfiltration: 35,7% Ozon/GAK: 44,7%, Ozon/Sandfiltration: 59,2% Pulveraktivkohle/Sandfiltration: 63,5% OW: Schussen (oberhalb KA): 33,3-35,8% Schussen (unterhalb dreistufiger KA): 37,4% Schussen (unterhalb KA mit Aktivkohle): 35,9%		mittel, 4 Tage	sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung, Format auf 96-Well-Platten ermöglicht Testung von vielen Proben, geringes Probenvolumen benötigt		eventuell	European Commission (2014), Giebner <i>et al.</i> (2018), Grummt <i>et al.</i> (2017), Kase <i>et al.</i> (2009), Leusch <i>et al.</i> (2017) Triebskorn (2017), Informationen von L. Bláha
Yeast Androgen Screen (Androgene Wirkung)	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Induktion eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (β-Galaktosidaseaktivität)	ABW, OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Routledge <i>et al.</i> (1996), Wagner <i>et al.</i> (2013), Mak <i>et al.</i> (1999)	Vergleich mit Referenzsubstanz Testosteron, Dihydrotestosteron; Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): OW: <2,5 - 69 ng DHTEQ/L ABW: <0,5 - 635 ng DHTEQ/L Projekt SchussenAktivplus (Triebskorn, 2017): ABW (SPE-Extrakte): Nachklärung: 2%; Nachklärung/Sandfiltration: 0,7% OW (SPE-Extrakte): Schussen oberhalb KA: 0,63-0,71% Schussen unterhalb KA: 0,09-0,91%	mittel	mittel, 3 bis 4 Tage	sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung		eventuell	Giebner <i>et al.</i> (2018), Grummt <i>et al.</i> (2017), Leusch <i>et al.</i> (2017), LW, Triebskorn (2017)
Yeast Anti-Androgen Screen ((Anti)Androgene Wirkung)	Hefe: rekombinante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hemmung der Induktion eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (β-Galaktosidaseaktivität)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Routledge <i>et al.</i> (1996), Wagner <i>et al.</i> (2013)	Vergleich mit Referenzsubstanz Flutamid; Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): OW: 20 - 7500 µg FLUEQ/L ABW: 82-1400 µg FLUEQ/L		mittel, 4 Tage	sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung		eventuell	Giebner <i>et al.</i> (2018), Grummt <i>et al.</i> (2017), Leusch <i>et al.</i> (2017) Triebskorn (2017)

Anlage 1 - Tabelle 7: Fortsetzung

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
ERα-CALUX ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Bindung an estrogenen Rezeptor (Lumineszens)	TW, OW, ABW	standardisiert: ISO 19040-3:2018, OECD 455	östrogene Wirkung: vorläufige Bewertungskriterien des UBA: Vergleich mit Referenzsubstanz (17β-Estradiol) / Berechnung von Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen EEQ: positives Testresultat, wenn EEQ ≥ LOQ (0,7 ng/L), schwach positives Testresultat, wenn LOD (0,2 ng/L) < EEQ < LOQ; EEQ-SSE _{Langzeit} =0,2 - 0,3 ng/L, EEQ-SSE _{Kurzzeit} =0,6 - 2 ng/L (Jarošová et al., 2014) antiöstrogene Wirkung: Vergleich mit Referenzsubstanz Tamoxifen; Vergleich mit Literaturwerten: Oberflächenwasser: <260 ng TMXEQ/L behandeltes Abwasser: <500 ng TMXEQ/L (Leusch et al., 2017)	mittel bis robust	aufwendiger, 3 Tage	sehr sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung, kommerzielle Testkits erhältlich	es sollte immer eine Sterilfiltration vorgenommen werden; bei Abwasserproben muss zusätzlich Antibiotika hinzugefügt werden	eventuell	Brand et al. (2013), Kase et al. (2009), LANUV, Leusch et al. (2017), Schmidt et al. (2017), UBA
AR-CALUX ((Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	standardisiert: OECD 458	androgene Wirkung: Vergleich mit Referenzsubstanz 5α-dihydrotestosteron (DHT): maximal induziertes Antwortlevel in mind. 2 Durchläufen ≥10% des maximalen Antwortlevels der Referenzsubstanz; EC ₅₀ der Referenzsubstanz=47,7±3,1 ng/L; bioassay threshold=10 ng/L DHTEQ (Leusch et al., 2014) antiandrogene Wirkung: Vergleich mit Referenzsubstanz Flutamid: maximal induziertes Antwortlevel in mindestens 2 Durchläufen ≤ 80% des maximalen Antwortlevels der Referenzsubstanz; EBT-Flutamid-EQ=14,4 µg/L (Escher et al., 2018)		aufwendiger, 3 Tage	sehr sensitiv, einfach durchführbar, spezifische Wirkung, kommerzielle Testkits erhältlich		ja	European Commission (2014), Grummt et al. (2017), Kase et al. (2009), LANUV, Leusch et al. (2014), Schmidt et al. (2017)
E-Screen (Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: MCF-7 (Mensch)	Östrogen-induzierte Proliferation	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Soto et al. (1995)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17β-Ostradiol; Leusch et al. (2014): EC ₅₀ der Referenzsubstanz=6,5±0,5 ng/L bioassay threshold=0,1 ng/L EEQ Jarošová et al. (2014): EEQ-SSE _{Langzeit} =0,1 - 0,3 ng/L EEQ-SSE _{Kurzzeit} =0,5 - 1,6 ng/L Projekt SchussenAktivplus (Triebskorn, 2017): ABW: Nachklärung: 1,9 ng EEQ/L Nachklärung/Sandfiltration: 2,72 ng EEQ/L Ozon/GAK: 0,1 ng EEQ/L Pulveraktivkohle/Sandfiltration: 0,4 ng EEQ/L OW: Schussen, oberhalb/unterhalb dreistufiger KA: ca. 0,5 ng EEQ/L Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: ca. 0,3 EEQ ng/L Arten: 0,2-0,3 ng EEQ/L		aufwendiger, 5 Tage	sehr sensitiv		ja	Grummt et al. (2017), Henneberg et al. (2014), Kase et al. (2009), Kienle et al. (2015), Leusch et al. (2017), Schmidt et al. (2017), Triebskorn (2017)
Reportergenassay mit MVLN-Zellen ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: MVLN (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Östrogenrezeptor (Lumineszens)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Gutendorf et al. (2001)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17β-Östradiol: EEQ-SSE _{Langzeit} =0,1 - 0,3 ng/L, EEQ-SSE _{Kurzzeit} =0,5 - 1,4 ng/L (Jarošová et al., 2014)		2 Tage	sensitiv, einfach durchführbar		ja	Grummt et al. (2017), Schmidt et al. (2017), Triebskorn (2017)

Anlage 1 - Tabelle 7: Fortsetzung

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
Reporterassay mit MDA-kb2-Zellen ((Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: MDA-kb2 (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Luminiszens)	OW, ABW	Forschung: Wilson <i>et al.</i> (2002)	Vergleich mit Referenzsubstanz 5 α -Dihydroxytestosteron (agonistische Wirkung)/Flutamid (antagonistische Wirkung); Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): Oberflächenwasser: <0,4 ng DHTEQ/L / 2,3-240 μ g FLUEQ/L behandeltes Abwasser: 4,3 -8,3 ng DHTEQ/L / <10 μ g FLUEQ/L		2 Tage	sensitiv, einfach durchführbar		ja	Grummt <i>et al.</i> (2017), Schmidt <i>et al.</i> (2017), Tribskorn (2017)
Reporterassay mit Era-HeLa-9903 Zellen ((Anti)Östrogene Wirkung)	etablierte Zelllinie: hERalpha-HeLa-9903 (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für humanen Östrogenrezeptor (Luminiszens)	OW, ABW	standardisiert: OECD 455	östrogene Wirkung: in mind. 2 Durchläufen das maximal induzierte Antwortlevel \geq 10% des maximalen Antwortlevels der Referenzsubstanz; antiöstrogene Wirkung: in mind. 2 Durchläufen ein IC ₃₀ berechnet; Vergleich mit Referenzsubstanz 17 β -Estradiol (PC ₁₀ =2,7 ng/L): EBT-EEQ=1,01 ng/L (Escher <i>et al.</i> , 2018)		1 Tag	sensitiv, einfach durchführbar		ja	Grummt <i>et al.</i> (2017), Henneberg <i>et al.</i> (2014), Schmidt <i>et al.</i> (2017), Tribskorn (2017)
HEP-Vtg Assay (Östrogene Wirkung)	primäre Hepatozyten: Fisch	Vitellogenininduktion (Vitellogeninlevel)	OW, ABW	Forschung: Tollefsen <i>et al.</i> (2003)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17 β -Estradiol; Vergleich mit Literaturwerten: siehe Navas und Segner (2006)		aufwendiger, 4 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich	Temperatur, große Unterschiede zwischen verschiedenen Arten		Kienle <i>et al.</i> (2015)
ELRA (Enzyme-linked receptor assay) (Östrogene Wirkung)	Östrogenrezeptor α (Mensch)	Bindung an Rezeptor (ELISA)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Seifert <i>et al.</i> (1999)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17 β -Östradiol (EC ₅₀ =191-243 ng/L E2) (Kase <i>et al.</i> (2009))		4 Stunden			nein	Kase <i>et al.</i> (2009), Kienle <i>et al.</i> (2015)
HEP-Zrp Assay (Östrogene Wirkung)	primäre Hepatozyten: Fisch	Produktion von Zona radiata Proteinen (ZRPs) (ELISA)	OW, ABW	Forschung: Rutishauser <i>et al.</i> (2004)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17 β -Östradiol		4 Tage				Kienle <i>et al.</i> (2015)
H295R Steroidogenesis Assay ((Anti)Östrogene und (Anti)Androgene Wirkung)	etablierte Zelllinie: H295R (Mensch)	Störung der Steroidsynthese (Konzentration an Steroiden/ Genregulation)	OW, ABW	standardisiert: OECD 456	Unterschied zu Negativkontrolle/ Lösungsmittelkontrolle		mittel, 3 Tage		Störung der Glucocorticoid- und mineralischen Corticoid-Produktion können Einfluss auf die gemessenen Testosteron- und Östradiol-Level haben	ja	Grummt <i>et al.</i> (2017), Kase <i>et al.</i> (2009), Kienle <i>et al.</i> (2015), Schmidt <i>et al.</i> (2017)
ER-GeneBLAzer (Östrogene Wirkung)	Zellsensor: ER α -UAS- <i>bla</i> GripTite (Mensch)	Induktion eines Reportergens für humanen Estrogenrezeptor (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017), Rotroff <i>et al.</i> (2014)	Vergleich mit Referenzsubstanz 17 β -Estradiol (EC ₁₀ =3.08 ng/L): EBT-EEQ=0.34 ng EEQ/L (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> , 2018)	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Leusch <i>et al.</i> (2018), Informationen von B. Escher
AR-GeneBLAzer (Androgene Wirkung)	Zellsensor: AR-UAS- <i>bla</i> GripTite (Mensch)	Induktion eines Reportergens für humanen Androgenrezeptor (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017), Huang <i>et al.</i> (2011)	Vergleich mit Referenzsubstanz Methyltrienolon (EC ₁₀ =44.24 ng/L) (Escher <i>et al.</i> (2018)), Dihydrotestosteron (androgen), Flutamid (anti-androgen); Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): Oberflächenwasser: 0,4-1,4 ng DHTEQ/L / 70-100 μ g FLUEQ/L behandeltes Abwasser: <0,1-2 ng DHTEQ/L	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Leusch <i>et al.</i> (2018), Informationen von B. Escher
GR-GeneBLAzer (Glucocorticoide Wirkung)	etablierte Zelllinie: GR-UAS- <i>bla</i> HEK293T (Mensch)	Induktion eines Reportergens für Glucocorticoidrezeptor (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017), Huang <i>et al.</i> (2011)	Vergleich mit Referenzsubstanz Dexamethason (EC ₁₀ =43.61 ng/L) (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> (2018)); Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): Oberflächenwasser: <17 ng DexaEQ/L behandeltes Abwasser: 27-188 ng DexaEQ/L	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Leusch <i>et al.</i> (2018), Informationen von B. Escher
GR-CALUX (glucocorticoide Wirkung)	etablierte Zelllinie: U2OS (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für Glucocorticoidrezeptor (Fluoreszens)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Sonneveld <i>et al.</i> (2005)	Vergleich mit Referenzsubstanz Dexamethason: EBT=100 ng Dexamethason-EQ/L (van der Oost <i>et al.</i> (2017))	robust	aufwendiger, 3 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Kienle <i>et al.</i> (2105), Schmidt <i>et al.</i> (2017)

Anlage 1 - Tabelle 7: Fortsetzung

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
PR-GeneBLAzer	etablierte Zelllinie: PR-UAS- <i>bla</i> HEK293T (Mensch)	Induktion eines Reportergens für Progesteronrezeptors (Fluoreszenz)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz Levonorgestrel (agonistische Wirkung)/Mifepriston (antagonistische Wirkung); Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2018): Oberflächenwasser: <0,1 - 8,7 ng Levonorgestrel- EQ/L; <8-32000 ng Mifepriston-EQ/L	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz- Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Leusch <i>et al.</i> (2018), Informationen von B. Escher
Luc Assay (Thyroidstörung)	etablierte Zelllinie: XL58-TRE-Luc (Frosch)	Induktion/Hemmung eines T3- abhängigen Reportergens (Luminiszenz)	OW, ABW	Forschung: Murata <i>et al.</i> (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle		1 Tag			ja	Kienle <i>et al.</i> (2015)
Thyroid hormone activity assay	etablierte Zelllinie: TRβ-UAS- <i>bla</i> HEK293T (Mensch)	Induktion/Hemmung eines Reportergens für Progesteronrezeptors (Fluoreszenz)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz Bisphenol A (EC ₅₀ = 3173 µg/L): EBT-BPA-EQ = 0,6 µg _{BPA} /L (relevant für antagonistische Wirkung, Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> , 2018)	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz- Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Leusch <i>et al.</i> (2018), Informationen von B. Escher
T-Screen (Thyroidstörung)	etablierte Zelllinie: GH3 (Ratte)	Hemmung der Zellproliferation (fluorometrische Messung der Zelldichte)	OW, ABW, Sediment- extrakte	etabliert, aber nicht standardisiert: Gutleb <i>et al.</i> (2005)	Vergleich mit Referenzsubstanz Triiodthyronin; Vergleich mit Literaturwerten: Leusch <i>et al.</i> (2017): Oberflächenwasser: <1,6 ng T3EQ/L behandeltes Abwasser: <1,5 ng T3EQ/L		4 Tage				Kienle <i>et al.</i> (2015)
in vivo											
Genexpressionsassay mit Froschlärven (Thyroidstörung)	Frosch-Larven: <i>Xenopus laevis</i>	Genexpression	OW, ABW	Forschung: Murata <i>et al.</i> (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle		mehrere Tage				Kienle <i>et al.</i> (2015)

Anlage 1 - Tabelle 8: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von endokrinen Wirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Vitellogenin-Synthese (Östrogene Wirkung)	Fische: Blutplasma, Lebergewebe von männlichen Tieren; Ganzkörperhomogenate von Larven; Mucusproben	Induktion der Vitellogeninsynthese (Vitellogenengehalt)	OW	standardisiert: ISO 23893-3:2013, OECD 234, Sumpter und Jobling (1995)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: Regenbogenforellen (Blut, Leber): 0,19 ng/mL - 8,71 ng/mL	robust	2 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich, sensitiv, spezifisch		European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Henneberg <i>et al.</i> (2015), LfU, OSPAR Commission (2013), Tribskorn (2017), VDI (2018)
Vorkommen von Ovotestis bei männlichen Fischen (Östrogene Wirkung)	Fische: Gonadengewebe von männlichen Tieren	Verweiblichung (mikroskopische Auswertung)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Jobling <i>et al.</i> (1998)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; OSPAR Commission (2013): Effekt ab 5%		hoch; mehrere Tage			European Commission (2014), Hanson <i>et al.</i> (2013), OSPAR Commission (2013)
Vorkommen von Intersex bei weiblichen Gastropoden (Androgene Wirkung)	Schnecken: Gonadengewebe von weiblichen Tieren	Vermännlichung (mikroskopische Auswertung)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: OSPAR Commission (2007)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; OSPAR Commission (2013): Effekt ab 5%		hoch; mehrere Tage			European Commission (2014), OSPAR Commission (2013)
Gonadosomatischer Index ((Anti)Östrogene und (Anti)Androgene Wirkung)	Fische: Gonadengewebe	Gonadenentwicklung (Gonadengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Henneberg <i>et al.</i> (2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle		gering; wenige Minuten	einfach durchführbar	jahresspezifische Unterschiede (Reproduktionszeit)	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Henneberg <i>et al.</i> (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015), Tribskorn (2017)
Gonadenentwicklung ((Anti)Östrogene und (Anti)Androgene Wirkung)	Fische: Gonadengewebe	Gonadenreife (mikroskopische Auswertung)	OW	Forschung: Henneberg <i>et al.</i> (2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle		hoch; mehrere Tage			Grummt <i>et al.</i> (2017), Henneberg <i>et al.</i> (2014)
Aromatase Aktivität	Fische: Hirn- und Gonadengewebe	Aktivität der Aromatase (Substratumsatz)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Lavado <i>et al.</i> (2004)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle		ca. 2 Stunden			European Commission (2014), Hanson <i>et al.</i> (2013)
Fish 11-Ketotestosteron-Assay (Östrogene Wirkung)	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	11-Ketotestosteron-Konzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fish 11-ketotestosterone ELISA kit manual (Cayman Chemicals, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: 11-keto-Testosteron = 17,95 ng/mL - 317,9 ng/mL	robust	1 bis 2 Tage			LfU, Omeje <i>et al.</i> (2019)
Fish Testosteron-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Testosteron-Konzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fish Testosterone ELISA kit manual (Cusabio Technology LLC, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: Testosteron = 9,61 ng/mL - 200,2 ng/mL	robust	1 bis 2 Tage			LfU, Sumi und Chitra (2020)
Fish Estradiol-Assay (Östrogene Wirkung)	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Estradiol-Konzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fish estradiol (E2) ELISA kit manual (Cusabio Technology LLC, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: Estradiol = 1,13 ng/mL - 13,53 ng/mL	robust	1 bis 2 Tage			LfU, Omeje <i>et al.</i> (2019)
Fish Aromatase-Assay	Fische: Blut, Lebergewebe von männlichen Tieren	Aromatase-Konzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Aromatase Elisa kit manual (Cusabio Technology LLC, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; LfU: Aromatase = 6,38 ng/mL - 23,97 ng/mL	robust	1 bis 2 Tage			LfU, Vasanth <i>et al.</i> (2015)
Fekundität von Gammariden	Krebstiere: <i>Gammarus</i> sp.	Fekundität (Anzahl Embryonen/Jungtiere pro Weibchen)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Peschke <i>et al.</i> (2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: z.B: Projekt SchussenAktivplus (Peschke <i>et al.</i> (2019), Tribskorn (2017)); Argon: Fekunditätsindex 1,6-1,9 Schussen, unterhalb dreistufiger KA: Fekunditätsindex 1,4-1,6 Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: Fekunditätsindex 1,0 Poeckl (1993): Fekunditätsindex 0,3 - 1,9		mehrere Stunden			Grummt <i>et al.</i> (2017), Peschke <i>et al.</i> (2019), Tribskorn (2017)

Anlage 1 - Tabelle 9: Biotests zur Untersuchung von Arzneimittelwirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
NSAID Biosensor (Schmerzmittel): Cox-1/roGFP3	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	Cox-1 Inhibition (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Bernhard <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz Diclofenac; Vergleich mit Literaturwerten: Bernhard <i>et al.</i> (2017); ABW (dreistufige Reinigung, SPE-Extrakt): 3,5 µg Diclofenac-EQ/L	mittel	einige Stunden	automatisierbar im Mitteldurchsatz, erfasst wirkbasiert Mischungseffekte	starke organische Belastung (Abwasser)		Bernhard <i>et al.</i> (2017), Tribskorn <i>et al.</i> (2017), Informationen von M. Frey
NSAID Biosensor (Schmerzmittel): Cox-2/roGFP	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	Cox-2 Inhibition (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert		mittel	einige Stunden	erfasst wirkbasiert Mischungseffekte	starke organische Belastung (Abwasser)		Informationen von M. Frey
Betablocker Biosensor: b1-Adrenozeptor / CEPAC	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	b1-Adrenozeptor Inhibition (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Bernhard <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz Metoprolol; Vergleich mit Literaturwerten: Bernhard <i>et al.</i> (2017); ABW (dreistufige Reinigung, SPE-Extrakt): 3,2-4,2 µg Metoprolol-EQ/L	mittel	einige Stunden	automatisierbar im Mitteldurchsatz, erfasst wirkbasiert Mischungseffekte	starke organische Belastung (Abwasser)		Bernhard <i>et al.</i> (2017), Tribskorn <i>et al.</i> (2017), Informationen von M. Frey

Anlage 1 - Tabelle 10: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Arzneimittelwirkungen

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Fish Prostaglandin E2-Assay	Blut von Fischen	Prostaglandinkonzentration	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Prostaglandin Elisa Kit Manual (Cusabio Technology LLC, USA)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; LfU: Prostaglandine = 116,4 pg/mL - 3418,4 pg/mL (Cusabio, Mybiosource)	robust	1 bis 2 Tage			Gan (2010), LfU

Anlage 1 - Tabelle 11: Biotests zur Untersuchung von oxidativem Stress

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vitro											
Allergen Biosensor	etablierte Zelllinie: HaCaT (Mensch)	Glutathion-Ox (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	Forschung				erfasst Aktivierung von Keratinozyten			Informationen von M. Frey
Redoxstress Biosensor	etablierte Zelllinie: CHO-K1 (Hamster)	Glutathion-Ox (Fluoreszenz-Ratio Änderung)	OW, ABW	Forschung				erfasst subletale Zellschädigung			Informationen von M. Frey
Nachweis von ROS mit DCFHDA	etablierte Zelllinien: HepG2, SH-SY5Y (Mensch)	Bildung von ROS (Fluoreszenzmessung des umgesetzten Farbstoffs durch ROS)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: SOP vorhanden	RFU (Relative Fluoreszenz Einheit) Quantifizierung in nM DCF mittels einer DCF Eichkurve; positives Testresultat, wenn > 20 nM DCF (nach Abzug nM DCF der Negativkontrolle) (UBA)	mittel bis robust	einfach durchführbar, 2 Tage	1. Messpunkt nach 4 h Inkubation möglich	es sollte immer eine Sterilfiltration vorgenommen werden; bei Abwasserproben muss zusätzlich Antibiotika hinzugefügt werden	eventuell	Escher <i>et al.</i> (2014), UBA
ROS Assay	etablierte Zelllinien: Mensch, RTG-2 (Fisch); primäre Hepatozyten (Fisch)	Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Fluoreszenz durch Substrat-oxidation)	OW, ABW	Forschung: Farmen <i>et al.</i> (2010), Wang <i>et al.</i> (1999)	Unterschied zu Negativkontrolle		einige Stunden				Kienle <i>et al.</i> (2015)
Glutathion-Peroxidase (GPX) Assay	etablierte Zelllinien: Mensch	Aktivität der Glutathion-Peroxidase (kolorimetrische Messung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Flohé <i>et al.</i> (1984), Yagi (1998)	Unterschied zu Negativkontrolle		einfach, 5 Minuten	kommerzielle Testkits erhältlich			Kienle <i>et al.</i> (2015)
AREc32	etablierte Zelllinie: AREc32 (Mensch)	Induktion von Nrf2	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Escher <i>et al.</i> (2012)	Vergleich mit Referenzsubstanz Dichlorvos (EC _{IR1,5} =1702 µg/L); EBT-Dichlorvos-EQ=156 µg Dichlorvos-EQ/L (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> (2018))	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher, Schmidt <i>et al.</i> (2017)
AREGeneBLazer	etablierte Zelllinie: ARE-bla HepG2 (Mensch)	Induktion von Nrf2	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: König <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz Dichlorvos (EC _{IR1,5} =3868 µg/L); EBT-Dichlorvos-EQ=1,4 mg Dichlorvos-EQ/L (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> (2018))	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher, Schmidt <i>et al.</i> (2017)

Anlage 1 - Tabelle 12: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von oxidativem Stress

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Glutathion-S- Transferase- Assay	Fische, Muscheln, Pflanzen: verschiedene Gewebe	Aktivität der Glutathion-S- Transferase (Substratumsatz)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Habig <i>et al.</i> (1974)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: Deutschmann (2020): Lebergewebe von Bachforellen, Referenzstelle Holtemme: ca. 600 pmol CDNB/min*mg Protein Lebergewebe von Rotaugen, Kontrolle: 131±24,2 pmol CDNB/min*mg Protein Jemec <i>et al.</i> (2008): <i>Daphnia magna</i> : Kontrollen: 67,3-87,3 nmol/min*mg Protein (22 Tage), 108,4 nmol/min*mg Protein (3 Tage), 350 nmol/min*mg Protein (4-5 Tage) Koponen <i>et al.</i> (1997): Lebergewebe von Regenbogenforellen: Kontrollen: 272±43 - 346±80 nmol/min*mg Protein van der Oost <i>et al.</i> (1998): Lebergewebe von Karpfen: Referenzstelle: 0,29±0,05 - 0,49±0,04 µmol/min*mg Protein			kommerzielle Testkits erhältlich	Alter, Geschlecht, Ernährungs-zustand des Tieres und Wasser-temperatur können Einfluss haben	Brain und Cedergreen (2008), Kienle <i>et al.</i> (2015), Lindström-Seppä <i>et al.</i> (2001), VDI (2018)
Glutathionperoxidase- Assay	Fische: Leber- und Nierengewebe; Pflanzen; Muscheln	Aktivität der Glutathion-Peroxidase (NADPH Verbrauch)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Petala <i>et al.</i> (2009)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: van der Oost (1998): Karpfen, Referenzstelle: 0,34±0,05 - 0,45±0,1 U/mg Protein			kommerzielle Testkits erhältlich		Brain und Cedergreen (2008), European Commission (2014), Hanson <i>et al.</i> (2013), Kienle <i>et al.</i> (2015), Lindström-Seppä <i>et al.</i> (2001), Livingstone (2001)
Glutathion-Gehalt	Fische: Leber- und Nierengewebe	Glutathiongehalt (kolorimetrische Messung)	ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Petala <i>et al.</i> (2009)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Kienle <i>et al.</i> (2015), Livingstone (2001)
Glutathionreduktase- Aktivität	Fische, Muscheln, Schnecken, Pflanzen: verschiedene Gewebe	Aktivität der Glutathionreduktase (Substratumsatz)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Carlberg und Mannervik (1975)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle			kommerzielle Testkits erhältlich		Brain und Cedergreen (2008), European Commission (2014), Hanson <i>et al.</i> (2013), Lindström-Seppä <i>et al.</i> (2001), Livingstone (2001)
Häm-Peroxidase Assay	Fische: Leber- und Nierengewebe	Aktivität der Häm-Peroxidase (Substratumsatz)	ABW	Forschung: Brogdon <i>et al.</i> (1997)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle			kommerzielle Testkits erhältlich		Kienle <i>et al.</i> (2015)
Lipidperoxidation	Fische: Ganzkörperhomogenate von Larven; Krebstiere: Ganzkörperhomogenate	Aktivität der Lipidperoxidase (Substratumsatz)	ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Hermes-Lima <i>et al.</i> (1995)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: z.B. Projekt EffPharm (Triebskorn <i>et al.</i> (2017)): Bachforellen-Larven: Laborkontrollen: 4,67 CHP-EQ/mg Referenzstelle: 4,34 CHP-EQ/mg ABW: 3,79 CHP-EQ/mg			kommerzielle Testkits erhältlich		Kienle <i>et al.</i> (2015), European Commission (2014), Triebskorn <i>et al.</i> (2017)
Catalase-Test	Fische, Invertebraten: verschiedene Gewebe	Aktivität der Catalase (Substratumsatz)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Aebi (1985)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: Deutschmann (2020): Lebergewebe von Bchforellen, Referenzstelle Holtemme: ca. 400 µmol/min*mg Protein Jemec <i>et al.</i> (2007): 62,4-84,3 µmol/min*mg Protein (22 Tage), 350 µmol/min*mg Protein (4-5 Tage), 250 µmol/min*mg Protein (6 Tage); van der Oost <i>et al.</i> (1998): Karpfen, Referenzstelle: 16±5 - 52±12 U/mg Protein			kommerzielle Testkits erhältlich		Hanson <i>et al.</i> (2013), Livingstone (2001), Wernersson <i>et al.</i> (2015)
Superoxid-Dismutase Aktivität	Fische, Muscheln, Pflanzen: verschiedene Gewebe	Aktivität der Superoxid-Dismutase (Substratumsatz)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Wdzięczak <i>et al.</i> (1982)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: van der Oost (1998): Karpfen, Referenzstelle: 65±13 - 91±7 U/mg Protein			kommerzielle Testkits erhältlich		European Commission (2014), Hanson <i>et al.</i> (2013), Lindström-Seppä <i>et al.</i> (2001), Livingstone (2001)

Anlage 1 - Tabelle 13: Biotests zur Untersuchung von Reproduktions- und Entwicklungstoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vivo											
<i>Daphnia magna</i> Reproduktionstest	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Fortpflanzung (Anzahl Jungtiere pro Weibchen)	TW, OW, ABW	standardisiert: ISO 10706:2000, OECD 211	Unterschied zu Negativkontrolle; Gültigkeitskriterien: Kontrolle: Mortalität der Elterntiere ≤20%, Überlebensrate Jungtiere ≥60%	robust	aufwendig, 21 Tage				Grummt <i>et al.</i> (2017), LfU, Informationen von L. Bláha
Sediment-Wasser <i>Lumbriculus</i> - Toxizitätstest	Ringelwurm: <i>Lumbriculus variegatus</i>	Fortpflanzung (Biomasse, Anzahl Würmer)	OW, Sediment	standardisiert: OECD 225	Unterschied zu Negativkontrolle; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Projekt SeKT (Höss <i>et al.</i> , 2010): Toxizitätsschwellwert=25% Inhibition (Anzahl Würmer im Vgl. zur Kontrolle) Projekt SchussenAktivplus (Triebskorn, 2017): Anzahl Würmer im Vgl. zur Kontrolle: Schussen, oberhalb KA: -14,8- +16,8% Schussen, unterhalb KA: -29- -5,9% Projekt NiddaMan (Brettschneider <i>et al.</i> , 2019b): Anzahl Würmer: Nidda: 18- 24%, Usa: 29- 32%, Horloff: 11-22%	robust	aufwendig, 28 Tage Testdauer und 14 Tage Vorlauf (Synchronisierung), jedoch geringer Betreuungsaufwand während des Tests	chronischer Test mit endobenthischem Organismus - dadurch Exposition gegenüber sedimentbürtiger Schadstoffe	Testorganismus ist sehr empfindlich bei hohen NH ₄ ⁺ -Konzentrationen (ABW, Sediment)	nein, auch nicht filtrieren	Kienle <i>et al.</i> (2015), Triebskorn (2017), Informationen von J. Oehlmann
Reproduktionstest mit <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Schnecke: <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Fortpflanzung (Anzahl Embryonen pro Weibchen), Mortalität	OW, ABW, Sediment	standardisiert: OECD 242	Unterschied zu Negativkontrolle; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Projekt SchussenAktivplus (Giebner <i>et al.</i> , 2017): Anzahl Embryonen im Vgl. zur Kontrolle: ABW: Nachklärung: -51,2%, Ozon/GAK: -52,6%, Ozon/Sandfiltration: -66,9% OW: Schussen, oberhalb KA: -6,78- +54,4% Schussen, unterhalb dreistufiger KA: +36,7% Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: +3,4% Projekt NiddaMan (Brettschneider <i>et al.</i> , 2019b): Einteilung in Statusklassen (Inhibition der Embryonenproduktion): Gut: ≤20% Mortalität, ≤20%	robust	aufwendig, 28 Tage Testdauer, jedoch geringer Betreuungsaufwand während des Tests	chronischer Test, auch für endokrin wirksame Stoffe sensitiv		nein, auch nicht filtrieren	Giebner <i>et al.</i> (2018), Henneberg <i>et al.</i> (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Triebskorn (2017), Informationen von J. Oehlmann
Fish Embryo Test in Anlehnung an OECD 236	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Mortalität, Schlupfrate, Entwicklungsdefizite, Herzschlagrate	OW, ABW	etabliert, teilweise standardisiert (in Anlehnung an OECD 236): Thellmann <i>et al.</i> (2015)	Unterschied zu Negativkontrolle; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Projekt SchussenAktivplus: Mortalität: Schussen, oberhalb KA: 7,8-13,8% Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 6,1±18% Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 0,4±2,9% Schlupfrate: Schussen, oberhalb KA: 71,4-76,6% Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 91,9±21,9% Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 97,8±6,4%		4 Tage	akute und chronische Toxizitätsparameter, reichlich gesehen kein Tierversuch	Sauerstoffzehrung (ggf. vorher belüften der Probe)		Grummt <i>et al.</i> (2017), Thellmann <i>et al.</i> (2017b), Triebskorn (2017)
Fish Early Life Stage Test	Fisch-Embryonen: oft <i>Danio rerio</i> , aber auch <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Pimephales promelas</i> , <i>Oryzias latipes</i>	Mortalität, Schlupfrate, Entwicklungsdefizite, Herzschlagrate, Verhaltensänderungen	OW, ABW	standardisiert: OECD 210	Unterschied zu Negativkontrolle (siehe OECD-Rahmenbedingungen)	robust	je nach Fischart mehr oder weniger aufwändig (4 Tage bis mehrere Monate)	akute und chronische Toxizitätsparameter, rechtlich gesehen kein Tierversuch	Sauerstoffzehrung (ggf. vorher belüften der Probe)	nein, auch nicht filtrieren	Grummt <i>et al.</i> (2017), Luckenbach <i>et al.</i> (2001), Maier <i>et al.</i> (2015), Triebskorn (2017)
Fortpflanzungstest mit <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Wasserfloh (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	Anzahl Nachkommen, Mortalität	OW	standardisiert: AFNOR 2000 NF T 90-376, ISO 20665:2008.	Unterschied zur Negativkontrolle; Referenzsubstanzen: Natrium-Pentachlorphenolat (C ₆ Cl ₅ ONa), Kupfersulfat (CuSO ₄ ·5H ₂ O), Natriumchlorid (NaCl), oder Zinksulfat (ZnSO ₄)	robust	hoch, 7-8 Tage	kein Tierversuch, Testdauer mit 7-8 Tagen deutlich geringer als Fortpflanzungstest mit <i>Daphnia magna</i> , benötigte Probenvolumina deutlich geringer, Testkit (miniaturisierte Version) verfügbar	extreme pH-Werte, hohe Leitfähigkeit, hohe Sulfatkonzentrationen		Informationen von C. Kienle

Anlage 1 - Tabelle 14: Biotests zur Untersuchung von Phytotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
in vivo											
Algen- und Cyanobakterien-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i> ; Cyanobakterien: <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>Synechococcus leopoliensis</i>	Wachstumshemmung (Trockengewicht, Zellzahl)	OW, ABW	standardisiert: OECD 201	Positivkontrolle: 0,49 mg/L K ₂ Cr ₂ O ₇ ; 20-80% Hemmung (LFU); Vergleich mit Referenzsubstanz Diuron (EC ₅₀ =29 µg/L); EBT-DEQ=0,12 µg DEQ/L (Escher et al., 2018)	robust	3 Tage	einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte	sich absetzende Feststoffe, starke Färbung der Probe	nein	Escher et al. (2018), Grummt et al. (2017), LfU, Informationen von L. Bláha
Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstumshemmung (Zelldichte, optische Dichte)	OW, ABW	standardisiert: DIN EN ISO 8692:2012	Positivkontrolle: 0,49 mg/L K ₂ Cr ₂ O ₇ ; 20-80% Hemmung (LFU)	robust	gering, 3 Tage	einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte	sich absetzende Feststoffe, starke Färbung der Probe	nein	Grummt et al. (2015), Kienle et al. (2015), LUBW, LfU
Algen-Wachstumshemmtest	einzellige Grünalgen: <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstumshemmung (fluorometrische Messung der Biomasse)	OW, ABW	standardisiert: DIN 38412-33:1991	als Ergebnis gilt die geringste Verdünnungsstufe innerhalb eines Testansatzes bei der eine Hemmung ≤20% auftritt; Gültigkeitskriterien: Vermehrungsfaktor ≥30fach und ≤100fach, Positivkontrolle (Kaliumdichromat, 0,5mg/l): ≥20% und ≤80% Hemmung, mittlere Abweichung der Kontrollen ≤7,5% (NLWKN)	robust	hoch, 3 Tage	einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte	sich absetzende Feststoffe, starke Färbung der Probe, extreme pH-Werte	nein	LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, NLWKN
Imaging PAM-Assay	einzellige Grünalgen: <i>Chlorella vulgaris</i>	Hemmung der Photosynthese (Quantenausbeute gemessen mit IPAM-Gerät)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Durand et al. (2009)	Vergleich mit Referenzsubstanz Diuron (EC ₅₀ =16,8 ± 1,5 µg/L); bioassay threshold=0,2 µg DEQ/L (Leusch et al., 2014)		mittel, 4,5 Stunden	einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte		nein	Kienle et al. (2015), Leusch et al. (2014), Schmidt et al. (2017)
kombinierter Algentest	einzellige Grünalgen: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstumshemmung nach 2 und 24 Stunden (kolorimetrische Messung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Glauch et al. (2020)	Vergleich mit Referenzsubstanz Diuron (EC ₅₀ =3,94 µg/L (2 h-Wachstum // 39 µg/L (24h-Wachstum): EBT-DEQ=0,7 µg Diuron-EQ/L (2h) und 0,13 µg Diuron-EQ/L (24h) (Information von B. Escher, Escher et al., 2018)	robust	mittel, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich, 1 Tag	einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte, Erfassung zweier Endpunkte in einem Test, geringes Probenvolumen benötigt	sich absetzende Feststoffe, starke Färbung der Probe, extreme pH-Werte	ja	Kienle et al. (2015), Informationen von B. Escher und C. Kienle
Algentest	einzellige Grünalgen		OW, ABW, Sediment-eluate	noch nicht standardisiert: Entwurf DIN 38412-59				einfach durchführbar, erfasst auch chronische Effekte	sich absetzende Feststoffe, starke Färbung der Probe	nein	LUBW
Algen-Schnelltest	einzellige Grünalgen: <i>Chlorella vulgaris</i>	Hemmung der Photosynthese	OW	etabliert, aber nicht standardisiert		mittel	gering, 1 bis 2 Tage	kurze Expositionsdauer von 15 Minuten	Temperatur, Alter, Licht		HH
Algen-Toximeter (Online Biotest in Online-Messstationen)	einzellige Grünalgen	Hemmung der Photosynthese		etabliert, aber nicht standardisiert		robust	10 Stunden pro Woche	Ausreifung des Systems auf sehr hohem Niveau	Temperatur		HH
<i>Lemna</i> sp. Wachstumshemmtest	Pflanzen: <i>Lemna</i> sp.	Wachstumshemmung (Fron-Anzahl, Trockengewicht, Nassgewicht)	OW, ABW	standardisiert: OECD 221 DIN EN ISO 20079	Vergleich mit Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol (EC ₅₀ (Fronanzahl)= 2,2-3,8 mg/L) und/oder Kaliumchlorid (EC ₅₀ (Fronanzahl)=5,5-10 g/L);	robust	gering, 7 Tage	einfach durchführbar		nein	Grummt et al. (2017), Kienle et al. (2015), Triebskorn (2017)
Wasser-Sediment <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxizitätstest	Pflanzen: <i>Myriophyllum spicatum</i>	Wachstumshemmung (Sprosslänge, Trockengewicht, Nassgewicht)	OW, ABW, Sediment	standardisiert: OECD 239	Unterschied zu Negativkontrolle		14 Tage	einfach durchführbar		nein	Kienle et al. (2015), Samecka-Cymerman et al. (2004)
Sediment-freier <i>Myriophyllum spicatum</i> Toxizitätstest	Pflanzen: <i>Myriophyllum spicatum</i>	Wachstumshemmung (Sprosslänge, Trockengewicht, Nassgewicht)	OW, ABW	standardisiert: OECD 238	Unterschied zu Negativkontrolle		14 Tage	einfach durchführbar		nein	Samecka-Cymerman et al. (2004)
<i>Myriophyllum</i> Toxizitätstest	Pflanzen: <i>Myriophyllum aquaticum</i>	Wachstumshemmung (Nassgewicht)	Sediment	standardisiert: DIN ISO 16191:2013	Unterschied zu Negativkontrolle		10 Tage	einfach durchführbar		nein	LUBW

Anlage 1 - Tabelle 15: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Phytotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Chlorophyll-Gehalt	verschiedene Pflanzen	Chlorophyll-Gehalt (spektrophotometrische Messung)	OW, ABW	Forschung: Porra <i>et al.</i> (1989)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Brain und Cedergreen (2008), Grummt <i>et al.</i> (2017), Hertemann <i>et al.</i> (2011)
Chalkon-Synthase Induktion	verschiedene Pflanzen	Gehalt an Chalkon-Synthase	OW	Forschung: Babu <i>et al.</i> (2003)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Brain und Cedergreen (2008)
Carotinoid-Gehalt	verschiedene Pflanzen	Carotinoid-Gehalt (spektrophotometrische Messung)	OW, ABW	Forschung: Porra <i>et al.</i> (1989)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Brain und Cedergreen (2008)
Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung	verschiedene Pflanzen	Induktion von Chlorophyll-a-Fluoreszenz (Veränderung der Fluoreszenz in dunkel-adaptierten Blättern)	OW, ABW	Forschung: Oxborough (2004)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Brain und Cedergreen (2008)

Anlage 1 - Tabelle 16: Biotests zur Untersuchung von Zytotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
CellTiter-Glo® 2.0	etablierte Zelllinie: HepG2 (Mensch)	Zellviabilität (ATP-Produktion metabolisch aktiver Zellen)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: SOP vorhanden	Unterschied zu Negativkontrolle: positives Testresultat, wenn ATP-Konzentration < 80% der Negativkontrolle (UBA)	robust	simpel, 3 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich			UBA
pBS	Bakterien: <i>Bacillus subtilis</i>	Zellviabilität	TW	etabliert, aber nicht standardisiert: Weiss <i>et al.</i> (2017)	Unterschied zu Negativkontrolle	mittel	2 Tage				LW
MTT Assay	etablierte Zelllinien: RTL-W1 (Fisch) oder primäre Hepatozyten (Fisch)	Zellviabilität (kolorimetrische Messung der metabolischen Aktivität)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Mosmann (1983)	Unterschied zu Negativkontrolle		mittel, 1 Tag	kommerzielle Testkits erhältlich			Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015)
PrestoBlue Assay	verschiedene etablierte Säugetier-Zelllinien	Zellviabilität (mikroskopische Auswertung)	OW	etabliert, aber nicht standardisiert: Escher <i>et al.</i> (2019)	Unterschied zu Negativkontrolle	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
ToxScreen	Bakterien: <i>Photobacterium leiognathi</i>	Hemmung der Lumineszenz (Störung der ATP-Bildung)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Ulitzur <i>et al.</i> (2002)	Unterschied zu Negativkontrolle		1 Stunde	sensitiver als Microtox-Test			Kienle <i>et al.</i> (2015)
Leuchtbakterientest	Bakterien: <i>Vibrio fischeri</i>	Hemmung der Lumineszenz (Störung der ATP-Bildung)	OW, ABW	standardisiert: DIN EN ISO 11348-1:2008, DIN EN ISO 11348-2:2008 & DIN EN ISO 11348-3:2008, pAF: etabliert, aber nicht standardisiert: Weiss <i>et al.</i> (2017)	Vergleich mit Referenzsubstanz (<i>virtual baseline toxicant</i> , EC ₅₀ =12300 µg/L); EBT-Baseline-TEQ=1264 µg/L (Escher <i>et al.</i> , 2018); als Ergebnis gilt die geringste Verdünnungsstufe innerhalb eines Testansatzes bei der Hemmung ≤ 20%; Gültigkeitskriterien: Vermehrungsfaktor: ≥30fach bis ≤100fach, Hemmung der Positivkontrolle (Kaliumdichromat, 0,5 mg/L): ≥20% bis ≤80%, mittlere Abweichung der Kontrollen ≤7,5% (NLWKN) Positivkontrolle: Kaliumdichromat (4 mg/L Cr(VI)): 20-80% Hemmung (LfU)	mittel bis robust	mittel, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich, 30 Minuten bis 2 Stunden	reproduzierbar wie ein chemisches Analysenverfahren	extreme pH-Werte, Meerwasser, gefärbte Proben, Temperatur		Grummt <i>et al.</i> (2017), Kienle <i>et al.</i> (2015), HH, LfU, LHW Sachsen-Anhalt, LUBW, LW, NLWKN, Schmidt <i>et al.</i> (2017), Informationen von B. Escher
Laktatdehydrogenase-Assay	CHO (Hamster)	Zellviabilität (Membranintegrität)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Kumar <i>et al.</i> (2018)	Unterschied zu Negativkontrolle			kommerzielle Testkits erhältlich			LANUV
XTT-Assay	CHO (Hamster), L929 (Maus)	Zellviabilität (mitochondriale Aktivität)	OW, ABW	standardisiert: ISO 10993-5:2009	Unterschied zu Negativkontrolle			kommerzielle Testkits erhältlich			LANUV

Anlage 1 - Tabelle 17: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Gewebetoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Histopathologische Veränderungen in der Kieme	Fische: Kiemengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	etabliert, aber noch nicht standardisiert: Triebskorn <i>et al.</i> (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle		sehr aufwendig, mehrere Tage	sensitiv, erfasst chronische Wirkungen	Gefahr einer subjektiven Interpretation und Bewertung der Befunde, Handling und Wassertemperatur können Ergebnis beeinflussen	Grummt <i>et al.</i> (2017), Triebskorn (2017), Wilhelm <i>et al.</i> (2017), VDI (2018)
Histopathologische Veränderungen in der Leber	Fische: Lebergewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	etabliert, aber noch nicht standardisiert: Triebskorn <i>et al.</i> (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle		sehr aufwendig, mehrere Tage	sensitiv, erfasst chronische Wirkungen	Gefahr einer subjektiven Interpretation und Bewertung der Befunde, Ernährungszustand des Tieres kann Ergebnis beeinflussen	Grummt <i>et al.</i> (2017), Triebskorn (2017), Wilhelm <i>et al.</i> (2017), VDI (2018)
Histopathologische Veränderungen in der Niere	Fische: Nierengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	etabliert, aber noch nicht standardisiert: Triebskorn <i>et al.</i> (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle		sehr aufwendig, mehrere Tage	sensitiv, erfasst chronische Wirkungen	Gefahr einer subjektiven Interpretation und Bewertung der Befunde	European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Triebskorn (2017), Wilhelm <i>et al.</i> (2017), VDI (2018)
Histopathologische Veränderungen in der Gonaden	Fische: Gonadengewebe	Gewebeintegrität (Reaktionen und destruktive Veränderungen im Gewebe)	ABW, OW	etabliert, aber noch nicht standardisiert: OECD (2010)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle		sehr aufwendig, mehrere Tage	sensitiv, erfasst chronische Wirkungen	Gefahr einer subjektiven Interpretation und Bewertung der Befunde, Alter des Tieres kann Ergebnis beeinflussen	VDI (2018)

Anlage 1 - Tabelle 18: Biotests zur Untersuchung allgemeiner/unspezifischer Toxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
Daphnia magna Akuttest	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	OW, ABW	standardisiert: DIN EN ISO 6341:2013, OECD 202	Positivkontrolle: K ₂ Cr ₂ O ₇ ; EC ₅₀ =0,6-2,1 mg/L (LfU) Vergleich mit Referenzsubstanz Chlorpyrifos (EC ₅₀ =553 ng/L); EBT-Chlorpyrifos-EQ=15 ng Chlorpyrifos-EQ/L (Escher <i>et al.</i> , 2018))	mittel bis robust	1 bis 2 Tage	einfach durchführbar	extreme pH-Werte, Sauerstoffzehrung	nein	LfU, NLWKN, Schmidt <i>et al.</i> (2017), Informationen von L. Bláha
Daphnientest (Verdünnungsstufen)	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Immobilisierung	ABW	standardisiert: DIN 38412-30:1989	kleinste Verdünnungsstufe angegeben, bei der mindestens 90% der Daphnien ihre Schwimmfähigkeit beibehalten; Negativkontrolle: ≤ 10% Immobilisierung (NLWKN)	mittel	hoch; 1 Tag	einfach durchführbar	extreme pH-Werte, Sauerstoffzehrung, Temperatur	nein	HH, LHW Sachsen-Anhalt, LUBW
Daphnientoximeter (Online Biotest in Online Messstationen)	Krebstiere: <i>Daphnia magna</i>	Verhaltensänderungen		etabliert, aber nicht standardisiert		robust	10 Stunden pro Woche	Ausreifung des Systems auf sehr hohem Niveau	Trübung, Erschütterungen		HH
Fish Acute Embryo Test	Fisch-Embryonen: <i>Danio rerio</i>	Mortalität, Entwicklungsdefizite	OW, ABW	standardisiert: DIN EN ISO 15088:2008, OECD 236	Negativkontrolle: Effekt < 10% (NLWKN), Positivkontrolle: 3,4-Dichloranilin (3,7 mg/L): >20 % Sterblichkeit (LfU), Effekt >10% (NLWKN) Vergleich mit Referenzsubstanz Bisphenol A: EBT-BPA-EQ=276 µg/L (Mortalität nach 48h) und 183 µg/L (Mortalität nach 96/120h) (Escher <i>et al.</i> , 2018)	robust	hoch; 2 Tage	sensitiv, rechtlich gesehen kein Tierversuch	extreme pH-Werte, hohe Leitfähigkeit, Temperatur	nein	HH, LfU, LHW Sachsen-Anhalt, NLWKN, Schmidt <i>et al.</i> (2017), Informationen von L. Bláha und C. Kienle
Chronischer Fischtest unter Berücksichtigung der CRED-Kriterien	Fische: je nach Fragestellung unterschiedliche Lebensstadien	Hämatologie, klinische Chemie, Biomarker, Histopathologie qualitativ, semiquantitativ, Quantitativ (Stereoogie)	OW	Forschung: Moermond <i>et al.</i> (2016)	Unterschied zu Negativkontrolle: Hämatokrit: 35%; Hämoglobin: 8 g/dL; Erythrozytenzahl: 1 Mill./µl; Leukozytenzahl: 34.000/ml; Differentialblutbild: Lymphozyten: 84,1%, Heterophile Granulozyten (stabkernig): 5,5%, Heterophile Granulozyten (segmentkernig): 11,5% (in der Regel keine basophilen oder eosinophilen Granulozyten), Triglyceride: 153 mg/dL; Bilirubin: 1,36 mg/dL; Kreatinin: 0,33 mg/dL; Glucose: 173 mg/dL; Calcium: 2,33 mg/dL; Cholesterin: 159 mg/dL; Gesamtprotein: 1,6 mg/dL; Harnstoff: 3,06 mg/dL; GPT: 9,8 U/L; GOT: 137,08 U/L; AP: 205 U/L; γ-GT: 4,8 U/L; LDH: 918 U/L (LfU)	robust	Testverläufe über 28 Tage bis 3 Monate				LfU
Peroxisome proliferator activated receptor assay	etablierte Zelllinie: PPAR α -UAS- <i>bla</i> HEK293H Zellen (Mensch)	Induktion eines Reportergens für Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Escher <i>et al.</i> (2014)	Vergleich mit Referenzsubstanz Rosiglitazon (EC ₁₀ =353,8 ng/L); EBT-Rosiglitazon-EQ=1,2 µg Rosiglitazon-EQ/L (Information von B. Escher, Escher <i>et al.</i> , 2021)	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
Retinoic acid receptor activity assay	etablierte Zelllinie: RAR α -UAS- <i>bla</i> HEK293T Zellen (Mensch)	Induktion eines Reportergens für den Retinsäure-Rezeptor (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Escher <i>et al.</i> (2014)	Vergleich mit Referenzsubstanz	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
Retinoic X receptor activity assay	etablierte Zelllinie: RXR α -UAS- <i>bla</i> HEK293T Zellen (Mensch)	Induktion eines Reportergens für den Retinoid-X-Rezeptor (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Escher <i>et al.</i> (2014)	Vergleich mit Referenzsubstanz	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
Hypoxie	etablierte Zelllinie: HRE- <i>bla</i> ME-180 (Mensch)	Induktion von hypoxia response elements	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert	Vergleich mit Referenzsubstanz	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
Entzündungsreaktionen	etablierte Zelllinie: NF κ - <i>bla</i> THP-1 (Mensch)	Induktion eines Reportergens für den NF κ -B (Fluoreszens)	TW, OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Neale <i>et al.</i> (2018)	Vergleich mit Referenzsubstanz	robust	gering, roboterfähig/ Hochdurchsatz-Screening möglich	kommerzielle Testkits erhältlich		ja	Informationen von B. Escher
Akuter Chironomidentest	Zuckmückenlarven: <i>Chironomus riparius</i> (bevorzugt), aber auch <i>C.dilutus</i> , <i>C.yoshimatsui</i>	Immobilisierung	OW, ABW	standardisiert: OECD 235	Unterschied zu Negativkontrolle (siehe OECD-Rahmenbedingungen)	robust	mittel; 2 Tage		extreme pH-Werte, Sauerstoffzehrung, Temperaturschwankungen	nein	Kienle <i>et al.</i> (2015), Informationen von L. Bláha

Anlage 1 - Tabelle 18: Fortsetzung

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
Chronischer Chironomidentest	Zuckmückenlarven: <i>Chironomus riparius</i> (bevorzugt), aber auch <i>C.dilutus</i> , <i>C.yoshimatsui</i>	Larven: Mortalität, Wachstum; Adulte: Zeit bis zum Schlupf, Anzahl geschlüpfte Tiere	OW, ABW, Sediment	standardisiert: OECD 218 und 219	Unterschied zu Negativkontrolle (siehe OECD-Rahmenbedingungen)	robust	hoch; 28 Tage (<i>C. riparius</i> , <i>C.yoshimatsui</i>) 65 Tage (<i>C.dilutus</i>)		extreme pH-Werte, Sauerstoffzehrung, Temperaturschwankungen	nein	Kienle et al. (2015)
Chironomiden Life-Cycle Toxizitätstest	Zuckmückenlarven: <i>Chironomus riparius</i> (bevorzugt), aber auch <i>C.dilutus</i> , <i>C.yoshimatsui</i>	Larven: Mortalität, Wachstum; Adulte: Zeit bis zum Schlupf, Anzahl geschlüpfte Tiere, Geschlechterverhältnis, Fertilität, Fekundität	OW, ABW, Sediment	standardisiert: OECD 233	Unterschied zu Negativkontrolle (siehe OECD-Rahmenbedingungen)	robust	hoch; mehrere Wochen		extreme pH-Werte, Sauerstoffzehrung, Temperaturschwankungen	nein	Informationen von L. Bláha

Anlage 1 - Tabelle 19: Biomarkeranalysen zur Untersuchung allgemeiner/unspezifischer Toxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Medizinisch-toxikologische Untersuchungen	Fische: Blut, Gewebeproben	Hämatologie, klinische Chemie, Histopathologie qualitativ, semiquantitativ, quantitativ (Stereologie)		etabliert, aber nicht standardisiert: Fiedler et al. (2020)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle	robust	Klinische Chemie: 2 Stunden; Biomarker: 2 Tage			LfU

Anlage 1 - Tabelle 20: Biotests zur Untersuchung von Immunotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Anreicherung der Proben notwendig?	Referenzen
Wachstumsassay mit Lymphozyten	Milzzellen (Maus)	Zellproliferation (Szintillationsmessung)	OW, ABW	Forschung: Kontana et al. (2009)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle		3 Tage				Kienle et al. (2015)
Interleukin-1 (IL-1) Aktivitätsassay	Thymozytenzellen (Ratte)	Zellproliferation (Szintillationsmessung)	OW, ABW	Forschung: Kontana et al. (2009)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Kontana et al. (2009): ABW: Nachklärung: 185,8±10% Ozon/GAK: 121,1±27,8		3 Tage				Kienle et al. (2015)
Interleukin-2 (IL-2) Aktivitätsassay	Milzzellen (Maus)	Zellproliferation (Szintillationsmessung)	OW, ABW	Forschung: Kontana et al. (2009)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten, z.B. Kontana et al. (2009): ABW: Nachklärung: 99,4±1,9% Ozon/GAK: 95,3±10,1		3 Tage				Kienle et al. (2015)

Anlage 1 - Tabelle 21: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Immunotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Expression von immunspezifischen Genen	Fische: verschiedene Gewebe (z.B. Milz, Niere)	Genexpression	OW	Forschung: Nakayama et al. (2008), Eder et al. (2008)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle			schnelles Screening-Tool		Rehberger et al. (2017), Segner et al. (2012)
Immunoglobulin-Level	Fische: Nieren- und Lebergewebe, Blut	Gehalt an Immunoglobulinen	OW	Forschung: Siwicki et al. (1993), Binuramesh et al. (2011)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Rehberger et al. (2017), Segner et al. (2012)
Phagozytoseaktivität	Fische, Amphibien: Leukozyten	Phagozytoseaktivität	OW, ABW	Forschung: Li et al. (2006)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Köllner et al. (2002), Rehberger et al. (2017), Segner et al. (2012)
Lysozyme Aktivität	Fische: Blut	Lysozymaktivität	OW	Forschung: Binuramesh et al. (2011)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Rehberger et al. (2017), Segner et al. (2012)
Respiratory Burst Aktivität	Fische: Nierengewebe	Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Phagozytose		Forschung: Karrow et al. (1999)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle					Köllner et al. (2002), Rehberger et al. (2017), Segner et al. (2012)

Anlage 1 - Tabelle 22: Biomarkeranalysen zur Untersuchung von Proteotoxizität

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Stressproteingehalt (Hsp70)	Fische: Kiemen-, Leber- und Nierengewebe; Kriebstiere: Ganzkörperhomogenate	Induktion oder Hemmung der Hsp70 Produktion (Hsp70 Level relativ zu einem Standard)	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Köhler <i>et al.</i> (2001), Peschke <i>et al.</i> (2014)	Unterschied zu Negativkontrolle/Referenzstelle; z.B. Projekt SchussenAktivplus: (Tribskorn (2017), Wilhelm <i>et al.</i> (2017), relativer hsp70 Gehalt): Regenbogenforellen (1,5-jährig): Kontrollen: 1,6±0,3 - 2,0±0,4 (Leber), 2,3±0,7 (Niere), 1,5±0,3 - 1,9±0,5 (Kieme) Argen: 1,6±0,4 - 1,7±0,4 (Leber), 2,4±0,9 - 2,8±0,5 (Niere), 1,8±0,5 - 1,9±0,3 (Kieme) direkt unterhalb 3-stufiger KA: 1,4±0,3 (Leber), 2,1±0,4 (Niere), 1,5±0,4 (Kieme) direkt unterhalb KA mit Aktivkohle: 1,6±0,4 (Leber), 2,4±0,8 (Niere), 1,9±0,6 (Kieme) Bachforellen (1,5-jährig) Kontrollen: 1,6±0,4 - 1,6±0,5 (Leber), 2,0±0,4 - 2,4±0,7 (Niere), 1,5±0,4 - 1,6±0,4 (Kieme) Argen: 1,5±0,2 - 1,7±0,4 (Leber), 2,3±0,1 - 2,4±0,7 (Niere), 1,4±0,1 - 1,5±0,5 (Kieme) Schussen, unterhalb dreistufiger KA: 1,5±0,2 (Leber), 2,5±0,3 (Niere), 1,7±0,4 (Kieme) Schussen, unterhalb KA mit Aktivkohle: 1,5±0,5 (Leber), 2,2±0,9 (Niere), 1,4±0,4 (Kieme)	robust	1 bis 2 Tage		Pathogene; Alter des Tieres und Wassertemperatur können Ergebnis beeinflussen; jahreszeitliche Unterschiede (Reproduktionszeit)	Brain und Cedergreen (2008), European Commission (2014), Grummt <i>et al.</i> (2017), Peschke <i>et al.</i> (2019), Wilhelm <i>et al.</i> (2017), Tribskorn <i>et al.</i> (2002), Tribskorn <i>et al.</i> (2017)
Fish HSP70-Assay	Fische: Blut, verschiedene Gewebe	Induktion oder Hemmung der Hsp70 Produktion	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: Fish heat shock protein 70 (HSP-70) ELISA kit manual (Cusabio Technology, LLC, USA)	LfU: HSP70 = 67,73 pg/mL - 570,9 pg/mL (Cusabio)		1 bis 2 Tage	kommerzielle Testkits erhältlich	Pathogene; Alter des Tieres und Wassertemperatur können Ergebnis beeinflussen; jahreszeitliche Unterschiede (Reproduktionszeit)	Celi <i>et al.</i> (2016), LfU

Anlage 1 - Tabelle 23: Biomarkeranalysen zur Untersuchung der Wirkung von Metallen eingesetzt werden

Testname	Testmaterial	Endpunkt (gemessener Parameter)	mögliche Testmatrix	Etablierungsstatus & Methodenbeschreibung	Referenzwert/ Bewertung	Robustheit	Aufwand (Zeit/Personal)	Vorteile	Störfaktoren	Referenzen
Metallothioneine	Fische: Leber; Muscheln: ganze Tiere, Kiemen	Metallothioneininduktion	OW, ABW	etabliert, aber nicht standardisiert: OSPAR Commission (2007)	Unterschied zu Negativkontrolle/ Referenzstelle; Vergleich mit Literaturwerten: siehe Review von Amiard <i>et al.</i> (2006) für Invertebraten			spezifisch	Alter, Geschlecht der untersuchten Tiere	European Commission (2014), Kienle <i>et al.</i> (2015), VDI (2018)