

# Schlussbericht

---

zu IGF-Vorhaben Nr. 19761 N

## Thema

Untersuchung zur Eignung des Wasserlinsen-Tests als Überwachungsparameter in der Matrix Papierfabriksabwasser

## Berichtszeitraum

01.01.2018 – 31.12.2020

## Forschungsvereinigung

Kuratorium für Forschung und Technik der Zellstoff- und Papierindustrie im VDP e.V.

## Forschungseinrichtung

Technische Universität Darmstadt, Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik

Darmstadt, 14.04.2021

Pegah Aziziyan, Antje Kersten

---

Ort, Datum

---

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der  
Forschungseinrichtung

*P. Aziziyan* *A. Kersten*

Gefördert durch:



Technische Universität Darmstadt  
Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik  
Prof. Dr.-Ing. Samuel Schabel  
Alexanderstr. 8  
64283 Darmstadt  
Telefon: 06151 / 16 22580  
Telefax: 06151 / 16 22581

## Zusammenfassung

Ein erfolgversprechender Ansatz zur Bewertung der Gesamtoxizität von Abwasser ist die Verwendung von Spezies, welche die verschiedenen trophischen Stufen repräsentieren. Die Wasserlinsen *Lemna minor* sind aufgrund ihrer hohen Vermehrungsraten, ihrer Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen und ihrer Bedeutung für das aquatische Nahrungsnetz eine der am häufigsten verwendeten Wasserpflanzen bei Toxizitätstestverfahren zur Prüfung verschiedener anorganischer und organischer Chemikalien und ihrer Mischungen in wässrigen Lösungen.

Im Zeitraum von 2012 bis 2014 wurden zwei verschiedene Studien durchgeführt, um Abwasser verschiedener Papierfabriken mit dem Wasserlinsen-Test zu untersuchen. Bei diesen Forschungsarbeiten wurden folgende Probleme identifiziert:

- Schlechte Reproduzierbarkeit von Testergebnissen mit ein- und derselben Wasserprobe, selbst im gleichen Labor und bestimmt durch dasselbe Laborpersonal,
- Schlechte Vergleichbarkeit der Testergebnisse bei Untersuchungen in verschiedenen Labors,
- Nicht nachvollziehbare erhöhte Toxizitätswerte von Abwasserproben aus grafischen Papierfabriken mit Deinkingverfahren.

Das Ziel dieses Projektes ist es, die Eignung des Wasserlinsen-Tests zur Bestimmung der phytotoxischen Effekte von Papierfabriksabwässern zu untersuchen. Darüber hinaus sollen die Unterschiede der Testergebnisse hinsichtlich der Verdünnungsstufen ( $G_w$ ) für verschiedene Papierfabriken und verschiedene Abwassertechniken ermittelt und beschrieben werden. Dafür müssen alle Parameter, die das Ergebnis des Wasserlinsen-Tests beeinflussen, quantifiziert werden. Zu diesen Parametern gehören die Probenvorbereitungsmethode, der Einfluss von Konservierungszeit und -temperatur auf die Wachstumsrate von *Lemna minor*, die Abwasserparameter (CSB, abfiltrierbare Stoffe AFS, AOX und etc.).

Nach Untersuchung der Endabläufe von drei Papierfabriken mit anaerob-aerober und aerob-aerober ARA wurde festgestellt, dass die Probenvorbereitungsmethode und die Lagerungsbedingungen den  $G_w$ -Wert deutlich erhöhen können. Deshalb wurde ein Pflichtenheft für die zukünftige Wasserlinsen-Testdurchführung mit folgenden Bedingungen erstellt:

- Die Proben müssen nach der Entnahme entweder direkt analysiert oder sofort eingefroren werden.
- Die gefrorene Abwasserprobe kann bis zu zwei Wochen im Tiefkühlschrank gelagert werden.
- Da ein Einfrieren der Probe zur einer Erhöhung der abfiltrierbaren Stoffe (AFS) führt, muss die Probe nach dem Auftauen per Schwarzbandfilter filtriert werden.
- Der pH-Wert der Proben sowie der Kontrolle und Referenzansätze sollte auf 5,5 eingestellt werden.
- Auf Basis der ermittelten NOEC in den untersuchten Abwasserproben wird eine Testdurchführung mit vier Verdünnungsstufen (V1, V2, V4, V8) empfohlen.

Für die ARA-Zuläufe und die teilgereinigten Abwässer ergeben sich höhere Werte für den CSB, den AOX und die Trübung. Diese höheren Belastungen dieser Abwässer sind mit höheren Wachstumshemmungen verbunden. Ob einer dieser Faktoren oder ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für die höhere Wachstumshemmung verantwortlich ist, konnte in diesem Projekt nicht geklärt werden.

Der Wasserlinsen-Test wurde unter den definierten Randbedingungen des Pflichtenheftes in demselben Labor dreimal wiederholt und damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für 7 verschiedene Papierfabriken quantifiziert. Im Laufe dieser Untersuchung zeigten 6 von 7 untersuchten Proben aus dem Ablauf der Nachklärung der Papierfabriken einen  $G_w$ -Wert von 1 oder 2. Die innerhalb der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen bestimmten  $G_w$ -Werte entsprechen denen einer unbedenklichen Abwasserprobe. Allerdings wurden bei Laborvergleichsuntersuchungen zwischen drei verschiedenen Labors Abweichungen festgestellt. Diese können durch unterschiedliche Bildanalyzesysteme in den Laboratorien sowie ungeeignete Lagerungsbedingungen der Abwasserproben vor dem Test entstanden sein, da die Bedingungen des Pflichtenheftes nicht in vollem Umfang von allen Labors eingehalten wurden.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung .....	1
1.1 Ausgangssituation.....	1
1.2 Stand der Forschung und Entwicklung.....	2
1.2.1 Anforderungen an die Beschaffenheit von Papierfabriksabwässern .....	2
1.2.2 Aquatoxikologische Wirkungen von Zellstoff- und Papierfabriksabwässern .....	2
1.2.3 Untersuchungen mittels Wasserlinsen-Wachstumshemmtest .....	4
1.2.4 Forschungsprojekte zu Untersuchungen von Papierfabriksabwässern mittels Wasserlinsen-Wachstumshemmtest .....	7
1.3 Arbeitshypothese .....	9
2 Forschungsziel und Lösungsweg .....	10
2.1 Forschungsziel.....	10
2.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels .....	10
2.2.1 Arbeitspaket 1: Etablierung des Lemna-Tests .....	10
2.2.2 Arbeitspaket 2: Untersuchung zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenheftes für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern .....	11
2.2.3 Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken.....	12
2.2.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung.....	14
2.2.5 Arbeitspaket 5: Berichterstattung .....	14
2.3 Personaleinsatz .....	15
3 Geräte, Materialien und Prüfmethode .....	16
3.1 Gerätschaften .....	16
3.2 Wasserlinsen-Kultur .....	17
3.3 Das modifizierte Steinberg-Nährmedium .....	18
3.4 DIN-Norm zur Durchführung des Wasserlinsentests .....	19
4 Versuchsdurchführung .....	20
4.1 Arbeitspaket 1: Etablierung Lemna-Test.....	20
4.1.1 Bildanalyse zur Bestimmung der Wachstumsrate der Wasserlinsen .....	21
4.1.2 Auswertung der Ergebnisse .....	22

4.2	Arbeitspaket 2: Untersuchungen zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenheftes für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern.....	23
4.3	Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken.....	26
4.4	Arbeitspaket 4: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung .....	29
5	Ergebnisse und Diskussion .....	32
5.1	Arbeitspaket 1: Etablierung des Lemna-Tests .....	32
5.2	Arbeitspaket 2: Untersuchung zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenheftes für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern.....	37
5.2.1	pH-Wert .....	38
5.2.2	Temperatur .....	40
5.2.3	Probenvorbereitungsmethode.....	43
5.2.4	Anzahl der Verdünnungsstufen.....	47
5.2.5	Abwasserparameter.....	49
5.2.6	Erstellung des Pflichtenhefts.....	50
5.3	Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken.....	52
5.3.1	Untersuchung der Papierfabriken .....	52
5.3.2	Einfluss der Abwasserparameter auf das Testergebnis.....	57
5.3.2.1	CSB.....	57
5.3.2.2	AOX.....	59
5.3.2.3	Trübung.....	61
5.3.2.4	Stickstoff- und Phosphorgehalt.....	62
5.3.2.5	Oberflächenspannung.....	64
5.3.2.6	Zusammenfassung des Einflusses der Abwasserparameter auf das Testergebnis.....	64
5.3.3	Fischei-Test .....	66
5.4	Arbeitspaket 4: Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung .....	67
5.4.1	Reproduzierbarkeitsuntersuchung am PMV .....	67
5.4.2	Laborvergleichsuntersuchung.....	68
6	Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU) .....	71
6.1	Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse .....	71
6.2	Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit.....	71
6.3	Aussagen zur voraussichtlichen Umsetzung der FuE-Ergebnisse.....	72

---

7 Ergebnistransfer .....	73
8 Danksagung .....	76
Literaturverzeichnis .....	77
Anhang.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

AbwV	Abwasserverordnung
AFS	Abfiltrierbare Stoffe
AG	Arbeitsgruppe
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen
AOX	Adsorbierbare organisch gebundene Halogene
AP	Arbeitspaket
ARA	Abwasserreinigungsanlage
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BSB <sub>5</sub>	Biochemischer Sauerstoffbedarf
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
EC <sub>x</sub>	Konzentration einer Untersuchungsprobe, bei der im Vergleich zur Kontrolle eine Wachstumshemmung von x % ermittelt wurde
End	Endablauf
FSt	Forschungsstelle
G <sub>w(_X)</sub>	Höchstkonzentrierte Verdünnung bei der eine kritische Wachstumshemmung noch nicht überschritten wird. Verwendet beim Wasserlinsentest (basierend auf Beobachtungsparameter X mit X = Frondanzahl Z oder Frondfläche F)
G <sub>Ei</sub>	Höchstkonzentrierte Verdünnung bei der eine kritische Wachstumshemmung noch nicht überschritten wird. Verwendet beim Fischei-Test
i <sub>r_X</sub>	Prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsrate r des Beobachtungsparameters X (X = Frondanzahl Z oder Frondfläche F)
LID-Wert	Höchstkonzentrierte, vordefinierte Verdünnungsstufe, bei der die Wachstumshemmung 10 % nicht überschreitet
N <sub>ges</sub>	Stickstoff gesamt
NOEC	Niedrigste Verdünnungsstufe ohne toxische Wirkung (No Observed Effect Concentration)
PBA	Projektbegleitender Ausschuss
PF	Papierfabrik
P <sub>ges</sub>	Phosphor gesamt
PMV	Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik

---

PN	Probenahme
PTS	Papiertechnische Stiftung
TN <sub>b</sub>	Total Nitrogen bound
TOC	Total Organic Carbon
UBA	Umweltbundesamt
V(x)	Verdünnungsstufe (x = Verhältnis)
VDP	Verband Deutscher Papierfabriken e. V.
Zu 1. (2.)	Zulauf 1. (2.) biologische Reinigungsstufe

# 1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

## 1.1 Ausgangssituation

Die Abwasserqualität bei der Herstellung von Papier und Pappe wird durch verschiedene EU-weite und nationale Gesetze und Verordnungen reguliert und das Gefährdungspotential für Mensch und Umwelt begrenzt. Dies wird im Anhang 28 „Herstellung von Papier und Pappe“ [1] berücksichtigt. Daneben gewinnen biologische Wirkungstests zur Beurteilung der Toxizität des Abwassers immer stärker an Bedeutung. Nach Auswertung eines im Zeitraum von 2006 bis 2008 vom Umweltbundesamt (UBA) unterstützten Vorhabens [2, 3], wurde der „Wasserlinsen-Test“ auch für die Abwässer der Papierherstellung als Beurteilungskriterium vorgeschlagen [4]. Im Rahmen der Überarbeitung des Anhangs 28 der AbwV wurde die Aufnahme des Wasserlinsentests stark diskutiert, letztlich aber nicht in den Anhang aufgenommen. Inwieweit dieser biologische Wirkungstest in einer späteren Revision des Anhangs 28 eine Rolle spielt, bleibt abzuwarten.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von Biotests zur Überwachung der Abwasserqualität sind wissenschaftliche Erkenntnisse zur Feststellung der Eignung des Wasserlinsen-Tests für Papierfabriksabwässer notwendig und von großer Bedeutung. Im Zeitraum von 2012 bis 2014 wurden zwei Studien zu Untersuchungen des Wasserlinsen-Tests im Auslauf der Abwasserbehandlungsanlage von Papierfabriken durchgeführt [5, 6]. Dabei traten unter anderem folgende Probleme auf:

- Schlechte Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse ein und derselben Wasserprobe selbst bei der gleichen Untersuchungsstelle,
- Unzureichende Vergleichbarkeit der Testergebnisse bei der Untersuchung in verschiedenen Laboratorien,
- Nicht nachvollziehbare erhöhte Toxizitäten bei Abwasserproben graphischer Papierfabriken und anderen Papierfabriken mit Deinkinganlagen

Um die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten, muss die Probenahme, Probenvorbereitung und Durchführung des Tests für die Matrix Papierfabriksabwasser unbedingt standardisiert werden.

## 1.2 Stand der Forschung und Entwicklung

### 1.2.1 Anforderungen an die Beschaffenheit von Papierfabriksabwässern

In dem für die Papier- und Pappeherstellung aktuell gültigen Anhang 28 der Abwasserverordnung AbwV [1] sind für folgende Parameter Anforderungen formuliert: abfiltrierbare Stoffe (AFS), biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen (BSB<sub>5</sub>), Stickstoff gesamt (N<sub>ges</sub>) als Summe von Ammonium-, Nitrit- und Nitratstickstoff, Gesamter gebundener Stickstoff (TN<sub>b</sub>), Phosphor gesamt (P<sub>ges</sub>), chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), Organisch gebundener Kohlenstoff gesamt (TOC) und adsorbierbare organische Halogenverbindungen (AOX). Des Weiteren wird in allen Fällen durch die lokalen Genehmigungsbehörden die Abwassertemperatur T<sub>Abw</sub> und der pH-Wert begrenzt. Letztere sind zwar nicht im Anhang 28 aufgeführt, werden aber im Zuge der Bescheiderstellung durch die Behörden in die Überwachungsauflagen mit aufgenommen. Dies gilt in vielen Fällen auch für die im Fischei-Test ermittelte Giftigkeit G<sub>Ei</sub>. Hier lautet die Anforderung in den meisten Fällen G<sub>Ei</sub>=2.

Es wurden Umfragen zur Wasser/Abwassersituation und zur Entsorgung von Abfällen durch die Papiertechnische Stiftung (PTS) im Auftrag des Verbandes Deutscher Papierfabrikation (VDP) im Zeitraum von 2013 bis 2015 durchgeführt. Diese Umfragen belegen, dass ca. 20 - 25 % der Produktionsstandorte Probleme mit der Einhaltung von CSB- und Temperatur-Grenzwerten haben [7, 8]. Hinsichtlich der in den Bescheiden enthaltenen Biotestgrenzwerte, meist zum Fischei-Test G<sub>Ei</sub>, hat keines der an der letzten Umfrage beteiligten Werke Probleme mit der Grenzwerteinhaltung angegeben. Es könnte die Aufnahme des Wasserlinsen-Tests als ein weiterer Biotest zur Bestimmung der aquatoxikologischen Wirkung der Abwässer in Betracht gezogen werden.

### 1.2.2 Aquatoxikologische Wirkungen von Zellstoff- und Papierfabriksabwässern

Im Gegensatz zu anderen Biotests, z. B. Leuchtbakterien-, Algen- und Daphnientest, ist der Wasserlinsen-Test zur Bewertung der aquatoxikologischen Wirkung von Papierfabriksabwässern bisher kaum eingesetzt worden und war damit bis zum Beginn der Diskussion um die Aufnahme in den Anhang 28 der Abwasserverordnung weitgehend unbekannt.

Biologische Untersuchungsverfahren (kurz: Biotests) ermöglichen die Bewertung der aquatotoxikologischen Wirkung von Abwässern und deren Inhaltsstoffen auf verschiedenen Trophiestufen in den Gewässern (Produzenten, Destruenten, Primär- und Sekundärkonsumenten). Für die am weitesten verbreiteten Biotest-Verfahren existieren genormte Messmethoden (siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Übersicht genormte Biotest-Verfahren für Abwasseruntersuchung

Parameter	G <sub>w</sub>	G <sub>L</sub>	G <sub>Ei</sub>	G <sub>D</sub>	G <sub>A</sub>	G <sub>EU</sub> (umu)	G <sub>EA</sub> (Ames)
Norm	DIN EN ISO 20079	DIN EN ISO 11348 T51...53	DIN 28415 T 6	DIN 38412 T30	DIN 38412 T33	DIN 38415 T 3	ISO DIS 11350
Testorganismen	<i>Lemna minor</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Dania rerio</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Scenedesmus subspucatud</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	

Als Bewertungskriterien dienen prozentuale Hemmschwellen, unterhalb derer keine Toxizität gegenüber dem Testorganismus vorliegt. Die Ergebnisangabe erfolgt in den meisten Fällen durch Angabe der Verdünnungsstufe bezogen auf den Anteil Abwasser im Testansatz, welche die o. g. Hemmschwelle nicht übersteigt. So bedeutet z. B. eine G<sub>L</sub> = 8, dass eine Mischung aus 1 Teil Abwasserprobe und 7 Teilen Verdünnungswasser die Lumineszenz um weniger als 20 % verringert. Im Falle des Lemna-Tests erfolgt die Angabe des Messergebnisses in G<sub>w</sub>, dies entspricht ebenfalls der Verdünnungsstufe, in der eine 10 %ige Hemmung des Wasserlinsen-Wachstums im Vergleich zur Kontrolle nicht überschritten wird.

Viele Arbeiten zur mutagenen Wirkung erfolgten Anfang der 80er bis Mitte der 90er Jahre und ausschließlich an Bleichereiabwässern (Cl<sub>2</sub>- und ClO<sub>2</sub>-Stufen) in (meist integrierten) Sulfatzellstoffwerken. Hier wird die Mutagenität mit chlororganischen Stoffen in Verbindung gebracht, z. B. chlorierte Hydroxyfuranone [9]. Reduzierte Cl<sub>2</sub>-Mengen oder die Kombination mit enzymatischen Bleichstufen [10] reduzieren die Mutagenität ebenso wie die aerobe Belebtschlammbehandlung [11].

Natürlichen Stoffen (Lignanen, Sterolen, Flavonoiden etc.) bzw. durch die chlorhaltige Bleiche halogenierten Holzextraktstoffen (Trichlorguaiacol etc.) wird auch ein endokrines Potenzial zugeschrieben. Möglicherweise sind derartige Stoffe auch für das endokrine Potenzial verantwortlich, wie es in einigen altpapierverarbeitenden Werken oder in Werken mit integrierter Holzstoffherzeugung durch das PMV der TU Darmstadt in gemeinsamen Projekten mit der PTS ermittelt worden ist [12, 13].

In Daphnien- und Fischeitoxizitätstests wurden für altpapierverarbeitende Werke  $G_D/G_{Ei}$ -Werte = 1 (keine erhöhte Toxizität gegenüber der Referenz) gemessen. Höhere Toxizitäten stehen in Verbindung mit Holzextraktstoffen und chlorierten Verbindungen aus der Bleiche [14, 15].

Eine gleichlautende Aussage lässt sich auch aus den Arbeiten zur Algen- und Leuchtbakterien-Toxizität ableiten. Stellvertretend seien [16] und [17] für Untersuchungen an Algen bzw. Leuchtbakterien sowie auch Daphnien genannt. Auf die Untersuchungen mittels Wasserlinsen-Wachstumstest wird im Abschnitt 4.1 eingegangen.

### 1.2.3 Untersuchungen mittels Wasserlinsen-Wachstumshemmtest

Die Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*), der Wasserlinsen-Wachstumshemmtest, ist in DIN EN ISO 20079:2006 beschrieben. Zum besseren Verständnis sollen die Durchführung des Testes und die Bedeutung für die Aquatoxizität kurz erläutert werden.

#### Beschreibung des Testverfahrens

Die kleine Wasserlinse (*Lemna minor*) dient als Modellorganismus für höhere Wasserpflanzen. In ihrer ökologischen Funktion steht die Wasserlinse als Primärproduzent am Anfang der Nahrungskette für Wasservögel, Fische und Kleintiere [4]. *Lemna minor* ist eine sehr schnell wachsende höhere Pflanze, wodurch sie für die Durchführung dieses Testverfahrens hervorragend geeignet ist. Darüber hinaus ist die Wasserlinse weltweit anzutreffen. Sie wächst sowohl in stehenden Gewässern in den Tropen über die gemäßigte Zone bis in die Arktis. Die Blättchen (bis zu 3 mm lang) verfügen über luftgefüllte Hohlkörper, so dass sie an der Wasseroberfläche schwimmen (siehe **Abbildung 1**). An der Unterseite besitzen die Pflanzen einen, bis

15 mm langen, ins Wasser ragenden Wurzelfaden, mit dem Mineralien und Nährstoffe aus dem Wasser aufgenommen werden.



**Abbildung 1:** Kleine Wasserlinse als wasserbedeckende Pflanze in der Natur [<sup>18</sup>, <sup>19</sup>]

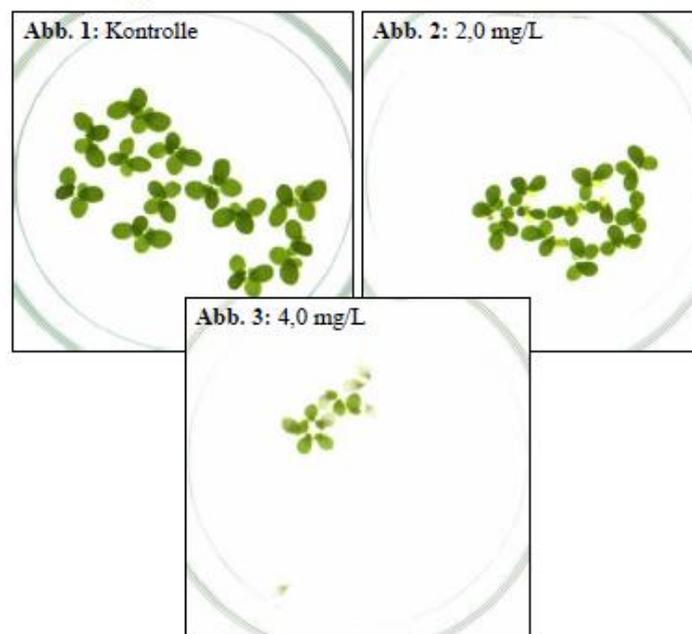
Das Wachstum der Wasserlinse kann durch Abwasser und Wasserinhaltsstoffe beeinträchtigt werden. Daraus resultiert eine Wachstumshemmung, die auf der Basis verschiedener Beobachtungsparameter (Frondanzahl, Frondfläche, Chlorophyll, Trockenmasse) ermittelt und mit einer Reihe verschiedener Berechnungsverfahren ausgewertet wird.

Die in der DIN EN ISO 20079:2006 beschriebene Untersuchungsmethode ist für die Messung der Reaktion auf in Wasser gelöste Stoffe entwickelt worden. Dies beinhaltet die Definition einer festgelegten Verdünnungsstufe (Konzentration) einer Probe, bei der ein Beobachtungsparameter zu einem definierten Prozentsatz gegenüber der Kontrolle gehemmt ist.

Für die Durchführung des Testes ist *Lemna minor* von einer festgelegten Bezugsquelle (in Deutschland: Umweltbundesamt) zu beziehen. Aus diesen Stammkulturen werden über einen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen vor Testbeginn Vorkulturen gewonnen, die anschließend in die zu untersuchenden Abwasserproben in verschiedene Verdünnungen eingesetzt werden. Der Test selbst dauert 7 Tage. In dieser Zeit muss die Abwasserprobe in den jeweiligen Verdünnungen in einem Becherglas (beschrieben sind meist 100 ml Probe mit Wasserlinsen in 150 ml-Becherglas) in einem Pflanzenwachstumsschrank bei konstanter Temperatur von  $24 \pm 2$  °C und definierter Beleuchtung aufbewahrt werden. Die photosynthetisch aktive Strahlung muss gemessen werden, um normgerechte Lichtverhältnisse zu gewährleisten. Kontrollansätze und Referenzproben müssen mitgeführt werden, um die Qualität der Messergebnisse beurteilen zu können.

Die Auswertung erfolgt anhand der zu messenden Parameter Frondanzahl (Fronde=botanischer Begriff, hier für Blatt mit Taschen an den Seiten mit Anlagen für weitere Blätter), Frondfläche, Chlorophyllgehalt und Trockenmasse, wobei die Frondanzahl als Grundparameter angegeben ist, und mindestens ein weiterer Parameter für die Beurteilung des Testes erforderlich ist.

In **Abbildung 2** ist exemplarisch ein mögliches Ergebnis für den Wasserlinsen-Wachstumshemmtest dargestellt. Es sind zwei Testansätze aus einer Versuchsreihe mit 3,5-Dichlorphenol in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Zugabe von Chemikalien gezeigt.



**Abbildung 2:** Wachstums-Hemmung von *Lemna minor* im Test bei Zugabe von 3,5 Dichlorphenol [20]

### Einfluss von Wasserinhaltsstoffen auf den Wasserlinsen-Wachstumstest

Im Rahmen der Vorbereitung des Projektes wurden zahlreiche Publikationen zur Wirkung von organischen Verbindungen und Schwermetallen auf die verschiedenen Testorganismen recherchiert. Bedingt durch die REACH-Verordnung und umfangreiche Untersuchungen zu prioritären Stoffen gem. der EU-Wasserrahmen (RL 2000/60/EG) bzw. Umweltqualitätsnormen-Richtlinie (RL 2008/105/EG) sind insbesondere in den letzten 10 Jahren zahlreiche Studien zu diesem Thema veröffentlicht worden. Im Folgenden wird ausschließlich die Wirkung von Inhaltsstoffen auf *Lemna minor* betrachtet.

Wasserlinsen sind in der Lage, Schwermetalle aufzunehmen und zu speichern. In einigen Arbeiten wird dies als potenzielles und kostengünstiges Verfahren zur Schwermetalldetoxifizierung beschrieben [21, 22].

Interessant ist auch die Fähigkeit von Wasserlinsen zur selektiven Denitrifikation [23, 24].  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen  $> 20 \text{ mg/l}$  im Wechselspiel mit pH-Werten über 8 und somit dem zunehmenden Einfluss von freiem  $\text{NH}_3$  hemmen jedoch das Wachstum. Zwar erfolgt auch bei niedrigen pH-Werten von 5 - 6 noch ein Biomassewachstum, die Blätter zeigen jedoch erste Anzeichen von Chlorose (Vergilbung, Pigmentverlust) oder gar Nekrose (Absterben von Frondgewebe). Zahlreiche Pestizide, Insektizide, Herbizide und Biozide, von denen einige wesentliche Vertreter zu den prioritären Stoffen gehören, und einige Industriechemikalien wie Phenol- und Benzolderivate führen zu teilweise sehr starker Hemmung des Wasserlinsen-Wachstums bis zum völligen Absterben der Pflanze. Aus Untersuchungen zur endokrinen Wirksamkeit [12, 13] ist bekannt, dass biologisch gereinigte Abwässer von Papierfabriken, wenn auch auf anderen Trophiestufen, durchaus negative (meistens östrogene) Wirkungen auf Testorganismen haben können. Inwieweit die dafür verantwortlichen Stoffe, teilweise natürliche phenolische und andere Holzinhaltstoffe, teilweise auch Industriechemikalien, die in Spurenkonzentrationen in Abwässern aus der Altpapierverarbeitung enthalten sein können, auch auf das Wasserlinsen-Wachstum einwirken können, ist nicht bekannt.

### Behördendaten

Die in [2] ermittelten Wirktestdaten inkl. der statistisch ausgewerteten Behördendaten (2001 - 2007) für den Wasserlinsen-Test in Papierfabriksabwässern sind meist unauffällig, d. h.  $G_w = 1$  oder 2, zeigen aber auch Maxima bis 8. Aktuellere Behördendaten (2008 - 2014) beinhalten sogar  $G_w$ -Werte bis 24 (hohe Toxizität) [2]. Auffällig ist, dass alle erhöhten Werte in Altpapier verarbeitenden Werken - sowohl ohne als auch mit Deinkinganlage - gemessen wurden. Weitere Zusammenhänge oder Erkenntnisse zu den Ursachen dieser erhöhten Werte sind nicht bekannt.

#### **1.2.4 Forschungsprojekte zu Untersuchungen von Papierfabriksabwässern mittels Wasserlinsen-Wachstumshemmtest**

Der Stand der Forschung zu dieser speziellen Matrix ist im Wesentlichen innerhalb von zwei Forschungsprojekten der Papiertechnischen Stiftung (PTS) in den Jahren 2012 bis 2014 erarbeitet worden. Grundlegende Erkenntnisse zur Durchführung und

zu den Ergebnissen des Wasserlinsen-Wachstumstests in Papierfabrikations-abwässern wurden im Schlussbericht des IGF-Projektes 16844 "Bewertung der aquatoxikologischen Wirkung von Papierfabriksabwässern anhand des Lemna-Tests und Ursachenermittlung bei erhöhten  $G_w$ -Werten (Wasserlinsen)" [5] dokumentiert. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Es sind in insgesamt 13 altpapierverarbeitenden Papierfabriken und 2 Frischfaserwerken insgesamt 49 biologisch voll gereinigte Abwässer und 27 biologisch nicht oder nur teilgereinigte Abwasserproben untersucht worden.
- Biologisch nicht behandelte Abwässer (Zulauf ARA) weisen mit  $G_w$ -Werten von 6 bis 24 eine geringe bis erhöhte Toxizität auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Toxizität durch die anaerobe Abwasserreinigung auf unbedenkliche Werte im Bereich  $G_w \leq 2 - 6$  reduziert wird.
- Insgesamt weisen biologisch voll gereinigte Abwässer der Papierfabriken (Ablauf ARA) mit  $G_w$ -Werten von 2 - 8 keine bzw. nur eine geringe Toxizität auf. Die Frischfaser verarbeitenden Werke zeigten durchgängig nicht toxische Werte  $G_w \leq 2$  an (sowohl für Parameter Frondfläche, als auch Frondanzahl). Dies gilt auch für 5 der Papierfabriken, die Altpapier einsetzen.
- Auffallend sind allerdings erhöhte Toxizitäten im Sortenbereich Grafische Papiere mit anaerob-aeroben Reinigungsanlagen. Nach der Aerobstufe wurden hier  $G_w$ -Werte von bis zu 48 und höher gemessen, die eine deutliche erhöhte aquatoxische Wirkung bedeuten. Im GC/MS-Parameter-Screening wurden keine auffälligen Peaks oder Unterschiede zwischen Zu- und Ablauf der Aerobstufe gefunden. Auch der Vergleich zu anderen Betriebsparametern ergab keine signifikante Korrelation. Die einzige Gemeinsamkeit der Papierfabriken mit erhöhten  $G_w$ -Werten war der Einsatz von Entschäumern vor der Probenahme. Inwieweit dies zur Beeinflussung des Wasserlinsen-Tests oder tatsächlich zu erhöhten aquatoxikologischen Wirkungen führt, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht geklärt werden.
- Die Reproduzierbarkeit des Wasserlinsen-Tests war sowohl bei internen Wiederholungsmessungen als auch bei externen Paralleluntersuchungen unbefriedigend. Die Ursachen dafür konnten nicht geklärt werden.

Weitere Untersuchungen sind im PTS-Forschungsbericht PTS-BAY IGF-1211-0005 zur "Vermeidung erhöhter Wasserlinsentoxizitäten durch gezielte Auswahl chemischer

Additive zur Papierherstellung" dokumentiert worden [6]. In diesem Forschungsprojekt wurden insgesamt 22 verschiedene chemische Additive aus allen relevanten Stoffgruppen auf ihre phytotoxische Wirkung im Wasserlinsen-Test untersucht. Die Ergebnisse der als Handelsware eingesetzten Additive waren höchst unterschiedlich. Eine einheitliche Aussage zur aquatotoxikologischen Wirkung war vor allem deshalb schwierig, weil die Additive im Prozess der Papierherstellung in ganz unterschiedlichem Maße in der Papierbahn verbleiben (z. B. Retentionsmittel mit hohem Retentionsvermögen im Gegensatz zu Entschäumern und Reinigungsmitteln, die nahezu vollständig in das Prozess-/Abwasser übergehen) und dann wiederum in verschiedenem Umfang biologisch abgebaut werden.

Bei den Additiven, die im Zahn-Wellens-Test einen hohen Abbaugrad zeigten (CSB-Elimination  $\geq 95\%$ ), ist auch der  $G_w$ -Wert signifikant gesunken. Dagegen hat sich der  $G_w$ -Wert bei den schlecht aerob abbaubaren Additiven auch nur unmerklich verändert. Eine eindeutige Zuordnung erhöhter Wasserlinsen-Toxizitäten zu speziellen Additiven/Additivgruppen konnte nicht getroffen werden. Auch wurden die chemischen Additive nicht in der Matrix Papierfabriksabwasser untersucht, so dass mögliche additive oder synergistische Wirkungen nicht beurteilt werden konnten.

### 1.3 Arbeitshypothese

Aus den oben genannten Projektergebnissen ergeben sich zwei fachliche Schwerpunkte, die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens bearbeitet werden sollen. Auch eine nochmalige aktuelle Literaturrecherche konnte zu diesen Problemen/Aufgaben keine Antworten geben.

Der Wasserlinsen-Test kann nur dann sinnvoll als Überwachungsparameter für die aquatotoxikologische Wirkung von Papierfabriksabwässern eingesetzt werden, wenn

- die Ursachen der Erhöhung der  $G_w$ -Werte durch die aerobe Abwasserreinigung, insbesondere in den grafischen Papierfabriken mit anaerober Vorreinigung, geklärt sind bzw. weiter eingegrenzt/vermieden werden können und
- eine durchgängig einheitliche Testdurchführung/-auswertung und Interpretation der Testergebnisse sowie Angabe des Messergebnisses gewährleistet ist.

## 2 Forschungsziel und Lösungsweg

### 2.1 Forschungsziel

Das Ziel dieses Projektes ist es, die Eignung des Wasserlinsen-Tests zur Bestimmung der phytotoxischen Effekte von Papierfabriksabwässern zu untersuchen; darüber hinaus sollen die Unterschiede der Testergebnisse hinsichtlich der Verdünnungsstufen ( $G_w$ ) für verschiedene Papierfabriken (grafische Papierfabriken mit und ohne Deinking und andere Papier- und Kartonfabriken) mit verschiedenen Abwassertechniken (Aerob-Aerob und Aerob-Anaerob) herausgefunden und erklärt werden. Dafür müssen alle Parameter, die das Ergebnis des Wasserlinsen-Tests beeinflussen können, untersucht werden. Zu diesen Parametern gehören die Probenvorbereitungsmethode, die Lagerungsbedingungen und die Abwasserparameter (CSB, AOX, AFS, Trübung und etc.). Nach Erstellung eines Pflichtenhefts zur Wasserlinsen-Testdurchführung wird die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse im gleichen Labor (PMV) und auch in unterschiedlichen Laboren untersucht.

### 2.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

#### 2.2.1 Arbeitspaket 1: Etablierung des Lemna-Tests

Der Lemna-Test wird konsequent nach den Vorgaben der DIN EN ISO 20079 umgesetzt. Zur normgerechten Durchführung und Auswertung des Lemna-Tests mussten entsprechende Laborgeräte beschafft werden (Pflanzenwachstumsschrank; Gerät mit Durchlicht- und Auflichteinheit und Software zur bildanalytischen Auswertung). Die beschafften Geräte erfüllen die Bedingungen und waren zur Zielerreichung zwingend erforderlich. Wertvolle Hinweise zur Minimierung bzw. zum Ausschluss potenzieller Fehlerquellen werden durch die im Projektbegleitenden Ausschuss (PBA) vertretenen Labors und Fachbehörden eingebracht sowie durch Firmen, welche die entsprechenden Geräte herstellen. Außerdem steht der Leiter der zwei bisherigen Forschungsprojekte auf dem Gebiet des Lemna-Tests in Papierfabriken, Herr Dr. Hans-Jürgen Öller (früher Papiertechnische Stiftung PTS, jetzt Dr. Öller Umweltberatung) als Projektbegleiter zur Verfügung.

Zur Durchführung der Tests bzw. Testreihen ist die Kultivierung eines definierten und geprüften Stammes von *Lemna minor* erforderlich. Dieser steht z. B. beim UBA zur Verfügung und wurde von dort bezogen.

Die Testdurchführung soll zum einen an der in der Norm genannten Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol und zum anderen an 2 Abwasserproben aus den in AP 2 zu untersuchenden Papierfabriken erprobt werden. Die Bestimmung der Auswerteparameter erfolgt mit einem automatisierten Auswertegerät. Dies ermöglicht eine objektive und reproduzierbare Berechnung der Auswerteparameter, die in der DIN EN ISO 20079 im Einzelnen beschrieben sind.

### **2.2.2 Arbeitspaket 2: Untersuchung zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenheftes für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern**

Die bisherigen Untersuchungen zum Lemna-Test in der Matrix Papierfabriksabwasser wurden in der homogenisierten Originalprobe und nach Einfrieren der Proben durchgeführt [5]. Einige behördliche Laboratorien untersuchen die Abwasserprobe nach Absetzen der Probe. Über die Auswirkungen dieser Probenvorbereitungsschritte auf das Testergebnis ist bisher nichts bekannt. Die DIN EN ISO 20079 für die Durchführung des Lemna-Testes sieht die Untersuchung von Wasserinhaltsstoffen vor, die in der Abwasserprobe gelöst sind. Inwieweit eine homogenisierte bzw. abgesetzte Abwasserprobe diesen Anforderungen entspricht, ist nicht geklärt. Die abgesetzten Proben sind meistens schwach gefärbt (sollte auf der Basis der bisherigen Erkenntnisse keinen signifikanten Einfluss haben) und unterschiedlich trüb. Für den Einfluss dieses Probenvorbereitungsschrittes sollen in 3 verschiedenen Abwasserproben (möglichst mit erhöhter Toxizität) folgende Methoden zur Abtrennung der festen und kolloidal gelösten Stoffe der Abwasserprobe untersucht werden:

- Absetzen der Probe (z. B. eine Stunde nach Homogenisierung der Probe),
- Zentrifugation der abgesetzten Probe,
- Filtration der abgesetzten Probe mittels Schwarzbandfilter und
- Filtration der abgesetzten Probe über ein 0,45 µm Filter.

Zur Untersuchung der Probenkonservierung auf das Ergebnis des Lemna-Testes sollen in 3 verschiedenen Abwasserproben folgende Varianten getestet werden:

- Untersuchung der (abgesetzten) Probe ohne Einfrieren, direkt nach Probeneingang, in der Forschungsstelle (FSt)

- Einfrieren der Probe in der Papierfabrik, Versand an die FSt über Nacht, Untersuchung direkt nach Probeneingang in FSt (sobald Temperatur konstant),
- Einfrieren der Probe in der Papierfabrik, Versand an die FSt über Nacht, erneutes Einfrieren in der FSt. und Analyse nach 2 Wochen,
- Einfrieren der Probe in der Papierfabrik, Versand an die FSt über Nacht, erneutes Einfrieren in der FSt. und Analyse nach 4 Wochen

Weitere Untersuchungen sollen dem Einfluss des pH-Wertes auf die Wasserlinsen-Toxizität dienen, auch hier lässt die Norm Spielräume für die Probenvorbereitung, die von erheblichem Einfluss auf das Messergebnis sein können. Die Anzahl und die Höhe der zu untersuchenden Verdünnungsstufen werden vom PBA in der ersten Sitzung festgelegt.

Nach Auswertung der Untersuchungen in AP 2 soll eine standardisierte Versuchsdurchführung gewährleistet werden. In Absprache mit dem PBA können weitere Parameter in diese Untersuchungen einbezogen werden. Im Ergebnis soll ein Pflichtenheft erstellt werden, das die wesentlichen Schritte bei der Probenahme, Probenkonservierung und Probenvorbereitung der Papierfabriksabwässer festlegt.

### **2.2.3 Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken**

Aus den bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass erhöhte  $G_w$ -Werte fast ausschließlich in Altpapier verarbeitenden Werken aufgetreten sind. Es wurde geplant, 8 verschiedene Altpapier verarbeitende Papierfabriken mit Schwerpunkt graphische Papierfabriken mindestens viermal innerhalb der Projektlaufzeit mittels Lemna-Test zu untersuchen. Dabei werden die Papierfabriken mit einbezogen, die in den bisherigen Untersuchungen [5] auffällige Werte gezeigt haben. Nach dieser Untersuchung sind vor allem in den Papierfabriken erhöhte  $G_w$ -Werte ermittelt worden, die über eine anaerob-aerobe Abwasserreinigungsanlage (ARA) verfügen.

Über graphische Papierfabriken, in denen eine mehrstufige aerobe ARA (ohne Anaerobstufe) betrieben wird, liegen noch keine belastbaren Daten vor. Da die Anaerobstufe regelmäßig zu einer Verringerung der Wasserlinsen-Toxizitäten führt, bleibt abzuwarten, wie die  $G_w$ -Werte in diesen Papierfabriken ausfallen werden. Die endgültige Festlegung der zu untersuchenden Werke wird auf der ersten Sitzung des PBA nach Absprache mit den Papierfabriken durchgeführt.

In jeder Papierfabrik werden folgende vier Abwasserproben entnommen: Zulauf ARA, Ablauf erste biologische Reinigungsstufe, Ablauf zweite biologische Reinigungsstufe, Ablauf Nachklärung (Endablauf in das Oberflächengewässer). Die Proben werden bis zur Untersuchung mittels Lemna-Test konserviert (eingefroren).

Zunächst wird nur der Endablauf auf die phytotoxische Wirkung mit dem Wasserlinsen-Test untersucht. Sollten sich daraus Anhaltspunkte für eine erhöhte Toxizität ( $G_w > 2$ ) ergeben, werden auch die anderen Abwasserproben analysiert.

Für jede Papierfabrik wird ein Fragebogen erstellt, der die wesentlichen Angaben zum Rohstoffeinsatz (einschl. chem. Additive), zur erzeugten Papiersorte, zur Anlagenkonfiguration/Betriebsführung der ARA und Parametern zur Beschaffenheit des Abwassers enthält. Im Rahmen der Untersuchungen des Abwassers werden folgende Parameter gemäß der einschlägigen DIN-Vorschriften zusätzlich im Labor der FSt. untersucht: Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) (alternativ Total Organic Carbon - TOC; nach Absprache mit PBA), Abfiltrierbare Stoffe (AFS), Organische Halogenverbindungen (AOX), pH-Wert, Trübung nach Absetzen der Probe.

Eine GC/MS-Einzelstoffanalytik zur Identifizierung möglicher kritischer Inhaltsstoffe hat sich in den bisherigen Untersuchungen [5] als wenig erfolgreich herausgestellt. Daher soll im vorliegenden Projekt darauf verzichtet werden. Aufgrund erster Hinweise zur Ursachenermittlung erhöhter  $G_w$ -Werte im Hinblick auf die Dosierung von Entschäumern wird auch die Oberflächenspannung der Abwasserproben (Ablauf Nachklärung) gemessen.

Sollten sich bei der Auswertung des Lemna-Tests Hinweise auf eine erhöhte Toxizität der Ablaufprobe ergeben, wird die Messung wiederholt. Außerdem werden Proben mit erhöhter Wasserlinsen-Toxizität mittels Fischeitest  $G_{EI}$  untersucht. Dieser Biotest ist bisher in vielen Einleitebescheiden der Papierfabriken enthalten. Es soll untersucht werden, ob es Korrelationen zwischen diesen beiden relevanten Biotestverfahren gibt. Der Fischei-Test wird von dem anerkannten und zertifizierten Labor durchgeführt.

Beim einmaligen Auftreten erhöhter  $G_w$ -Werte in Papierfabriken, in denen in anderen Messungen unauffällige  $G_w$ -Werte vorliegen, werden mögliche Einflussfaktoren/Änderungen durch den Rohstoffeinsatz sowie die Prozesswasserführung und -behandlung bzw. die ARA-Betriebsführung mit dem Verantwortlichen der Papierfabrik ausführlich besprochen. Ggf. sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Im Ergebnis werden für 8 verschiedene Papierfabriken mindestens 4 Messwerte für die Wasserlinsen-Toxizität vorliegen, aus denen Schlussfolgerungen für die Schwankungsbreite innerhalb einer Papierfabrik und Korrelationen zum Fischei-Test gezogen werden können.

Die Messungen der weiteren Abwasserparameter (siehe oben) dienen zum einen der Kontrolle, ob das Abwasser die in der Fabrik übliche Qualität aufweist. Zum anderen werden mittels Regressionsanalysen mögliche Abhängigkeiten der  $G_w$ -Werte von anderen Parametern untersucht, sowohl innerhalb einer Papierfabrik als auch werksübergreifend.

#### **2.2.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung**

Bereits nach Abschluss des Projektes [5] wurden in einem "Wasserlinsen-Begleitkreis" unter Einbindung von Behördenvertretern und Beratungsunternehmen unter Beteiligung des PMV wesentliche offene Fragen im Zusammenhang mit der Durchführung des Lemna-Tests in der Papierindustrie erörtert.

Folgende Aufgaben sind in diesem AP vorgesehen:

- Reproduzierbarkeitsuntersuchungen in der FSt: Dazu sollen 10 verschiedene Proben mit unterschiedlichen  $G_w$ -Werten insgesamt 3mal parallel (zeitgleich) untersucht werden. Dabei werden 10 verschiedene Abwasserproben im Original jeweils 3mal separat aufgearbeitet (Probenvorbereitung siehe AP 2) und dem Lemna-Test unterzogen.
- Laborvergleichsuntersuchungen: Neben der FSt. werden die zertifizierten Labors an dieser Untersuchung teilnehmen. Auch in diesem AP werden 10 verschiedene Abwasserproben organisiert. Der Versand der Proben erfolgt direkt von der Papierfabrik an die teilnehmenden Untersuchungsstellen.

#### **2.2.5 Arbeitspaket 5: Berichterstattung**

Nach Abschluss der AP 1 bis 4 werden sämtliche Untersuchungsergebnisse nachvollziehbar in einem Schlussbericht dokumentiert, wesentliche Erkenntnisse zusammengefasst und interpretiert. Wichtige Inhalte des Schlussberichtes werden mit den Vertretern des PBA abgesprochen, um die Einführung der Vorhabensergebnisse in die zukünftigen Untersuchungen mittels Lemna-Test zu gewährleisten und die Akzeptanz der Ergebnisse bei Behörden, Untersuchungsstellen und Papierfabriken zu erhöhen.

### 2.3 Personaleinsatz

Für die Recherche, die Entwicklung der Versuchspläne sowie die Auswertung der Versuche, Evaluation der Versuchsergebnisse und die Kostenbetrachtungen war das wissenschaftliche Personal des PMV (TU Darmstadt) zuständig. Ihm unterlag auch die wissenschaftliche Leitung. Die routinemäßige Durchführung von Laborversuchen oblag dem Laborpersonal der Forschungsstelle. Für diverse Hilfstätigkeiten im Labor und bei der Auswertung wurde eine studentische Hilfskraft eingesetzt.

Die geleistete Arbeit des wissenschaftlich-technischen Personals (A.1, HPA A) von insgesamt 14 Personenmonaten über die gesamte Laufzeit des Vorhabens, inklusive der sechsmonatigen Verlängerung, entsprechen den beantragten Mitteln und waren für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen. Gleiches gilt für die geleistete Arbeit des übrigen Fachpersonals und der Hilfskräfte.

Im Rahmen des Projekts wurde ein Beleuchtungssystem/Trockenschrank für 22.160,22 € und eine bildanalytische Auswertungssoftware für Wasserlinsentests für 16.667,37 € angeschafft. Diese Geräteinvestitionen entsprechen den im Antrag geplanten Ausgaben.

Die im Projektantrag durch Leistungen Dritter vorgesehenen Fischeitests und Lemnatests als Wasserlinsen-Vergleichsuntersuchung von jeweils 10 Abwasserproben wurden wie geplant durchgeführt.

### 3 Geräte, Materialien und Prüfmethode

#### 3.1 Gerätschaften

Zur Durchführung und Auswertung des Wasserlinsen-Tests wurden folgende Gerätschaften verwendet.

##### Testdurchführung

- Beleuchtungssystem/Trockenschrank KBW 720 der Fa. Binder: Gemäß DIN EN ISO 20079:2006 ist zur Durchführung des Tests eine Einrichtung notwendig, die konstante Temperatur und Lichtverhältnisse gewährleistet (beschafft mit Mitteln zur Geräteinvestition aus AiF 19761)
- Zylindrische Glasgefäße (Bechergläser) mit einem Mindestvolumen von 200 ml (2/3 des Gesamtvolumens für Testlösungen)
- Einheitliche Abdeckungen aus Glas: um zufällige Kontaminationen zu vermeiden und Verdunstungsverluste zu minimieren, werden Abdeckungen verwendet.
- Photometer zur Bestimmung der Abwasserparameter (vorhanden)
- pH-Wert Messgerät (vorhanden)
- Glasgeräte: für das Ansetzen verschiedener Konzentrationsstufen und Nährmedien (Messkolben, Messzylinder, Messpipetten, Petrischalen)
- Autoklav (vorhanden)
- Schwarzbandfilter Fa. Machery-Nagel (MN 640 w), Filtermaterial: Cellulose, Rückhaltevermögen: 7 – 12 µm, Aschegehalt < 0,01 (vorhanden)
- Membranfilter Fa. Whatman (RC 55), Filtermaterial: regenerierte Cellulose, Porengröße: 0,4 µm (vorhanden)
- Zentrifuge Fa. Sigma (8K10) (vorhanden)

##### Testauswertung

- Leuchttisch mit Basler-Industriekamera und Bildanalysesoftware MedeaLAB Count & Classify-Version 6.7 der Fa. Medea AV GmbH, Erlangen (beschafft mit Mitteln zur Geräteinvestition aus AiF 19761)
- MATLAB-Software Version R2018b (vorhanden)

### 3.2 Wasserlinsen-Kultur

Die Wasserlinsen Stammkultur (*Lemna Minor*) wurde von Umweltbundesamt (UBA) in Berlin in einem festen Nährmedium zur Verfügung gestellt.

Die Wasserlinsen zum Einsatz vom Toxizitätstest wurden 5 bis 7 Tage vor Testbeginn im Steinberg-Medium angesetzt und im Pflanzenwachstumsschrank aufbewahrt. Die Schichtdicke (Tiefe) des Mediums sollte mindestens 3 cm betragen. Um die Wahrscheinlichkeit einer Lag-Phase bei Testbeginn durch Wechselwirkungen zwischen den Pflanzen zu minimieren, sollte sichergestellt werden, dass die insgesamt verfügbare Oberfläche zu weniger als 50 % bedeckt ist.

Bei den ersten Versuchen zur Testdurchführung mit unbehandeltem und auch teilbehandeltem Abwasser erfolgte eine massive Algenkontamination, zuerst im Kultivierungsbecken im weiteren Verlauf auch der Testansätze. Mikroskopische Aufnahme zeigten, dass sich die Grünalgen an den Wurzeln der Wasserlinsen festsetzen, sie so von der Nährstoffaufnahme abschnitten und die Wasserlinsen abstarben. Eine reguläre Kultivierung und Testdurchführung war auf dieser Basis nicht möglich. Durch konsequente Umsetzung der nachfolgend beschriebenen Gegenmaßnahmen konnte eine weitere Algenkontamination in der Restlaufzeit des Vorhabens dauerhaft unterbunden werden:

- Räumliche Trennung der Kultivierung und der Testdurchführung
- Pflanzenwachstumsschrank nach jeder Testdurchführung (alle 7 Tage) bei 70 °C mindestens 4 Stunden ausheizen und mit Isopropanol desinfizieren
- Steinberg-Medium im Kultivierungsbecken zweimal die Woche wechseln
- Separierung aller Glasgeräte des Wasserlinsen-Tests sowie Ausheizen nach der Spülmaschine

Wasserlinsen aus den Vorkulturen, die für Toxizitätstest verwendet werden, sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Exponentielles Wachstum
- Die Frondanzahl in den Vorkulturen sollte nach sieben Tagen um das 7fache angestiegen sein (d.h.  $r \geq 0,275$  je Tag oder Verdopplungszeit  $\leq 2,5$  Tage)
- Die Vorkultur sollte aus jungen, schnell wachsenden Kolonien von kräftig grüner Färbung bestehen und keine sichtbaren Schädigungen, Chlorosen oder Nekrosen aufweisen

### 3.3 Das modifizierte Steinberg-Nährmedium

Als Aufbewahrungs- und Testmedium wird ausschließlich das modifizierte Steinberg-Medium (DIN EN ISO 20079:2006) verwendet. Dieses Medium setzt sich aus acht Stammlösungen und destilliertem Wasser zusammen. Die Zusammensetzung der Stammlösungen ist in **Tabelle 2** und **Tabelle 3** beschrieben.

**Tabelle 2:** Stammlösungen (Makroelemente)

Makroelemente (50fach konzentriert)	Konzentration in g/l
Stammlösung 1:	
KNO <sub>3</sub>	17,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63
Stammlösung 2:	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,0
Stammlösung 3:	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14,75

**Tabelle 3:** Stammlösungen (Mikroelemente)

Mikroelemente (1000fach konzentriert)	Konzentration in mg/l
Stammlösung 4:	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120,0
Stammlösung 5:	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	180,0
Stammlösung 6:	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44,0
Stammlösung 7:	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180,0
Stammlösung 8:	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	760,00
EDTA Dinatrium-dihydrate	1500,00

Laut DIN-Norm sollten die Stammlösungen 2 und 3 sowie die Stammlösungen 4 bis 7 unter Berücksichtigung der Endkonzentration zusammengefasst werden. Allerdings gab es bei der Zusammenfassung der Stammlösungen 2 und 3 Probleme mit der

Ausfällung der Chemikalien. Aus diesem Grund wurden die Stammlösungen 1, 2, 3 und 8 separat und Stammlösungen 4 bis 7 zusammen hergestellt. Die Stammlösungen werden jeweils autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Zucht und Lagerung der Wasserlinsen wird einfach konzentriertes Steinberg-Medium hergestellt. Für einen Liter werden je 20 ml der Stammlösungen 1 bis 3 und je 1 ml der Stammlösungen 4 bis 8 in ca. 30 ml destilliertem Verdünnungswasser gegeben und anschließend mit Verdünnungswasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Für die Versuchsdurchführung wird das 10fach konzentrierte Steinberg-Medium verwendet. Hierbei werden bezüglich 100 ml je 20 ml der Stammlösungen 1 bis 3 und je 1 ml der Stammlösungen 4 bis 8 in ca. 30 ml destilliertem Verdünnungswasser gegeben und anschließend mit Verdünnungswasser auf 100 ml aufgefüllt.

#### **3.4 DIN-Norm zur Durchführung des Wasserlinsentests**

Die Durchführung des Wasserlinsen-Tests wurde an die Norm DIN EN ISO 20079:2006 angelehnt. Es wurde zunächst davon abgesehen, die geforderte Anzahl an Bechergläsern für die Kontrollansätze und Parallelbestimmung zu verwenden. Eine Reduktion der Bechergläser und Messtage im Rahmen eines Screening-Verfahrens trägt dazu bei, mehr Proben untersuchen zu können. Sollte es zu Auffälligkeiten kommen, so wird ein weiterer Test der Abwässer der betroffenen Papierfabrik mit der nach DIN-Norm vorgesehenen Anzahl an Verdünnungsstufen durchgeführt.

## 4 Versuchsdurchführung

In den folgenden Unterkapiteln wird die Versuchsdurchführung innerhalb der einzelnen Arbeitspakete beschrieben.

### 4.1 Arbeitspaket 1: Etablierung Lemna-Test

Die Durchführung des Wasserlinsen-Tests wurde an die Norm DIN EN ISO 20079 angelehnt. Dazu wurde die Temperatur im Pflanzenwachstumsschrank auf 24,0 °C eingestellt. Die räumliche Temperaturabweichung beträgt maximal  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Zur gleichmäßigen Beleuchtung aller Testansätze wurde die räumliche Verteilung der photosynthetisch aktiven Strahlung mittels sphärischem Kugelsensor an mehreren Tagen gemessen. Der gemessene Mittelwert von  $100 \frac{\mu\text{E}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  auf Höhe des Flüssigkeitsspiegels lag innerhalb des empfohlenen Wertes der DIN-Norm von  $85 \frac{\mu\text{E}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} - 1135 \frac{\mu\text{E}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  mit einer Abweichung von 5 %.

In dem Pflanzenwachstumsschrank sind drei Ebenen vorhanden. Die Bechergläser werden in speziellen Aufbewahrungskästen mit jeweils 32 Bechergläsern pro Kasten positioniert, so dass insgesamt 96 Messplätze vorhanden sind. Durch die schwarze Farbe und geschlossene Bauweise der Kästen wird zusätzlich der Einfall von Seiten- und Reflexionslicht minimiert (siehe hierzu **Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Aufbau des Pflanzenwachstumsschranks inkl. der schwarzen Aufbewahrungskästen

Um reproduzierbare Testergebnisse zu erhalten, wurde zunächst nicht mit Abwasser, sondern mit einer desintegrierten Papierprobe gearbeitet. Dazu wurde am PMV ein Papiermuster nach PTS-Methode RH-014/2015 definiert zerfasert. Zunächst wurde Wellpappenrohpaper (Testliner) unter Standardbedingungen in kleine Stücke gerissen, 24 g davon eingewogen und in 1 l demineralisiertem Wasser 2 h bei Raumtemperatur eingeweicht. Anschließend wurde 1 l demineralisiertes Wasser hinzugegeben und danach im Desintegrator entsprechend ISO 5263 aufgeschlagen. Der aufgeschlagene Faserstoff wurde danach schwarzbandfiltriert und auf einen CSB-Wert zwischen 100 mg/l und 200 mg/l verdünnt.

Zu Beginn jeder Testreihe für die Untersuchung der Wasserlinsen-Toxizität wurden verschiedene Verdünnungsreihen mit einem Endvolumen von 500 ml hergestellt. 450 ml von jeder Verdünnungsstufe wurden auf drei Bechergläser verteilt, um drei Parallelbestimmungen zu je 150 ml mit exakt gleichem Mischungsverhältnis zu erstellen. Als Referenzsubstanz wurde 3,5-Dichlorphenol mit 3,06 mg/l eingesetzt (entsprechend der Konzentrationsvorgaben der DIN EN ISO 20079). Zusätzlich wurden für jede Testreihe eine Kontrolle bestehend aus 10fach konzentriertem STEINBERG-Medium und Verdünnungswasser verwendet. Anschließend wurde der pH-Wert der Kontroll- und Referenzansätze sowie aller Verdünnungsstufen auf  $5,5 \pm 0,2$  eingestellt. In den durchgeführten Versuchen wurden sechs verschiedene Verdünnungsstufen untersucht. Die Herstellung der verschiedenen Verdünnungsstufen (V1 - V24) sowie die Kontrolle (K) und Referenzen erfolgte nach DIN-Norm.

Im nächsten Schritt wurden in jedes Becherglas mit den zuvor hergestellten Verdünnungen drei bis vier gesunde und grünfarbige Wasserlinsen mit insgesamt zehn bis sechzehn Fronds gegeben. Die Bechergläser wurden danach mit Uhrgläsern abgedeckt und für 7 Tage in dem Pflanzenwachstumsschrank aufbewahrt.

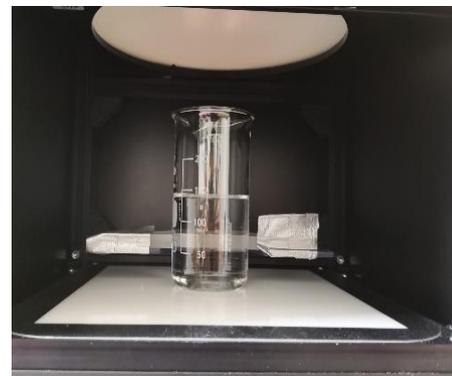
Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf das Testergebnis wurde der Lemna-Test mit einer desintegrierten Papierprobe (nach PTS-Methode RH-014/2015) für die pH-Werte von 5,0 bis 8,0 durchgeführt.

#### **4.1.1 Bildanalyse zur Bestimmung der Wachstumsrate der Wasserlinsen**

Die gesamte Testdauer des Wasserlinsen-Tests beträgt 7 Tage. Zur Bestimmung der Wachstumsrate der Wasserlinsen wurden Frondanzahl und Frondfläche bestimmt. Die Wasserlinsen werden am Testbeginn, Testende und zusätzlich nach 2 und 5 Tagen

gemessen. Zur Vergleichbarkeit sollte an jedem Messtag in etwa zur gleichen Zeit gemessen werden.

Die Messung des Wachstums der Wasserlinsen wurde am Anfang des Projektes mit Hilfe des Bildanalyse-System (Count & Classify MedeaLab) durchgeführt. Das Messsystem war aber nicht ausreichend stabil und die Messungen teilweise zu ungenau. Deswegen wurde das Gerät nur zur Bildaufnahme von den Wasserlinsen verwendet und die Messung des Wachstums der Wasserlinsen mit Hilfe der MATLAB-Software durchgeführt. Die Genauigkeit der gesamten Messung ist deutlich von der Anzahl der Pflanzen und deren Überlappung abhängig und schwankt zwischen 90 % und 95 %.



**Abbildung 4:** Aufbau des Geräts zur Bildaufnahme



**Abbildung 5:** Bildanalyse mit MATLAB-Software

#### 4.1.2 Auswertung der Ergebnisse

Ziel der Versuchsdurchführung ist die Charakterisierung des Pflanzenwachstums. Hierzu werden die beiden Beobachtungsparameter Frondanzahl und Frondfläche an verschiedenen Tagen jeweils mit einer der vorangegangenen Tagesmessungen verglichen. Die Zunahme der Frondanzahl und Frondfläche wird durch die

Wachstumsrate beschrieben. Diese berechnet sich mit Formel (1) nach DIN EN ISO 20079:2006.

$$r = \frac{\ln(x_{t_2}) - \ln(x_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

mit:

- $r$  Wachstumsrate je Tag
- $x$  Werte des Beobachtungsparameters: Frondanzahl oder Frondfläche
- $x_{t_1}$  Werte des Beobachtungsparameters nach  $t_1$  Tagen
- $x_{t_2}$  Werte des Beobachtungsparameters nach  $t_2$  Tagen
- $t_2 - t_1$  Zeitraum zwischen  $x_{t_1}$  und  $x_{t_2}$  in Tagen

Die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate für jede Testkonzentration wird entsprechend der Gleichung (2) berechnet:

$$i_r = \frac{r_c - r_t}{r_c} \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist:

- $i_r$  die Hemmung der mittleren spezifischen Wachstumsrate in Prozent (%)
- $r_c$  die mittlere spezifische Wachstumsrate der Kontrolle
- $r_t$  die mittlere spezifische Wachstumsrate der Testkonzentrationen

Laut DIN EN ISO 20079:2006 gilt eine Wachstumshemmung kleiner als 10 % für Abwasserproben als unbedenklich. Eine Hemmung größer als 50 % entspricht dem Absterben der Pflanzen. Die Angabe der Ergebnisse für die Abwasserprobe erfolgt dann als  $G_w$ -Wert. Der  $G_w$ -Wert beschreibt die nominell erste Verdünnungsstufe (höchste Konzentration an Abwasserprobe), bei der eine Wachstumshemmung von 10 % nicht überschritten wird.

#### **4.2 Arbeitspaket 2: Untersuchungen zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenheftes für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern**

Um den Einfluss der Probenvorbereitung auf die Untersuchung mittels Wasserlinsen-Test zu klären, wurden verschiedene Papierfabriken ausgewählt, Fragebögen erstellt und in einem persönlichen Gespräch in der Papierfabrik die Rahmenbedingungen der Produktion und Abwasserreinigungstechnologie besprochen. Die Probenahme

erfolgte in allen Werken mindestens einmal durch den Projektleiter selbst. Die zuständigen Mitarbeiter in den Papierfabriken wurden in die Besonderheiten eingewiesen und konnten bei den nachfolgenden Probenahmen die Abwasserproben selbst entnehmen und versenden.

Die Auswahl der Papierfabriken erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Untersuchung der Papierfabriken mit verschiedenen Sortenbereichen
- Untersuchung der Papierfabriken mit verschiedenen Abwasserreinigungstechniken
- Untersuchung der Papierfabriken mit und ohne Deinkinganlage

**Tabelle 4** fasst die zum Verständnis der untersuchten Papierfabriken und des Untersuchungsumfangs erforderlichen Informationen zusammen. Aus Gründen der Anonymisierung werden keine weiteren Angaben über Papiersorten, Produktionsmenge oder genauere Informationen zu den Abwasserreinigungsanlagen gemacht. Um dennoch eine Vorstellung von der Werksgröße zu bekommen, werden die untersuchten Werke gemäß der Produktionskapazität in folgende Größenklassen eingeteilt.

- „klein“ entspricht  $\leq 100.000$  Jahrestonnen
- „mittel“ entspricht  $> 100.000 \leq 250.000$  Jahrestonnen
- „groß“ entspricht  $> 250.000$  Jahrestonnen

**Tabelle 4:** Untersuchte Papierfabriken zur Erstellung des Pflichtenhefts

Herkunftsbereich	Werkscod	Sortenbereich	Werksgröße	Abwasserreinigung
Altpapier ohne Deinking	A	Verpackung	Groß	Anaerob-aerob
Altpapier mit Deinking	E	Graphisch	Groß	Aerob-aerob
	H	Recycling-Karton	Groß	Aerob-aerob

Mit dem Fragebogen wurden unter anderem folgende Angaben in den jeweiligen Papierfabriken aufgenommen und besprochen (siehe **Anhang II**):

- Gemessene chemische und physikalische Abwasserparameter an dem Tag der Probenahme
- Rohstoffeinsatz (einschl. chem. Additive) zur erzeugten Papiersorte

- Verwendete Abwassereinigungstechnik sowie Flockungsmittel, Entschäumer und andere Additive zur Anlagenkonfiguration/Betriebsführung der ARA

Nach der Untersuchung des Einflusses vom pH-Wert (pH-Wert von 5,0 bis 8,0) auf den Wasserlinsen-Test in AP 1 wurden in diesem AP die zwei pH-Werte, welche die niedrigste Wachstumshemmung auf die Wasserlinsen gezeigt haben, bei der Untersuchung des Einflusses der Konservierungsdauer auf das Testergebnis einbezogen.

Zur Untersuchung der Lagerungsbedingungen wurden die Abwasserproben in verschiedenen Temperaturen (Tiefkühlschrank, Kühlschrank, Raumtemperatur) und für die Zeiträume von einem Tag nach der Probenahme bis zur vier Wochen nach der Probenahme gelagert.

Da das Einfrieren der Abwasserprobe zu einer Erhöhung der Menge an abfiltrierbaren Stoffen (AFS) führt, wurde in diesem Arbeitspaket zunächst der Einfluss des AFS-Werts auf die Wachstumshemmung sowie die Änderung des AFS-Werts nach einer Woche Lagerung im Tiefkühlschrank untersucht. Dafür wurde die AFS der Proben erstmals direkt nach der Probenahme gemessen (nach DIN 38409 T. 2) und am gleichen Tag, an dem die Probe für den Wasserlinsen-Test verwendet wurde. Eine Menge derselben Probe wurde nach der Probenahme eingefroren und eine Woche im Tiefkühlschrank gelagert. Nach einer Woche wurden die AFS dieser Proben wieder gemessen. Danach wurden die Proben in einem 1 Liter Becherglas mittels Magnetprüher homogenisiert und für den Wasserlinsen-Test verwendet.

Im nächsten Schritt werden verschiedene Methoden zur Abtrennung der festen und kolloidal gelösten Stoffe untersucht. Dafür werden die Abwasserproben mit 4 verschiedenen Methoden (Sedimentation, Zentrifugation, Filtration mit Schwarzbandfilter und Filtration mit Membranfilter) vorbereitet und für den Wasserlinsen-Test verwendet. Die verwendeten Vorbereitungsmethoden sind folgend beschrieben:

- **Sedimentation:** nach der Probenahme wurde die Abwasserprobe in einem 1 Liter Gefäß für zwei Stunden sedimentiert und danach dekantiert.
- **Zentrifugation:** nach der Probenahme wurden die Zentrifugenbehälter (sechs Stück) mit 400 ml Abwasser aufgefüllt und 15 Minuten bei einer Drehzahl von  $5000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert.
- **Filtration der Probe:** in diesem Arbeitspaket wurde die Filtration der Probe mit **Schwarzbandfilter**, die für grobe Verschmutzungen bzw. Partikeln (schnelle

Filtration) geeignet sind und mit **Membranfilter**, die für sehr feine Partikeln genutzt werden, durchgeführt (siehe hierzu Abschnitt 3.1). Die Abwasserproben wurden nach der Probenahme einmal per Schwarzband und einmal über Membranfilter filtriert. Die Schwarzbandfiltration erfolgte immer mit 1 Liter Abwasserprobe. Für die Membranfiltration wurde 500 ml Abwasser verwendet. Für jede Abwasserprobe wurden sechs Verdünnungsstufen (V1, V2, V4, V8, V12 und V24) untersucht. Zur Festlegung eines sinnvollen Prüfkonzentrationsbereichs sowie für die endgültige Toxizitätsprüfung wurde der NOEC (No Observed Effect Concentration) für die untersuchten Abwasserproben berechnet. Der NOEC entspricht der höchsten Konzentration, bei der keine schädigende Wirkung auf die Wasserlinsen beobachtet werden kann. Wenn das Ziel darin besteht, den NOEC zu berechnen, sollte die niedrigste Testkonzentration so gewählt werden, dass das Wachstum nicht signifikant geringer als das der Kontrolle ist.

Zur Berechnung des NOEC wird die ANOVA-Methode (Analysis of Variance) verwendet. Sie dient zur Berechnung der mittleren spezifischen Wachstumsrate und der Reststandardabweichung über die Wiederholung für jede Testkonzentration. Der sich ergebende Mittelwert für jede Testkonzentration wird anschließend mit dem Kontrollmittelwert unter Verwendung des Dunnett's-Tests als geeignete Mehrfachvergleichsmethode verglichen [25].

Nach Auswertung der gewonnenen Ergebnisse für die Probenvorbereitungsmethode sowie den Lagerungsbedingungen und der Anzahl der erforderlichen Verdünnungsstufen, wurde am Ende dieses Arbeitspaketes ein Pflichtenheft für die zukünftige Testdurchführung für Papierfabriksabwässer erstellt.

#### **4.3 Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken**

In diesem Arbeitspaket wurden die Abwasserproben von 7 Papierfabriken an vier verschiedenen Stellen (Zulauf ARA, Ablauf erste biologische Stufe, Ablauf zweite biologische Stufe und Ablauf Nachkläranlage) untersucht. **Tabelle 5** fasst die untersuchten Papierfabriken sowie die erforderlichen Informationen zu jeder Papierfabrik zusammen. Die Probenvorbereitung sowie Lagerung der Proben wurde nach dem in Arbeitspaket 2 erstellten Pflichtenheft durchgeführt.

**Tabelle 5:** Untersuchte Papierfabriken für Mehrfachscreening

Herkunftsbereich	Werkscode	Sortenbereich	Werksgröße	Abwasserreinigung
Altpapier ohne Deinking	A	Verpackung	Groß	Anaerob-aerob
	B		Groß	Anaerob-aerob
Altpapier mit Deinking	C	Hygiene	Mittel	Anaerob-aerob
	D		Mittel	Anaerob-aerob
	E	Graphisch	Groß	Aerob-aerob
	F		Groß	Aerob-aerob
	G		Groß	Anaerob-aerob

Die Abwasserproben wurden von Papierfabriken mit verschiedenen Produkten (Verpackungspapiere, grafische Papiere, Hygienepapiere) entnommen. In Abhängigkeit von den hergestellten Produkten und der Zusammensetzung des Abwassers kommen in den untersuchten Papierfabriken anaerob-aerobe oder zwei-stufige aerobe Abwasserreinigungstechniken zum Einsatz. Das Ziel dieses Arbeitspaketes besteht darin, die Änderung des  $G_w$ -Werts im Laufe des Abwasserreinigungsprozesses zu beobachten.

Um den Einfluss der chemischen und physikalischen Abwasserparameter auf das Testergebnis zu quantifizieren, wurden diese Parameter vor dem Testbeginn gemessen. **Tabelle 6** fasst diese Parameter und die verwendeten Analysemethoden zusammen.

**Tabelle 6:** Chemisch-Physikalische Parameter zur Probencharakterisierung

Parameter	Messmethode
CSB	Küvettest Merck-DIN ISO15705
P <sub>ges</sub>	Küvettest Merck HC901316
NO <sub>2</sub> -N	Küvettest Merck HC015947
NO <sub>3</sub> -N	Küvettest Merck HC913062
NH <sub>4</sub> -N	Küvettest Merck HC014924
AFS	DIN 38409 T. 2
TN <sub>b</sub>	DIN 38409 T.27
AOX	DIN EN ISO 9562
Trübung	DIN EN ISO 7027:00
Oberflächenspannung	instrumentelle Messung (Krüss-Gerät) mit der Ringmethode

Anschließend wurde die Korrelation zwischen jedem Parameter und der gemessenen Wachstumshemmung untersucht.

Für eine weitere Untersuchungsreihe wurden 10 Abwasserproben mittels Wasserlinsen-Test und Fischei-Test (DIN EN ISO 15088) untersucht und die Ergebnisse korreliert. Der Fischei-Test ist als aktuelle ökotoxikologische Untersuchung in zahlreichen Anhängen der AbwV enthalten. Aktuell beinhaltet Anhang 28 „Herstellung von Papier, Karton oder Pappe“ der Abwasserverordnung keinen ökotoxikologischen Test, wohingegen bei der Herstellung von Holzfasernplatten (Anhang 13) oder bei der Zellstoffherzeugung (Anhang 19) eine Anforderung von  $G_{Ei} = 2$  eingehalten werden muss [5].

Für die Untersuchungen zum Vergleich von Fischei- und Wasserlinsen-Test wurden jeweils die selben Abwasserproben verwendet. Die Durchführung des Fischei-Tests sowie die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse wurden durch ein externes Labor vorgenommen.

Im Fischei-Test kommen die Eier des Zebraäbrblings (auch Zebrafisch) zum Einsatz [26]. Der Zebraäbrbling gehört zur Familie der Karpfenfische, ist leicht zu halten und zeichnet sich durch die ganzjährige Produktion von Eiern (transparent, nichtklebend,  $\varnothing \approx 1 \text{ mm}$ ) aus [26]. Im Zuge des Tests wird die toxische Wirkung der Wasserinhaltsstoffe auf die Fischeier mittels verschiedener Parameter gemessen. Diese beinhalten sowohl eine Störung der Embryonalentwicklung als auch ein Absterben von über 10 % der Embryonen [26].

Für die Durchführung des Fischei-Tests werden zunächst verschiedene Verdünnungsstufen aus der Abwasserprobe hergestellt. Nach dem Aufteilen der Proben, sowie Einbringen der auf Zellwachstum überprüften Fischeier findet eine Wachstumsphase und somit Exposition der Eier in den Verdünnungsstufen statt. Die Expositionsdauer beträgt 48 Stunden. Wichtig für den Test sind konstante Temperaturverhältnisse von  $26 \pm 1$  °C. Als Referenzsubstanz (Positivkontrolle) wird 3,4-Dichloranilin bei einer Konzentration von 3,7 mg/l verwendet. Es sollten folgenden Gültigkeitskriterien bei dem Fischei-Test erfüllt werden:

- Innerhalb des Testzeitraums von 48 Stunden haben in der externen Kontrollgruppe mindestens 90 % der Embryonen überlebt
- Im internen Kontrollansatz starb nicht mehr als ein Ei
- Mit der Positivkontrolle (3,7 mg/l 3,4-Dichloranilin) wurde mehr als 10 % Effekt erzielt

#### **4.4 Arbeitspaket 4: Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung**

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse wurden die Abwasserproben des Endablaufs von sieben Papierfabriken dreimal unter gleichen Bedingungen innerhalb der Projektlaufzeit am PMV untersucht. Diese Untersuchung ermöglicht, die Schwankungen in den Messergebnissen bei gleichen Produktions- und Abwasserreinigungsverfahren zu bewerten. Aufgrund der coronabedingten Kontakteinschränkungen konnten statt der im Antrag vorgesehenen 8 Papierfabriken nur 7 beprobt werden (siehe Abschnitt 2.2.4). **Tabelle 7** fasst die Informationen der untersuchten Papierfabriken zusammen.

**Tabelle 7:** Informationen der Papierfabriken für Reproduzierbarkeitsuntersuchung

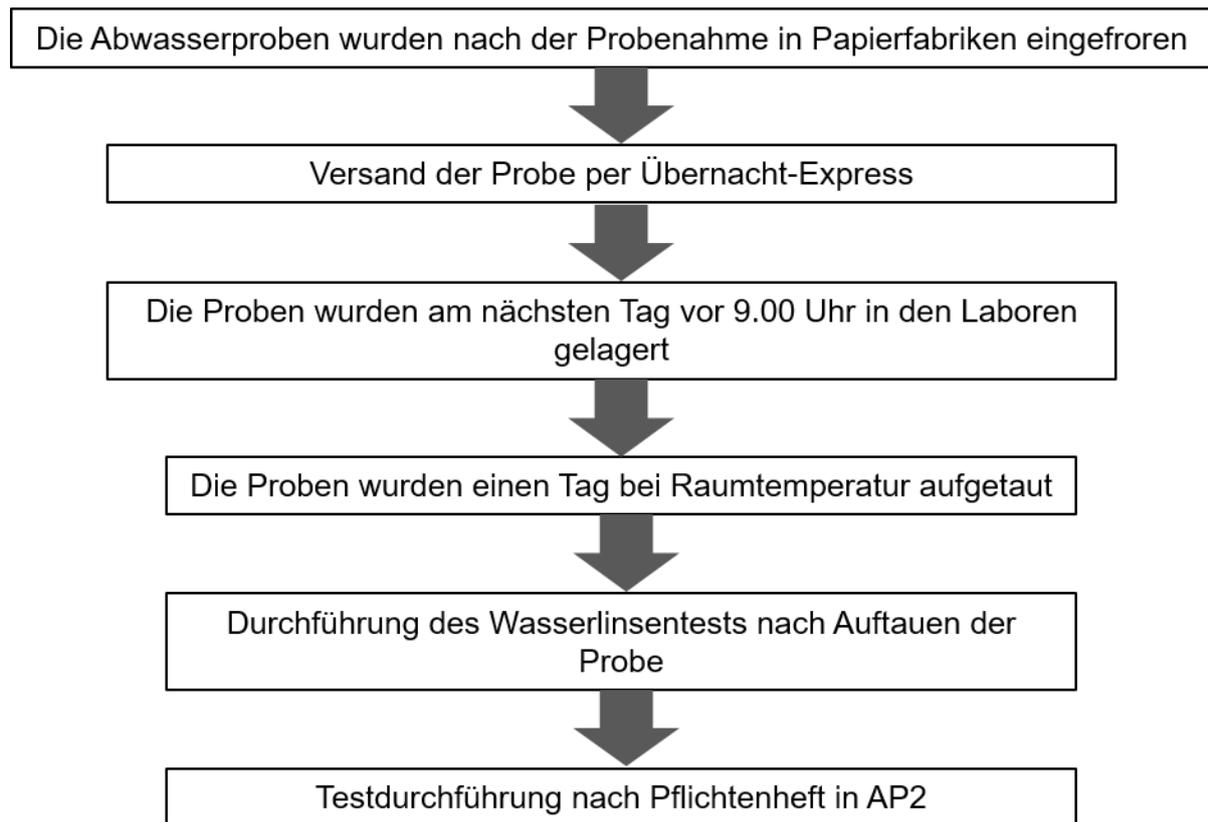
Herkunftsbereich	Werkscod	Sortenbereich	WerksgroÙe	Abwasserreinigung
Altpapier ohne Deinking	A	Verpackung	GroÙ	Anaerob-Aerob
	B		GroÙ	
Altpapier mit Deinking	C	Hygiene	Mittel	Anaerob-Aerob
	D		Mittel	
	E	Graphisch	GroÙ	Aerob-Aerob
	F		GroÙ	
	G		GroÙ	Anaerob-aerob

Für die Laborvergleichsuntersuchungen wurde der Wasserlinsen-Test unter gleichen Bedingungen mit denselben Abwasserproben in drei Laboren durchgeführt. Die Liste der untersuchten Abwasserproben ist in **Tabelle 8** zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Informationen zu untersuchten Papierfabriken für die Laborvergleichsuntersuchung

Herkunftsbereich	Werkscod	Sortenbereich	WerksgroÙe	Abwasserreinigung
Altpapier ohne Deinking	A	Verpackung	GroÙ	Anaerob-Aerob
	B		GroÙ	
Altpapier mit Deinking	C	Hygiene	Mittel	Anaerob-Aerob
	F	Graphisch	GroÙ	Aerob-Aerob
Frischfaser	I	Spezial	GroÙ	Aerob-aerob

Die Abwasserproben wurden nach der Probenahme eingefroren und am nächsten Tag per Übernachtexpress mit der Zustelloption „Eintreffen vor 9:00 Uhr“ an die Labore verschickt. Der festgelegte Plan für die Laborvergleichsuntersuchungen ist in **Abbildung 6** dargestellt. Für die Laborvergleichsuntersuchungen wurde der Wasserlinsen-Test in drei Laboren analog zu AP 2 durchgeführt.



**Abbildung 6:** Arbeitsplan für die Laborvergleichsuntersuchungen

## 5 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse, der in Kapitel 4 beschriebenen Versuche vorgestellt und diskutiert.

### 5.1 Arbeitspaket 1: Etablierung des Lemna-Tests

Ein beispielhafter Verlauf des Wasserlinsenwachstums für die Kontrolle ist in **Abbildung 7** gezeigt. Es konnte dabei ein exponentielles Wachstum der Wasserlinsen in 7 Tagen beobachtet werden. Das Wachstum der Wasserlinsen verläuft in den ersten zwei Tagen sehr langsam. Dies ist die notwendige Zeit zur Adaption an die neue Wachstumsumgebung. Von Tag 2 bis Tag 5 und weiterhin bis Ende des Tests wurde anschließend eine hohe Wachstumsrate der Wasserlinsen beobachtet.



Tag 0 (Testbeginn)  
Frondanzahl: 11  
Frondfläche: 66,07 mm<sup>2</sup>



Tag 2  
Frondanzahl: 19  
Frondfläche: 93,86 mm<sup>2</sup>



Tag 5  
Frondanzahl: 60  
Frondfläche: 320,62 mm<sup>2</sup>

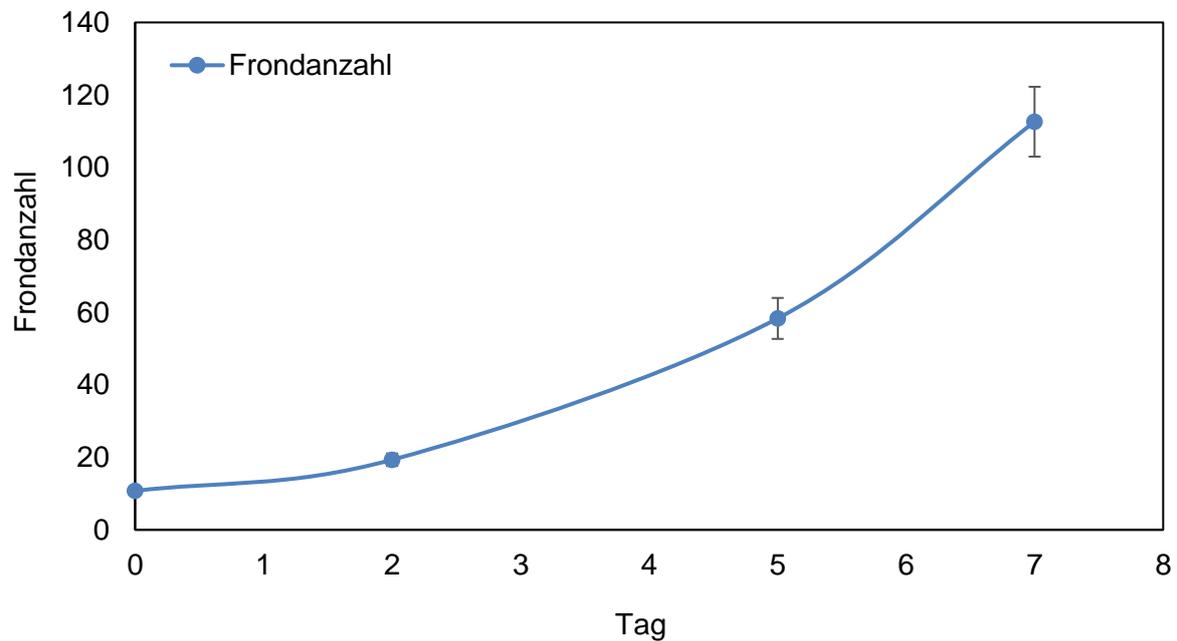


Tag 7 (Testende)  
Frondanzahl: 117  
Frondfläche: 739,83 mm<sup>2</sup>

**Abbildung 7:** Beispielhafter Verlauf des Wasserlinsenwachstums der Kontrolle

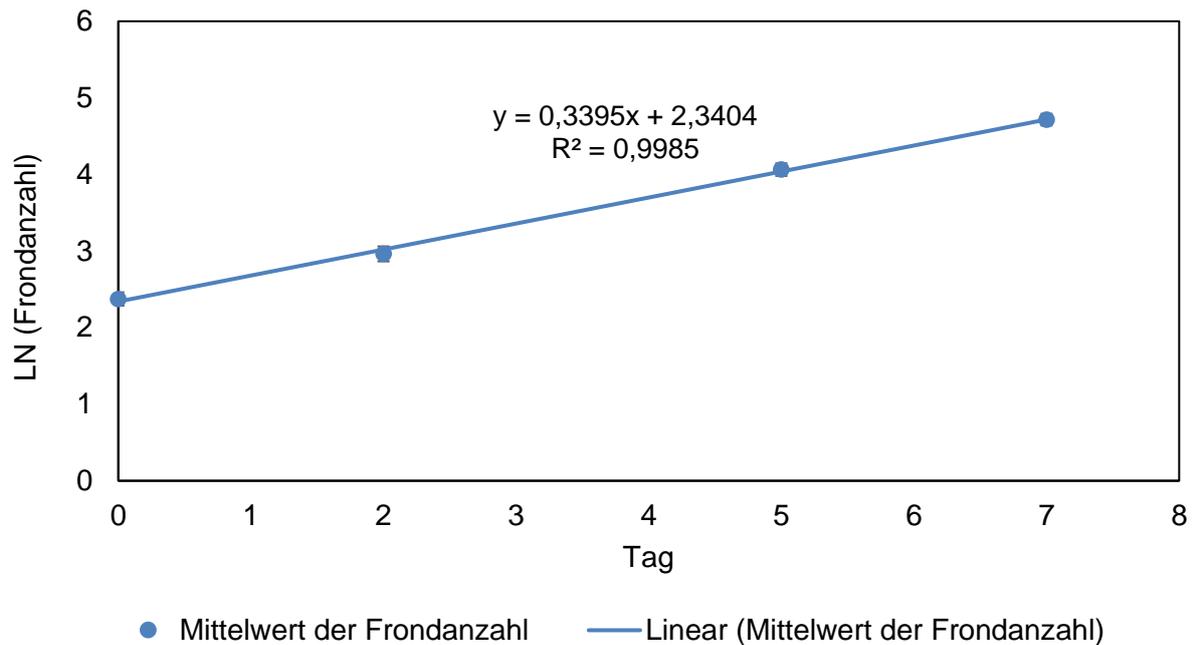
In **Abbildung 8** ist der Verlauf der mittleren Frondzahlen (absolute Werte) in den Kontrollansätzen dargestellt. Die Fehlerindikation symbolisiert die zugehörigen Standardabweichungen.

Gegen Testende steigt die Abweichung an. Dieser Effekt kann durch biologisches Wachstum, das trotz gleicher Versuchsbedingungen in jedem Becherglas etwas anders verläuft, begründet werden.



**Abbildung 8:** Exemplarischer Verlauf der Mittelwerte der Fronanzahl für die Kontrollansätze über 7 Tage

Laut DIN-Norm sollte dabei ein exponentielles Wachstum in Kontrollansätzen vorliegen. Diese kann anhand einer Regressionsgeraden und deren Bestimmtheitsmaß erfolgen. **Abbildung 9** stellt das logarithmische Wachstum der Wasserlinsen in 7 Tagen dar. Dargestellt ist ebenfalls nur die Auswertung der Fronanzahl, die Betrachtung der Frondfläche verläuft identisch.



**Abbildung 9:** Darstellung der logarithmierten Anzahlparameter über die Messtage

Der berechnete Wert für  $R^2 = 0,99$  in **Abbildung 9** zeigte ein lineares Wachstum der Wasserlinsen in Kontrolle innerhalb der Testlaufzeit.

Es sollten die folgenden Gültigkeitskriterien laut DIN-Norm bei über 90 % der durchgeführten Versuche innerhalb des Projektes erfüllt werden:

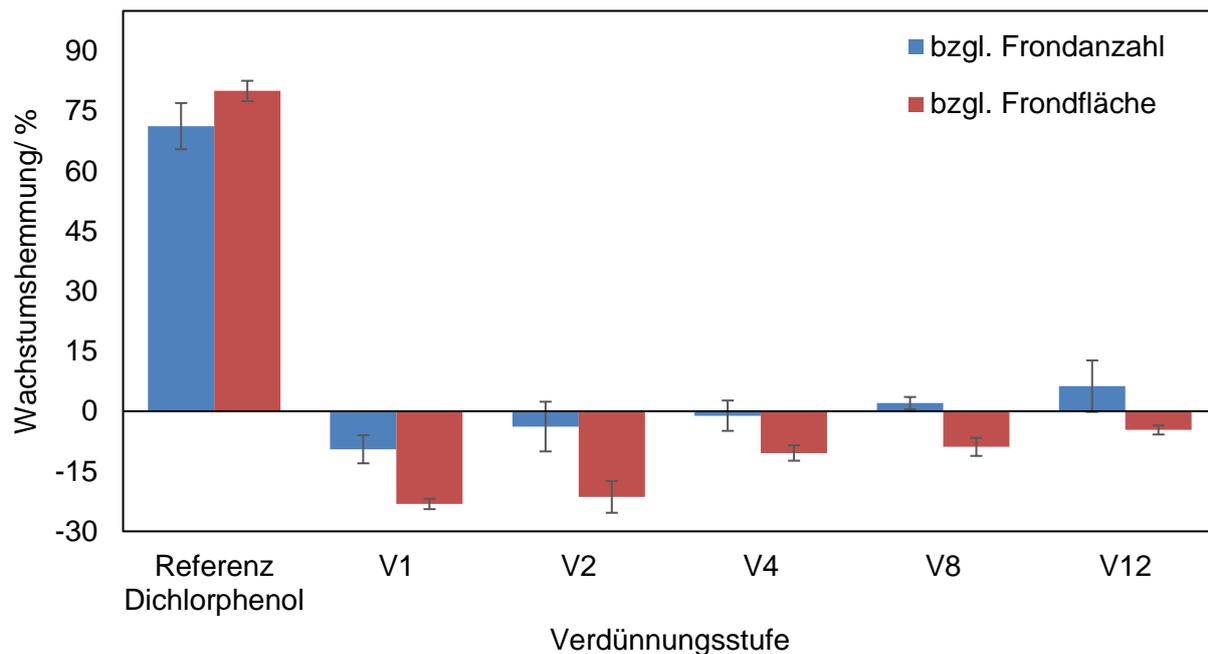
- die Fronanzahl in den Kontrollen weist eine mittlere spezifische Wachstumsrate von mindestens 0,275 je Tag auf. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von etwa 2,5 Tagen und einem 7fachen Anstieg der mittleren Fronanzahl bei Testende.
- Die  $EC(r)_{50}$  (Fronanzahl) für 3,5-Dichlorphenol in modifiziertem STEINBERG-Medium liegt zwischen 2,2 mg/l und 3,8 mg/l.

Bei Versuchen, die diese Gültigkeitskriterien nicht erfüllten, wurde der Test wiederholt. Für die Bewertung der Reproduzierbarkeit des Wasserlinsen-Tests wurde der Test zunächst dreimal unter gleichen Bedingungen und in drei verschiedenen Fächern im Klimaschrank mit einer desintegrierten Papierprobe (nach PTS-Methode RH-014/2015, siehe Abschnitt 2.2.14.1) wiederholt. Die Gültigkeitskriterien können durch folgende Punkte nachgewiesen werden:

- Bei den Untersuchungen ergab sich ein Mittelwert von 65 % für die Hemmungsrate der Referenzansätze.

- Die mittlere Frondanzahl am Testende zeigte einen siebenfachen Anstieg. Allerdings konnte nicht an allen Messtagen eine Wachstumsrate von mindestens 0,275 je Tag für die Kontrollansätze erreicht werden.

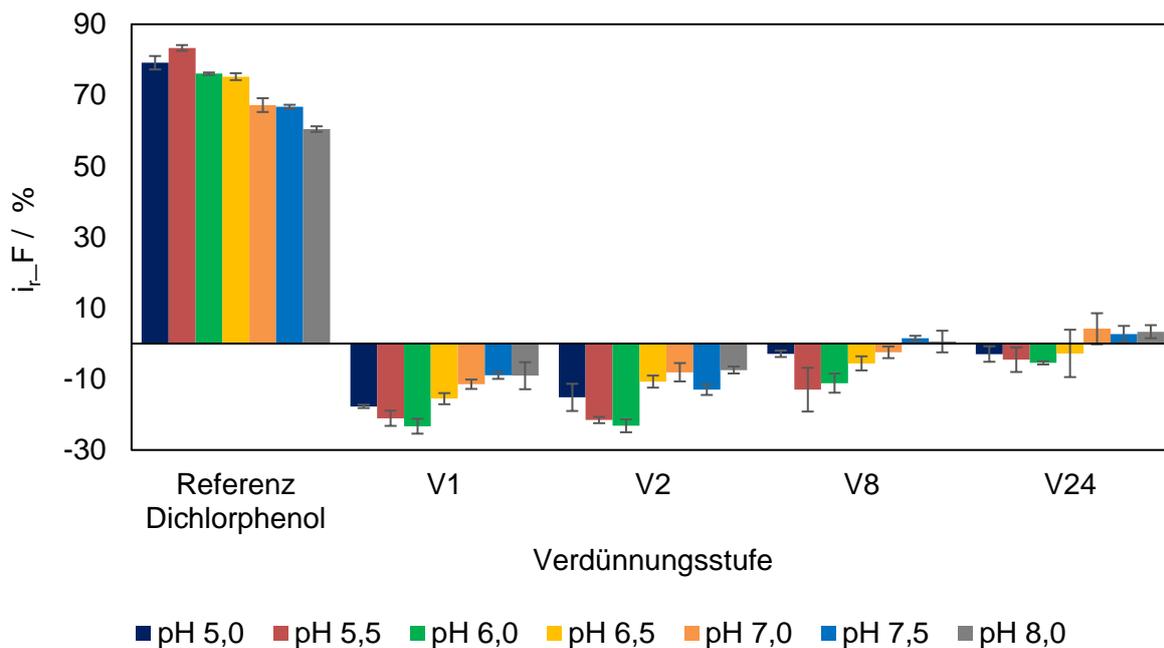
Nach Überprüfung der Gültigkeitskriterien können die Wachstumshemmungen der einzelnen Verdünnungsstufen und Referenzproben für die untersuchte desintegrierte Papierprobe im Vergleich zu den Kontrollwerten bezüglich der Frondzahlen (ir\_Z) und Frondflächen (ir\_F) dargestellt werden (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle

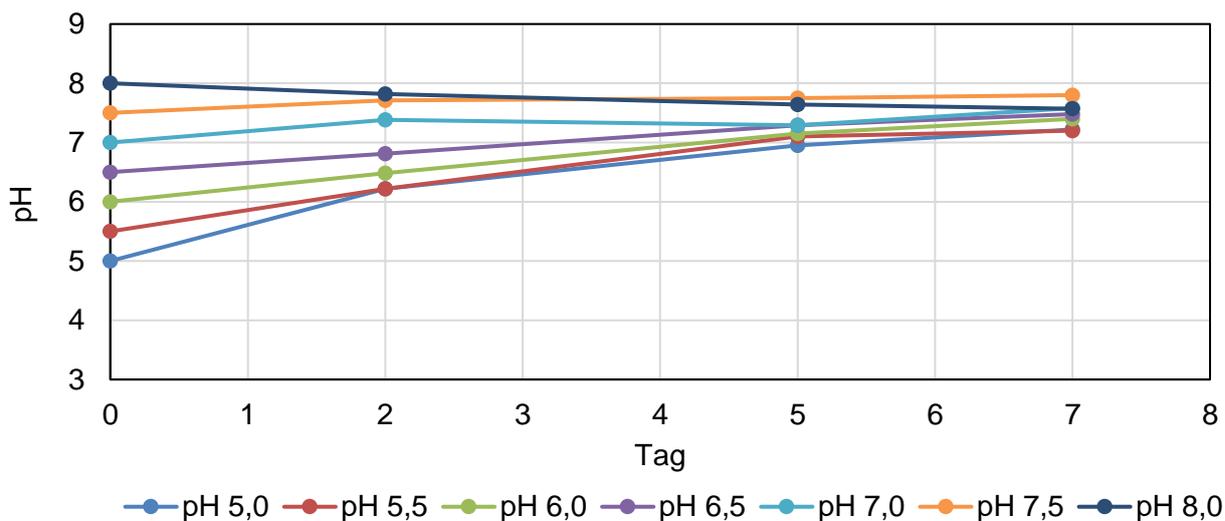
Laut DIN-Norm ist eine Wachstumshemmung kleiner als 10 % in den untersuchten Proben ist unbedenklich. Werte größer als 50 % entsprechen dem Absterben der Wasserlinsen. In keiner der untersuchten Verdünnungsstufen wurde eine Wachstumshemmung von mehr als 10 % gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Proben mit einer höheren Verdünnungsstufe (entspricht einer geringeren Konzentration an Papierprobe) größere Wachstumshemmungen aufweisen. Somit ist das Pflanzenwachstum in der unverdünnten Probe (V1) am höchsten.

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf das Testergebnis wurde der Wasserlinsen-Test mit einer desintegrierten Papierprobe (nach PTS-Methode RH-014/2015, siehe Abschnitt 4.1) für die pH-Werte von 5,0 bis 8,0 durchgeführt. Die Wachstumshemmung der vier Verdünnungsstufen und Referenzproben im Vergleich zu den Kontrollwerten bezüglich der Frondfläche (ir\_F) ist in **Abbildung 11** dargestellt.



**Abbildung 11:** Wachstumshemmung der verschiedenen Verdünnungsstufen bzgl. der eingestellten pH-Werte

Die Wachstumshemmung für die Proben mit pH-Werten von 5,5 und 6,0 ist am geringsten. Der pH-Wert der unverdünnten Proben (V1) - unabhängig von dem eingestellten pH-Wert am Testbeginn - hat einen Wert von  $7,3 \pm 0,2$  am Testende gezeigt. Die anderen Verdünnungsstufen weisen einen pH-Wert von  $6,5 \pm 0,2$  am Testende auf. **Abbildung 12** zeigt den Verlauf der pH-Werte für eine unverdünnte Probe über 7 Tage.



**Abbildung 12:** Beispielhafter Verlauf des pH-Werts innerhalb der Testlaufzeit in V1

Es wird deutlich, dass der pH-Wert der Proben über 7 Tage nicht konstant bleibt. Allerdings kann die manuelle Einstellung des pH-Wertes den absoluten Wert in den ersten fünf Tagen beeinflussen. Je geringer der eingestellte pH-Wert in dem untersuchten pH-Bereich zwischen 5,0 und 8,0 ist, desto ausgeprägter ist dabei die stattfindende Veränderung. Vor allem in den ersten zwei Tagen steigt der pH-Wert deutlich. Der Anstieg verringert sich von Tag 2 bis Tag 5 und bleibt von Tag 5 bis Tag 7 nahezu konstant. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein besseres Wasserlinsenwachstum bei einem pH-Wert von 5,5 bis 6,5 vorliegt (siehe **Abbildung 11**). Am Ende der Versuchsdauer nähert sich der pH-Wert bei allen untersuchten Varianten dem Referenzwert bzw. Probenstandard von 7,5 an (siehe **Abbildung 12**). Durch die Verringerung des pH-Wertes zu Beginn einer Messreihe wird somit vor allem in den ersten Versuchstagen ein erhöhtes Wachstum der Wasserlinsen durch das Durchqueren der optimalen Wachstumszone erreicht.

## 5.2 Arbeitspaket 2: Untersuchung zum Einfluss der Probenvorbereitung / Erstellung eines Pflichtenhefts für die zukünftige Testdurchführung in Papierfabriksabwässern

Zur Erstellung eines Pflichtenheftes zur einheitlichen Testdurchführung wurden Abwasserproben des Ablaufs der Nachkläranlage von den folgenden Papierfabriken untersucht (siehe **Tabelle 4**):

- Wellpappenrohpaperhersteller mit anaerob-aerober ARA (Werk A)
- Graphische Papierhersteller mit aerob-aerober ARA (Werk E)
- Recycling-Kartonhersteller mit aerob-aerober ARA (Werk H)

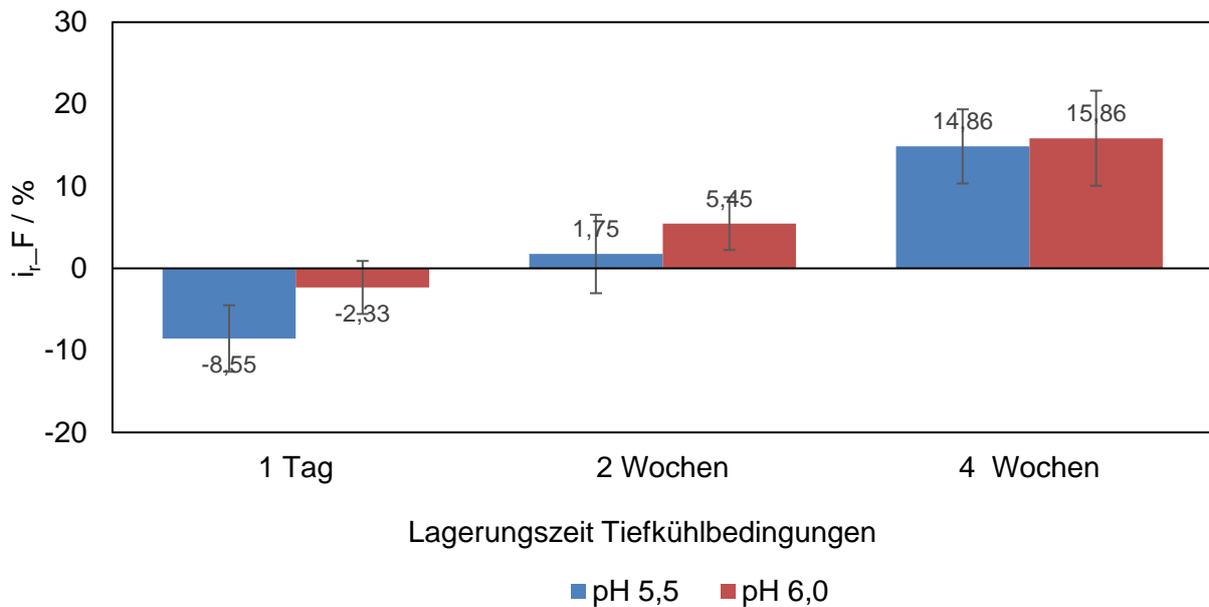
Die Abwasserproben wurden persönlich von den Papierfabriken entnommen und zur Untersuchung des Einflusses der Konservierungsbedingungen unter verschiedenen Bedingungen gelagert.

In diesem Arbeitspaket wurde der Einfluss verschiedener Parameter (pH, Temperatur, Probenvorbereitungsmethode) über Zeiträume von 1 Tag bis 4 Wochen nach der Probenahme untersucht. Laut den bisherigen Untersuchungen wurden höhere  $G_w$ -Werte (entspricht höhere Wasserlinsen-Toxizität) mit anaerob-aerob behandelten Abwasserproben gemessen. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung des Einflusses des pH-Werts und der Temperatur auf das Testergebnis, die

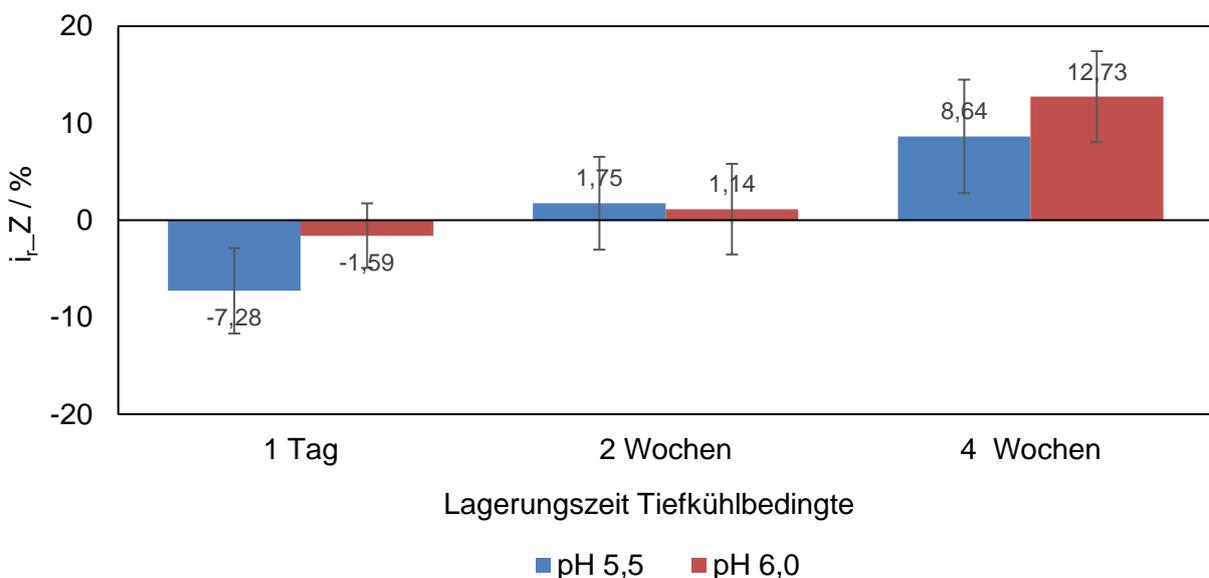
Abwasserprobe des Verpackungsherstellers, der über eine anaerob-aerob ARA verfügt, untersucht.

### 5.2.1 pH-Wert

Der Einfluss des pH-Werts auf den Wasserlinsen-Test wurde bereits in AP 1 für die pH-Werte 5,0 bis 8,0 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die niedrigste Wachstumshemmung der Wasserlinsen bei einem pH-Wert von 5,5 und 6,0 erreicht wurde. Aus diesem Grund wurden bei der Untersuchung des Einflusses der Konservierungsdauer auf das Testergebnis nur diese zwei pH-Werte einbezogen. Diese Untersuchung wurde für das Abwasser von der Nachkläranlage des Wellpappenrohropapierherstellers mit anaerob-aerober ARA durchgeführt (Werk A). Nach Probenahme wurde das Abwasser zwei Stunden zum Sedimentieren grober Schwebstoffe gelagert und anschließend die Abwasserprobe dekantiert und eingefroren. Die gewonnenen Ergebnisse für die Wachstumshemmung der Abwasserprobe aus Werk A über der Lagerungszeit unter Tiefkühlbedingungen für zwei verschiedene pH-Werte sind in **Abbildung 13** und **Abbildung 14** auf Basis der Frondfläche und Frondanzahl für Verdünnungsstufe 2 (V2) dargestellt.



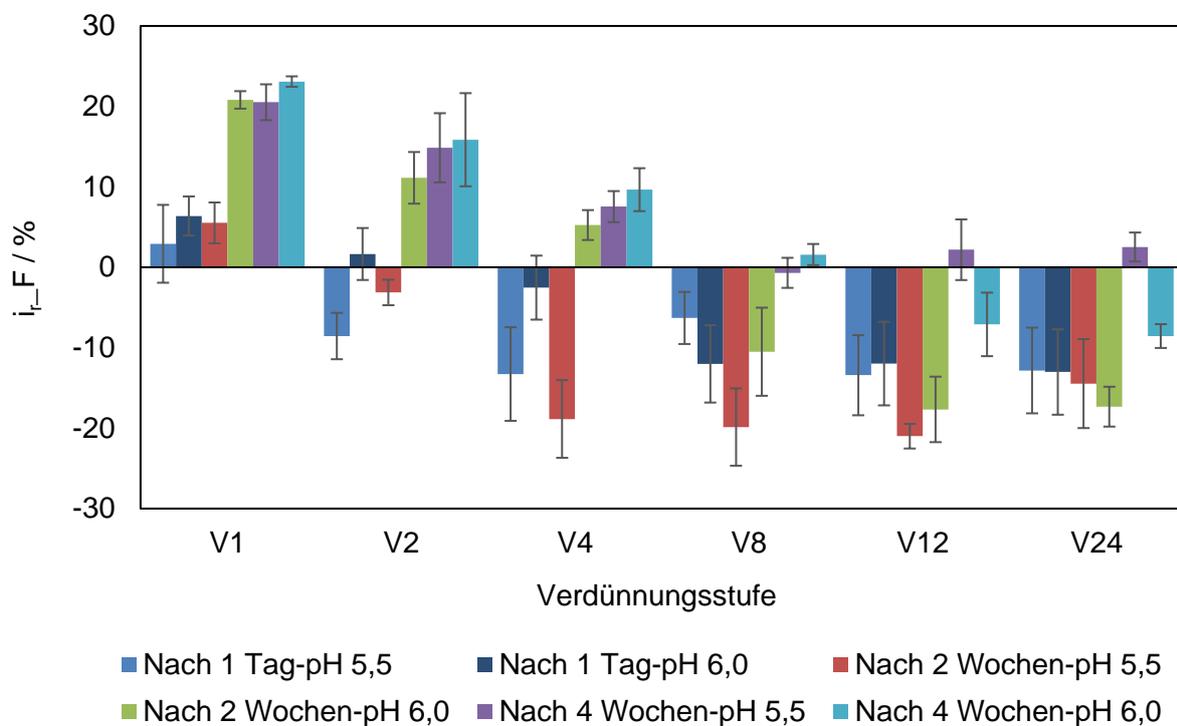
**Abbildung 13:** Einfluss des pH-Werts auf die Wachstumshemmung (bzgl. der Frondfläche) über der Lagerungszeit für V2



**Abbildung 14:** Einfluss des pH-Werts auf Wachstumshemmung (bzgl. der Frondanzahl) über der Lagerungszeit für V2

Die Daten der zwei verschiedenen pH-Werte zeigen eine ähnliche Tendenz für die Änderung der Wachstumshemmung über der Lagerungszeit. Allerdings wurde der niedrigste Wert für die Wachstumshemmung mit pH 5,5 erzielt. Trotz einer Änderung des pH-Wertes über die Zeit haben die Wasserlinsen ein besseres Wachstum im Abwasser mit niedrigem pH-Wert (5,5) gezeigt. Dies kann auch in **Abbildung 15** für die verschiedenen Verdünnungsstufen beobachtet werden. Es konnte dabei gezeigt

werden, dass die Wachstumshemmung für Proben mit höherer Verdünnungsstufe (entspricht hohem Wasseranteil) niedriger ist. Dieser Effekt kann durch den geringeren Einfluss der Abwasserinhaltsstoffe auf das Wasserlinsenwachstum begründet werden. Außerdem ist die zeitliche Änderung des pH-Werts für die höheren Verdünnungsstufen deutlich langsamer. Der pH-Wert der Proben ab V4 lag nach 7 Tagen bei  $6,5 \pm 0,5$ , wohingegen ein pH-Wert von über 7,5 für die Proben von V1 und V2 gemessen wurde. Da die Einstellung des pH-Werts auf 5,5 in einem besseren Wachstum der Wasserlinsen resultiert und kein großer Unterschied für die Änderung der Wachstumshemmung über die Zeit bzgl. der untersuchten pH-Werte beobachtet wurde, sind die weiteren Versuche mit dem pH-Wert von 5,5 durchgeführt worden.

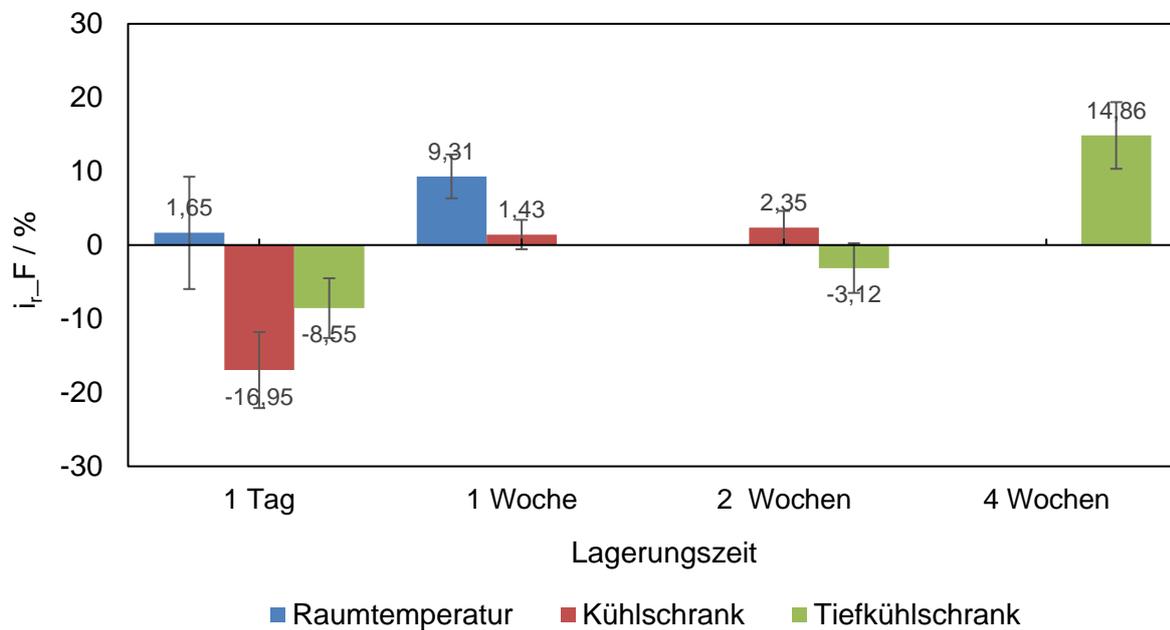


**Abbildung 15:** Beispielhafter Verlauf des pH-Werts für verschiedene Verdünnungsstufen

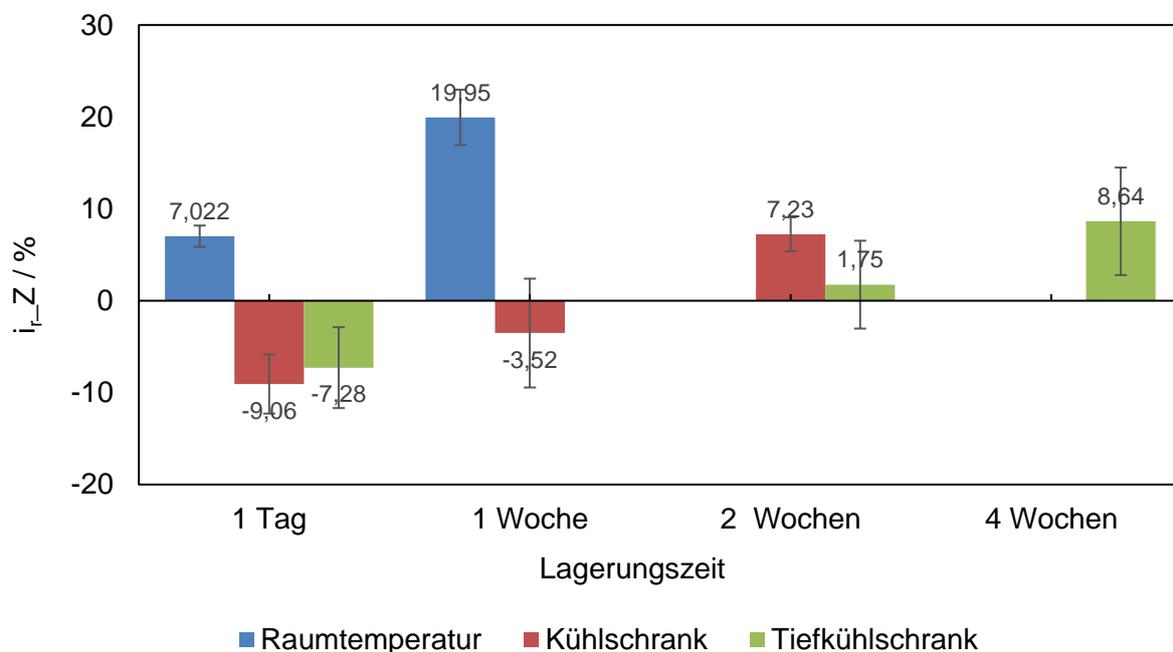
### 5.2.2 Temperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Konservierungstemperatur auf das Testergebnis wurden Abwasserproben aus Werk A nach zwei Stunden Sedimentation über verschiedene Zeiträume (1 Tag nach Probenahme bis 4 Wochen nach Probenahme) bei Raumtemperatur (24 °C), im Kühlschrank (4 °C) und im Tiefkühlschrank (-18 °C) gelagert. Für die untersuchten Abwasserproben wurde eine Wachstumshemmung unter dem Schwellenwert von 10 % erst ab Verdünnungsstufe 2 ( $G_w = 2$ ) auf Basis der Frondanzahl und Frondfläche für die untersuchten Temperaturen erreicht. **Abbildung**

**16** und **Abbildung 17** stellen die gewonnenen Ergebnisse für die Änderung der Wachstumshemmung der Wasserlinsen über die Lagerungszeit bei verschiedenen Konservierungstemperaturen für V2 dar.



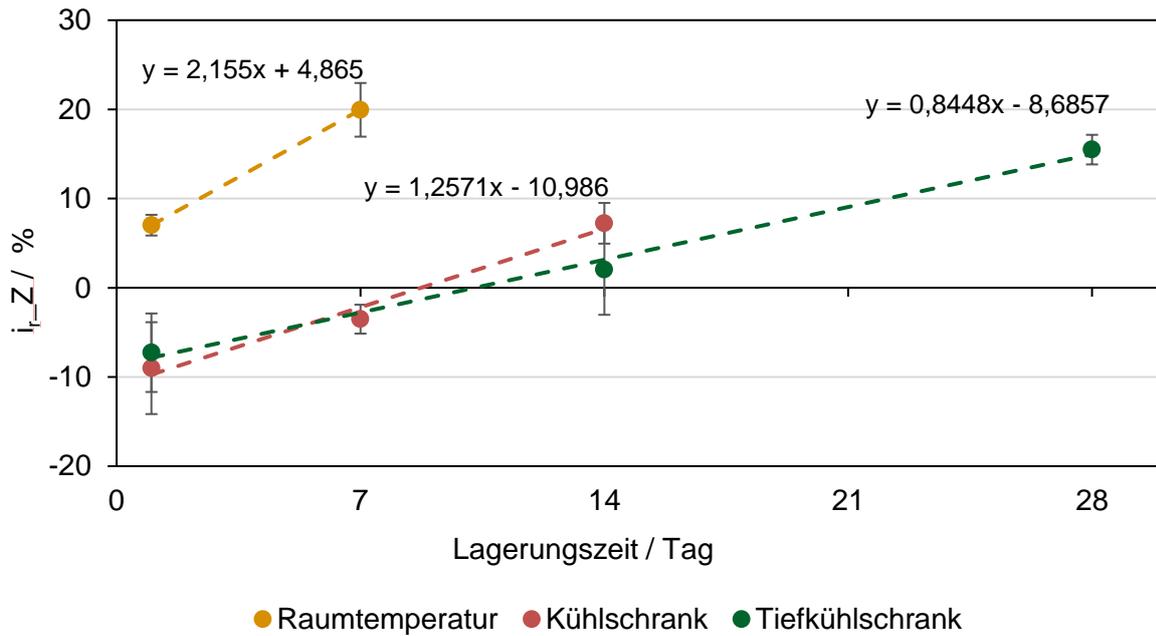
**Abbildung 16:** Einfluss der Konservierungstemperatur auf die Wachstumshemmung (bzgl. der Frondfläche) bei verschiedenen Lagerungszeiträumen



**Abbildung 17:** Einfluss der Konservierungstemperatur auf die Wachstumshemmung (bzgl. der Frondanzahl) bei verschiedenen Lagerungszeiträumen

Die bei Raumtemperatur konservierte Abwasserprobe zeigte zeitlich eine deutliche Steigerung der Wachstumshemmung und lag nach einer Woche bei über 10 %. Eine

ähnliche Tendenz wurde für die im Kühlschrank konservierte Abwasserprobe im Zeitraum von einem Tag bis zu einer Woche nach der Probenahme auf Basis der Frondfläche auch beobachtet. Im weiteren Verlauf von einer bis zwei Wochen Lagerung wies sie aber nur noch eine geringe Änderung der Wachstumshemmung auf. Die im Kühlschrank konservierte Probe zeigte auf Basis der Frondanzahl im Zeitraum von bis zu einer Woche nach Probenahme eine niedrige Änderung der Wachstumshemmung. Im weiteren Untersuchungszeitraum von einer bis zwei Wochen nach Probenahme fand ein beschleunigtes/erhöhtes Wachstum statt. Da die Wachstumshemmung der Wasserlinsen nach einer Woche Konservierung im Kühlschrank noch unter 10 % und sogar im negativen Bereich (bzgl. der Frondanzahl) lag, ist davon ausgehen, dass die Konservierung der Abwasserprobe bis zu einer Woche im Kühlschrank die Abwassereigenschaften nicht deutlich negativ beeinflusst. Die niedrigste zeitliche Änderung der Wachstumshemmung wurde mit im Tiefkühlschrank konservierten Abwasserproben bei einer Konservierungsdauer von bis zu zwei Wochen erreicht. Bei einer weiteren Verlängerung der Lagerungsdauer von zwei Wochen bis vier Wochen wurde jedoch eine deutliche Erhöhung der Wachstumshemmung beobachtet. Der niedrigste Wert der Wachstumshemmung im Versuchszeitraum wurde ebenfalls bei der konservierten Abwasserprobe im Tiefkühlschrank erreicht. In **Abbildung 18** ist der lineare Zusammenhang der Wachstumshemmung über die Konservierungszeit für die untersuchten Konservierungstemperaturen auf Basis der Frondanzahl dargestellt.

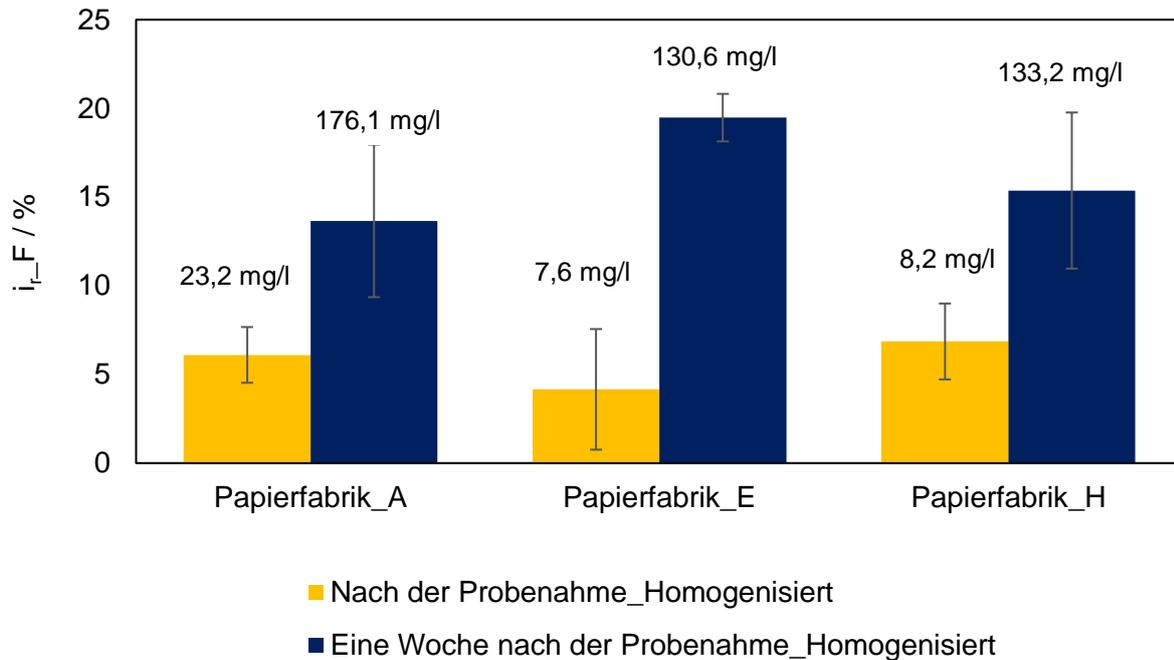


**Abbildung 18:** Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung der konservierten Proben bei verschiedenen Temperaturen über die Lagerungszeit

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Wachstumshemmung der Wasserlinsen über die Lagerungszeit beobachtet werden. Die höchste zeitliche Steigerung wurde bei Lagerung bei Raumtemperatur und die niedrigste bei tiefgefrorenen Proben beobachtet. Allerdings wird die Lagerung der Abwasserprobe länger als zwei Wochen im Tiefkühlschrank nicht empfohlen. Somit wird die Konservierung der Abwasserprobe im Tiefkühlschrank bis zu zwei Wochen als geeignete Methode für die weiteren Versuche betrachtet.

### 5.2.3 Probenvorbereitungsmethode

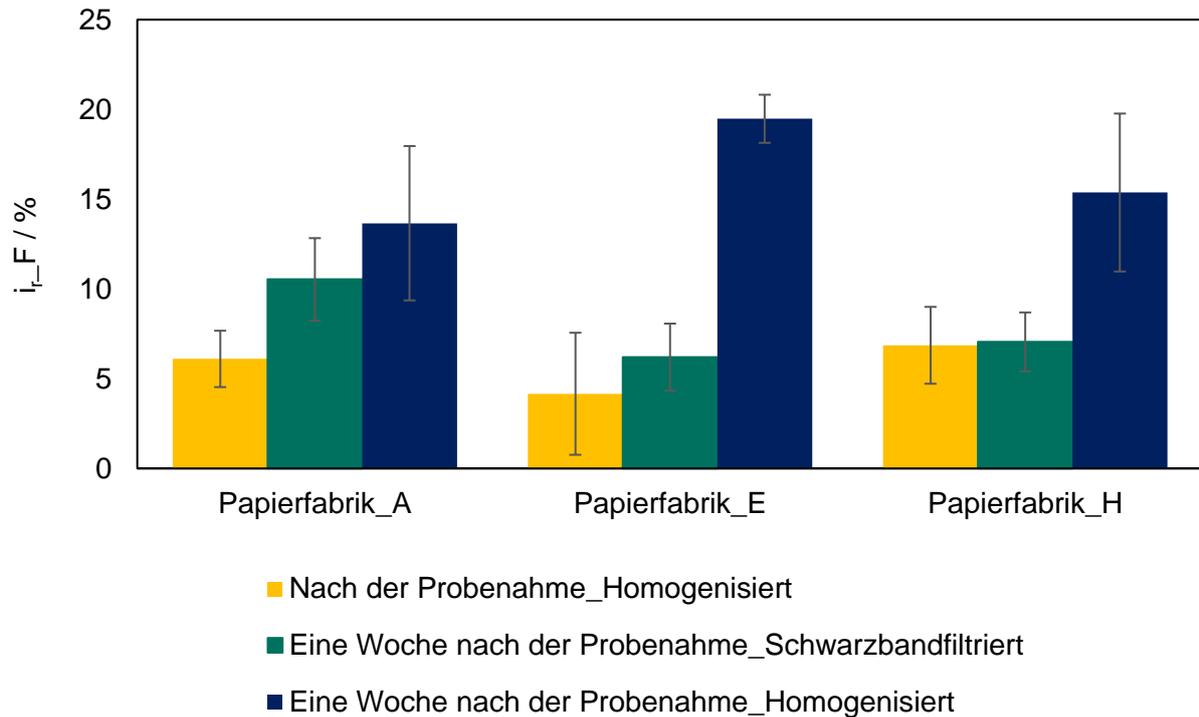
Zur Untersuchung des Einflusses der abfiltrierbaren Stoffe (AFS) auf das Testergebnis wurde von drei Papierfabriken (siehe **Tabelle 4**) Abwasserproben genommen. **Abbildung 19** stellt die gewonnenen Daten der Wachstumshemmung der Abwasserprobe direkt nach der Probenahme und eine Woche nach der Probenahme (Lagerung unter Tiefkühlbedingungen) dar. Die eingefrorenen Abwasserproben wurden einen Tag vor Testbeginn bei Raumtemperatur aufgetaut und vor dem Test in einem 1 Liter Becherglas mittels Magnetrührer homogenisiert. Die oberen Werte, die den Spalten zugeordnet sind, entsprechen dem AFS-Wert der untersuchten Abwasserproben.



**Abbildung 19:** Wachstumshemmung der homogenisierten Abwasserproben direkt und eine Woche nach der Probenahme

Die AFS der Abwasserproben nach einer Woche Lagerung im Tiefkühlschrank sind deutlich erhöht. Dieser Wert lag direkt nach der Probennahme bei unter 25 mg/l für alle drei Abwasserproben. Einfrieren der Proben bzw. eine eintretende Kristallisation führt zu einer Steigerung des AFS-Werts (> 120 mg/l). Der hohe AFS-Wert der Abwasserprobe kann die Wachstumshemmung deutlich beeinflussen.

Um den Einfluss der AFS auf die Wachstumshemmung genauer zu untersuchen, wurden die selben Abwasserproben nach einer Woche Lagerung im Tiefkühlschrank schwarzbandfiltriert und dann für den Wasserlinsen-Test verwendet. **Abbildung 20** vergleicht die gemessene Wachstumshemmung für die homogenisierten und filtrierten Abwasserproben nach einer Woche Lagerung im Tiefkühlschrank mit den homogenisierten Abwasserproben direkt nach der Probenahme.

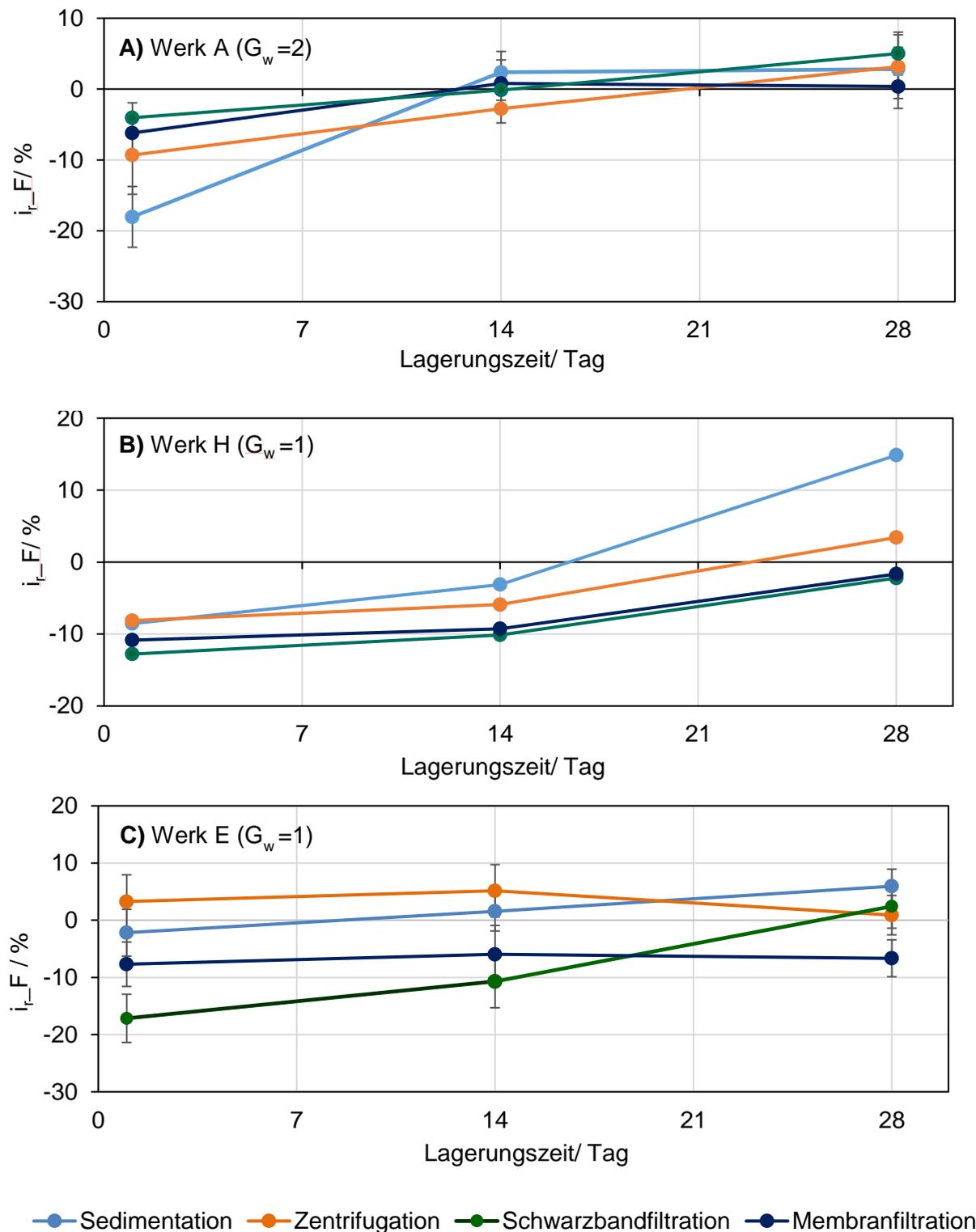


**Abbildung 20:** Vergleich der Wachstumshemmung der homogenisierten und filtrierten Abwasserprobe nach eine Woche Lagerung im Tiefkühlschrank

Für die nach dem Einfrieren per Schwarzbandfilter behandelte Abwasserprobe wurde eine deutlich geringere Wachstumshemmung erzielt. Die Wachstumshemmung der filtrierten Proben nach Einfrieren ist fast genauso wie die Wachstumshemmung der Probe, die direkt nach der Probenahme getestet wurden. Es ist zu beachten, dass ungeeignete Lagerungsbedingungen und Vorbereitungsmethoden die Eigenschaften der Abwasserprobe deutlich beeinflussen können und eine unbedenkliche Probe als toxisch/bedenklich klassifiziert werden könnte.

Zur Untersuchung der geeigneten Vorbereitungsmethoden wurden die Abwasserproben von drei verschiedenen Papierfabriken (Werk A, E, H) für einen Zeitraum von einem Tag bis vier Wochen nach der Probenahme im Tiefkühlschrank gelagert und die Proben dann unterschiedlich filtriert (siehe Kapitel 4.2). Diese Untersuchungen dienen vor allem dazu, den Einfluss der im Abwasser enthaltenen Feststoffe unterschiedlicher Partikelgröße bewerten zu können. Daraus sollte die Methode abgeleitet werden, die die geringste Änderung der Wachstumshemmung

über die Lagerungszeit ergibt. Die gewonnenen Ergebnisse sind in den folgenden **Abbildung 21 A-C** dargestellt.



**Abbildung 21:** Einfluss der verschiedenen Vorbereitungsmethoden auf die Wachstumshemmung bei verschiedenen Lagerungszeiten. **A)** Werk A **B)** Werk H **C)** Werk E

Die Betrachtung der Wachstumshemmung in den Abwasserproben der Papierfabriken für A und E zeigt, dass für die schwarzbandfiltrierten und membranfiltrierten Abwasserproben eine sehr niedrige Änderung der Wachstumshemmung über der Zeit auftrat. Bei den von den Werken A und H (**Abbildung 21 A und B**) untersuchten Abwasserproben zeigte die sedimentierte Abwasserprobe eine hohe Änderung der Wachstumshemmung innerhalb einer Woche (Werk A) oder von der ersten Woche bis zur zweiten Woche (Werk H). Die Änderung der Wachstumshemmung für die zentrifugierten Abwasserproben lieferten unterschiedliche Tendenz bei den Werken. Die Filtration der Abwasserprobe per Schwarzbandfilter führte für das Abwasser des Wellpappenrohropapierherstellers (Werk A) und das Abwasser aus der graphischen Papierherstellung (Werk E) nur zu einer geringen zeitlichen Änderung der Wachstumshemmung. Diese Vorbereitungsmethode konnte bei dem Recyclingkarton-Hersteller (Werk H) auch zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Obwohl die Filtration der Abwasserproben mittels Membranfilter ebenfalls nur zu einer geringen Änderung der Wachstumshemmung über die Lagerungsdauer führt, wurde diese aber wegen der Abtrennung der vorhandenen Schwebstoffe nicht mehr berücksichtigt. Eine vollständige Abtrennung der Schwebstoffe über das Membranfilterverfahren führt zur einer unrealistischen Probenzusammensetzung bzw. Probenreinheit. Daher wurde die Filtration der Abwasserprobe per Schwarzbandfilter als die geeignete Vorbereitungsmethode für den Wasserlinsen-Test betrachtet.

#### 5.2.4 Anzahl der Verdünnungsstufen

Bei der Untersuchung der Abwassertoxizität mithilfe definierter Verdünnungsstufen bezeichnet die niedrigste Verdünnungsstufe ohne Wirkung (NOEC) die am höchsten konzentrierte Verdünnungsstufe, bei der keine Hemmung im Sinne des Verfahrens festgestellt wird oder lediglich Effekte auftreten, welche die testspezifische Variabilität nicht überschreiten. Der NOEC-Wert entspricht dem Endpunkt des Toxizität-Tests, weshalb er auch zur Bestimmung der erforderlichen Anzahl der Verdünnungsstufen verwendet werden kann.

Aus Übersichtlichkeitsgründen wird die Bestimmung des NOEC hier nur anhand eines Beispiels gezeigt und ist für die anderen charakterisierten Proben im **Anhang I** ausführlich beschrieben. Der NOEC wurde für die schwarzbandfiltrierten Abwasserproben, die bis zu zwei Wochen eingefroren waren, berechnet. Zur Ermittlung der NOEC wird die ANOVA-Methode verwendet. Dabei wird die mittlere

spezifische Wachstumsrate und die Reststandardabweichung über die Wiederholung für jede Testkonzentration berechnet. Der sich ergebende Mittelwert für jede Testkonzentration wird anschließend mit dem Kontrollmittelwert unter Verwendung des Dunnett-Tests als geeignete Mehrfachvergleichsmethode verglichen.

Die Rohdaten der Wachstumsrate für jede Probe bzgl. der Frondfläche nach 7 Tagen für Papierfabrik H sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Die Ergebnisse für den ANOVA-Tests sind in **Tabelle 10** dargestellt.

**Tabelle 9:** Wachstumsrate der Wasserlinsen für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate (bzgl. der Fronfläche)	0,321	0,391	0,333	0,352	0,365	0,361	0,360
	0,315	0,364	0,352	0,346	0,376	0,388	0,372
	0,317	0,313	0,370	0,356	0,381	0,363	0,374

**Tabelle 10:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,006	0,004
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,001	0,0003
Prüfgröße (F)	3,33	
P-Wert	0,029	
Kritischer F-Wert	2,84	

Der Dunnett's-Test berechnet sich nach Gleichungen (3) und (4) (siehe **Anhang I**). Für den kritischen Wert des Dunnett's-Tests wurde entsprechend der Anzahl an Freiheitsgraden und der Stichprobengröße (Anzahl der Gruppen) ein charakteristischer Wert von  $d = 2,91$  bestimmt [27].

Mithilfe der ANOVA-Test-Parameter und  $d$  kann eine Minimum Signifikant Differenz (*MSD*) von 0,029 berechnet werden (siehe dazu **Anhang I**). **Tabelle 11** fasst die berechneten Parameter des Dunnett's-Tests zusammen.

**Tabelle 11:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,029)$
Kontrolle	0,379		
V1	0,406	0,026	Nein
V2	0,386	0,006	Nein
V4	0,407	0,028	Nein
V8	0,414	0,034	Ja = NOEC
V12	0,410	0,030	Ja
V24	0,412	0,032	Ja

Der berechnete  $t_i$ -Wert ist ab V4 höher als der  $MSD$ -Wert ( $MSD = 0,029$ ). Ab V4 ist die Wachstumsrate somit so gut wie die Kontrolle und es kann kein toxischer Effekt in den Proben beobachtet werden. Wenn der Abstand zwischen einem Kontrollgruppenmittelwert und einem Versuchsgruppenmittelwert größer als 0,029 ist, ist dieser Abstand signifikant.

In drei von sechs untersuchten Proben lag der NOEC bei V8 und der Rest bei V4 oder V2 auf Basis der beiden Beobachtungsparameter. Somit wurde ab V8 kein toxischer Effekt auf die Abwasserprobe mehr beobachtet. Aus diesem Grund kann der Wasserlinsen-Test für die Abwasserproben der Nachkläranlage mit 4 Verdünnungsstufen (V1, V2, V4, V8) durchgeführt werden.

### 5.2.5 Abwasserparameter

Zur Charakterisierung der untersuchten Papierfabriksabwässer wurden die chemischen und physikalischen Abwasserparameter für die Proben im Ablauf der Nachkläranlage gemessen. Diese werden in **Tabelle 12** für die untersuchten Papierfabriken und für jede Probenahme (PN) dargestellt. Zusätzlich ist der  $G_w$ -Wert, der nach dem Wasserlinsen-Test mit den jeweiligen Abwasserproben gemessen wurde, in der Tabelle eingefügt.

**Tabelle 12:** Gemessene Abwasserparameter für die untersuchten Abwasserproben

Parameter	Werk A		Werk E	Werk H
	PN 1	PN 2	PN 1	PN 1
CSB (mg/l)	143	261	385	138
P <sub>ges</sub> (mg/l)	0,76	0,49	0,38	0,27
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	3,85	4,49	0,07	0,975
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	1,2	1,3	2,1	0,3
NH <sub>4</sub> -N (mg/l)	0,28	0,95	0,13	1,88
AFS (mg/l)	19,95	43,5	20,65	17,39
TN <sub>b</sub> (mg/l)	10	9,4	5,4	1,19
AOX (mg/l)	0,17	0,2	0,05	0,09
Trübung (TEF)	12,9	4,06	8,35	7,88
Oberflächenspannung (mN/m)	74,2	72,4	73,6	73,2
Temperatur (°C)	35,9	35,5	28,8	27,6
pH	7,8	7,9	8,1	7,9
Leitfähigkeit (mS/cm)	2,99	2,61	2,06	1,68
G <sub>w</sub>	2	2	1	1

Die Erstellung des Pflichtenhefts in diesem Arbeitspaket beruht auf den untersuchten Abwasserproben des Endablaufs, die mit den oben beschriebenen chemischen und physikalischen Parametern charakterisiert worden sind.

### 5.2.6 Erstellung des Pflichtenhefts

Zur Untersuchung der Abwassertoxizität der Endabläufe der Papierfabriken mittels Wasserlinsen-Test sind ca. 1,5 Liter Abwasserprobe erforderlich. Die Abwasserprobe kann entweder vom Untersuchungslabor oder von eingewiesenem Personal der Papierfabriken entnommen und versendet werden. Die Proben müssen nach der Entnahme entweder direkt analysiert oder sofort eingefroren werden. Die gefrorene Abwasserprobe kann bis zu zwei Wochen im Tiefkühlschrank gelagert werden. Falls die Probenahme und der Versand durch die Papierfabrik stattfinden, sollte die Abwasserprobe nur im gefrorenen Zustand und in einer Plastikflasche schnellstmöglich (über Nacht) versendet werden. Die Durchführung des Wasserlinsen-Tests sollte direkt nach Erhalt der Probe stattfinden. Ein erneutes Einfrieren der aufgetauten Abwasserprobe ist auf keinen Fall zu empfehlen.

Die Abwasserproben müssen vor dem Testbeginn per Schwarzbandfilter filtriert werden. Für die Untersuchung des Endablaufs kann der Wasserlinsen-Test mit vier Verdünnungsstufen (V1, V2, V4, V8) durchgeführt werden. Laut DIN-Norm ist eine pH-Einstellung für Abwasserproben mit einem pH-Wert zwischen 5,0 bis 8,0 nicht erforderlich. Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Versuche zeigen jedoch unterschiedliche Wachstumshemmungen für verschiedene pH-Werte. Aus diesem Grund sollte der pH-Wert der Proben (bei allen Verdünnungsstufen, der Kontrolle und Referenz) auf 5,5 eingestellt werden. Die Testdurchführung sowie die Auswertung der Testergebnisse erfolgt nach DIN EN ISO 20079:2006.

Es wird empfohlen, die Wasserlinsen-Vorkultur in einem separaten Raum aufzubewahren sowie einen Austausch des Nährmediums alle fünf Tage durchzuführen. Um eine mögliche Kontamination der Abwasserprobe zu vermeiden, sollten die folgenden Punkte bei der Durchführung des Tests beachtet werden:

- Pflanzenwachstumsschrank nach jeder Testdurchführung mindestens zwei Stunden ausheizen und desinfizieren,
- Bechergläser und die anderen verwendeten Geräte bei 120 °C ausheizen und desinfizieren.

**Tabelle 13:** Pflichtenheft für den Wasserlinsen-Test

<b>Pflichtenheft für den Wasserlinsen-Test</b>
<p><b>Probenahme</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Probenahme durch eingewiesenes Personal</li> <li>– Entnahme von ca. 1,5 l Abwasserprobe in Plastikflaschen, sodass maximal Dreiviertel des Volumens der Flaschen gefüllt wird</li> <li>– Einfrieren der Wasserprobe direkt nach der Entnahme, falls keine Probenahme durch das Untersuchungslabor selbst stattfindet</li> <li>– Einfrieren der Abwasserprobe mindestens 8 Stunden, damit Probe komplett gefroren ist</li> <li>– Versand der Abwasserprobe von Papierfabrik in das Untersuchungslabor im gefrorenem Zustand per ÜberNacht Express</li> </ul>
<p><b>Lagerungsbedingungen im Untersuchungslabor</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Sofortiges Einfrieren der Probe nach Probeneingang, sofern sofortige Testdurchführung nicht möglich</li> <li>– Lagerung der Probe unter Tiefkühlbedingungen (<math>-18 \pm 2</math> °Celsius) maximal zwei Wochen</li> </ul>

**Probepreparationsmethode**

- Die Probe muss einen Tag vor dem Testbeginn bei Raumtemperatur aufgetaut werden
- Filtration per Schwarzbandfilter unmittelbar vor Testbeginn

**Testdurchführung**

- Testdurchführung nach DIN EN ISO 20079:2006
- Einstellung des pH-Werts auf  $5,5 \pm 0,2$
- Anzahl der erforderlichen Verdünnungsstufen: vier Verdünnungsstufen (V1, V2, V4, V8)

### 5.3 Arbeitspaket 3: Untersuchung / Mehrfachscreening in Altpapier verarbeitenden Papierfabriken

#### 5.3.1 Untersuchung der Papierfabriken

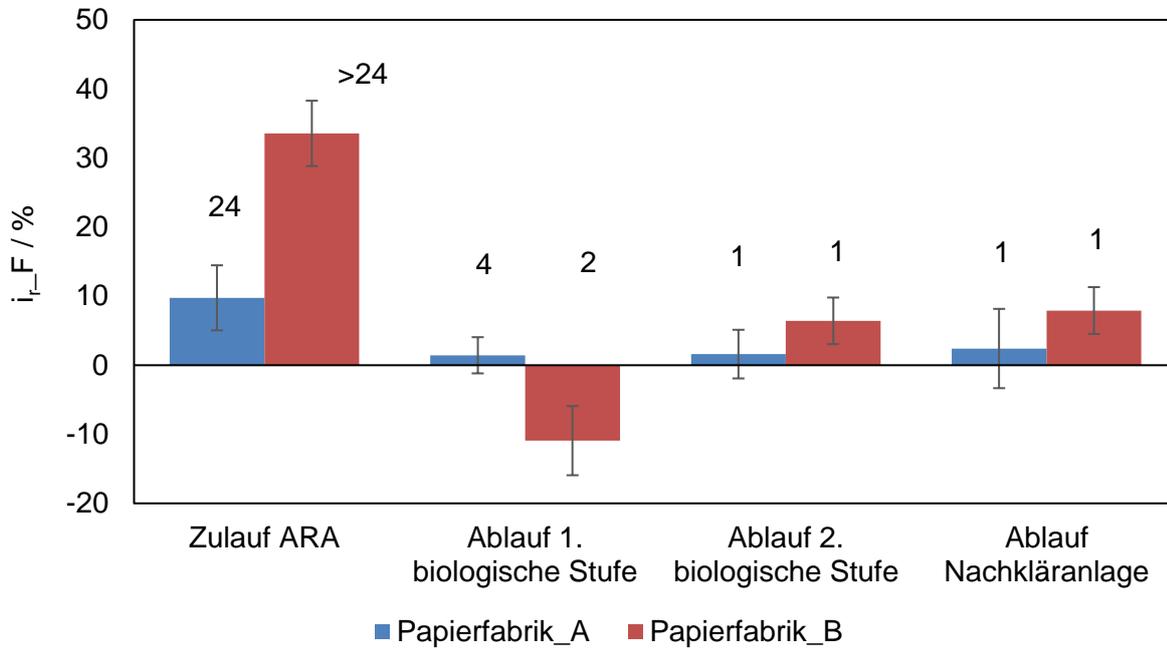
Aus den bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass erhöhte  $G_w$ -Werte in Papierfabriken, die über eine anaerob-aerobe Abwasserreinigungsanlage verfügen, ermittelt worden sind [5, 6]. Aus diesem Grund wurden in diesem Arbeitspaket fünf Papierfabriken, die über eine anaerob-aerobe Abwasserreinigungsanlage verfügen und zwei Papierfabriken, die mit einer aerob-aeroben Abwasserreinigungsanlage ausgestattet sind, untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Abwasserproben aus den folgenden Stellen in jeder Papierfabrik entnommen und getestet:

- Zulauf ARA
- Ablauf erste biologische Stufe
- Ablauf zweite biologische Stufe
- Ablauf der Nachkläranlage.

Für die Abwasserproben des Ablaufs der Nachkläranlage wurden nur die vier Verdünnungsstufen (V1, V2, V4 und V8) untersucht (siehe Kapitel 5.2.4). Für die anderen getesteten Stufen sind zusätzlich Verdünnungsstufen V12 und V24 untersucht worden.

Die **Abbildung 22 - Abbildung 24** stellen die gewonnenen Ergebnisse des Wasserlinsen-Tests für die Abwasserproben jedes Werks dar. Um einen besseren Vergleich der Testergebnisse zu ermöglichen, wurde die Wachstumshemmung bzgl. der hergestellten Papiersorten in jedem Diagramm abgebildet. In den Diagrammen ist

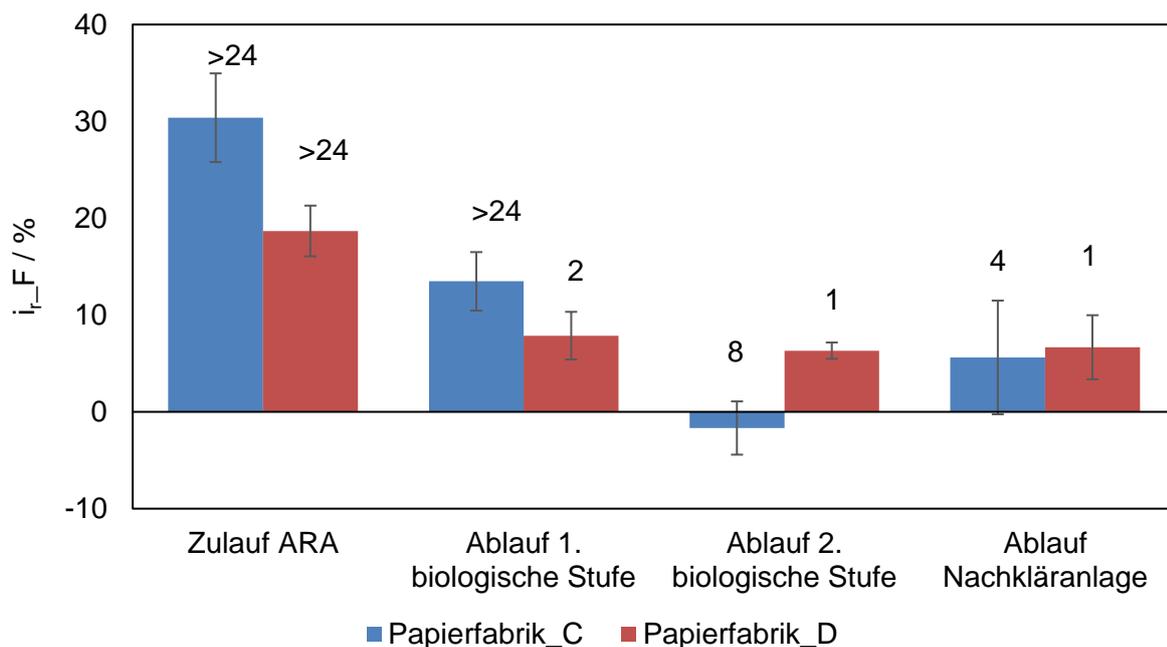
die Wachstumshemmung der ersten Verdünnungsstufe, die unter 10 % lag, dargestellt. Die oberen Werte, die den Spalten zugeordnet sind, entsprechen dem  $G_w$ -Wert der untersuchten Abwasserproben.



**Abbildung 22:** Wachstumshemmung für die Abwasserproben der Wellpappenrohpapier-Hersteller

In **Abbildung 22** ist die Wachstumshemmung für die Abwasserproben der Wellpappenrohpapierhersteller dargestellt. Die beiden Werke verfügen über eine anaerob-aerobe Abwasserreinigungstechnik. Trotz der identisch produzierten Papiersorte Für Papierfabrik B wurde ein höherer  $G_w$ -Wert für die unbehandelte Abwasserprobe (Zulauf ARA) gemessen. Der  $G_w$ -Wert hat sich in Papierfabrik B nach der ersten und nach der zweiten biologischen Stufe deutlich reduziert, so dass am Endablauf eine Wachstumshemmung von unter 10 % für die unverdünnte Probe (V1) erreicht wurde. Die gleiche Tendenz bzgl. Verringerung des  $G_w$ -Werts wurde für den Zulauf ARA bis zum Endablauf auch bei der Papierfabrik A beobachtet. Trotz der hohen gemessenen  $G_w$ -Werte bei den Abwasserproben des Zulauf ARA wurde der Wachstumshemmungsgrenzwert von 10 % bei der Abwasserprobe der zweiten biologischen Stufe sowie des Endablaufes nicht überschritten.

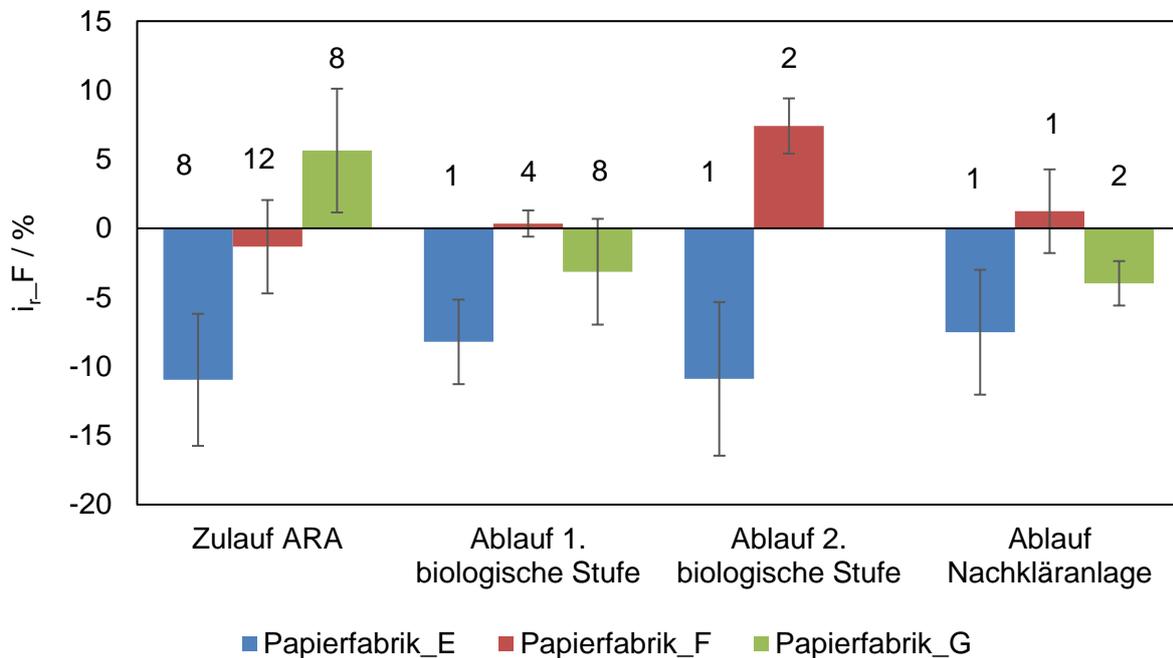
Wie aus **Abbildung 23** zu erkennen, wurde ein hoher  $G_w$ -Wert in allen untersuchten Reinigungsstufen der Papierfabrik C gemessen. Dieser Wert lag für die unbehandelte Probe sowie den Ablauf der ersten biologischen Stufe bei über 24. Auch der ermittelte  $G_w$ -Wert für den Endablauf lag deutlich höher als bei den anderen Proben, die mit einer anaerob-aerob ARA behandelt wurden. Papierfabrik D zeigt eine ähnliche Tendenz wie Papierfabrik A und B. Bei beiden wurde ein  $G_w$ -Wert von 1 für die Proben der zweiten biologischen Stufe und des Endablaufes gemessen.



**Abbildung 23:** Wachstumshemmung für die Abwasserproben der Hygiene-Papierfabriken

In **Abbildung 24** ist die Wachstumshemmung für die Abwasserproben der graphischen Papierhersteller dargestellt. Die gemessenen  $G_w$ -Werte der Abwasserproben des Zulaufs ARA bei den graphischen Papierherstellern weisen einen deutlich niedrigeren Wert im Vergleich zu den anderen untersuchten Papierfabriken auf. Der  $G_w$ -Wert lag für die Probe des Zulaufs ARA der Verpackungs- und Hygiene-Papierhersteller entweder bei 24 oder höher (>24). Bei den untersuchten Proben der graphischen Papierhersteller liegt dieser zwischen 8 und 12. Die gemessenen Wachstumshemmungen für den Endablauf haben ebenfalls den Grenzwert von 10 % nicht überschritten. Weiterhin haben die Wasserlinsen bei den graphischen Papierherstellern im Endablauf im Vergleich zu den Kontrollansätzen für die unverdünnten Proben ein gutes Wachstum gezeigt. Somit liegt eine geringe Abwassertoxizität vor. Zwei der drei untersuchten graphischen Papierhersteller

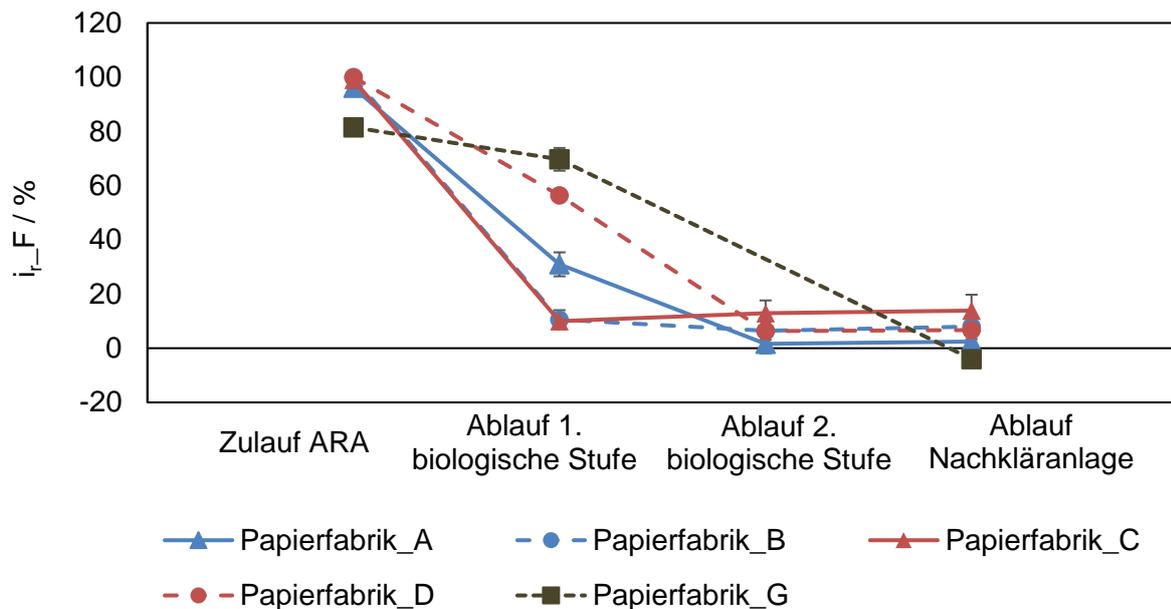
verfügen über eine aerob-aerobe ARA (Werk E und F). Werk G verfügt über eine anaerob-aerobe Abwassertechnik und weist die höchsten  $G_w$ -Werte im Ablauf der ersten biologischen Stufe und des Endablaufs auf.



**Abbildung 24:** Wachstumshemmung für die Abwasserproben der graphischen Papierhersteller

In 5 von 7 untersuchten Endablaufproben war  $G_w = 1$ , sowohl auf Basis der Frondanzahl als auch auf Basis der Frondfläche. In den anderen Werken konnte  $G_w = 1$  nur auf Basis der Frondanzahl bestimmt werden. Bei Werk C und G lag der  $G_w$ -Wert auf Basis der Frondfläche jeweils bei 4 und 2.

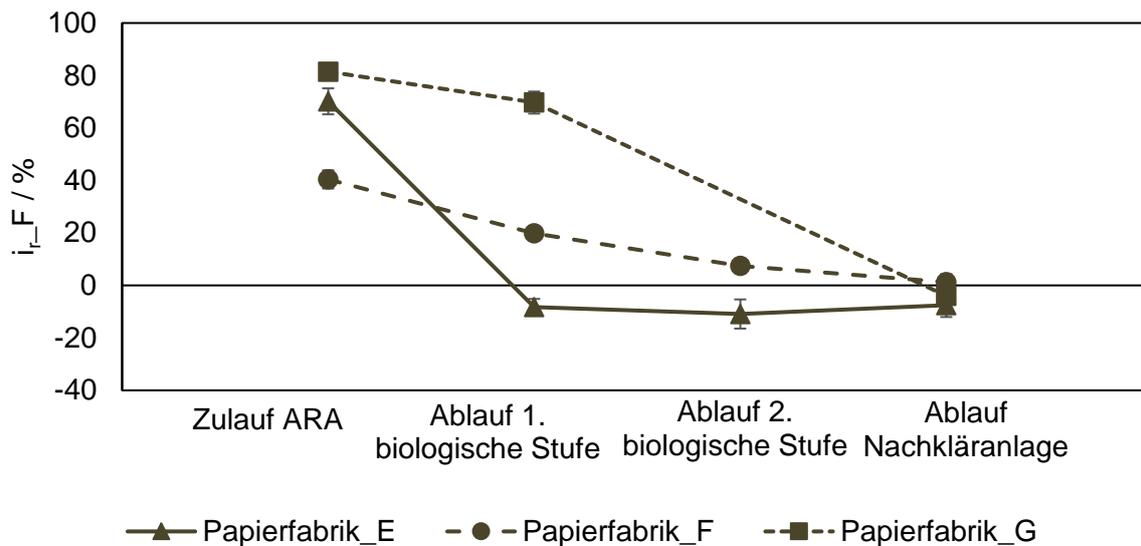
Die Änderung des  $G_w$ -Werts für eine unverdünnte Abwasserprobe (V1) von Zulauf ARA bis zum Ablauf der Nachkläranlage ist in **Abbildung 25** für die untersuchten anaerob-aeroben ARAs und in **Abbildung 26** für die untersuchten Abwasserreinigungsanlagen mit aerob-aerob-Stufen dargestellt. Beide Abbildungen geben somit einen Überblick des  $G_w$ -Verlaufs entlang der Abwasserreinigung. Das Abwasser aus demselben Sortenbereich ist im Diagramm mit gleicher Farbe und unterschiedliche Symbole/Linie kenntlich gemacht. Papierfabrik G ist in den beiden Diagrammen dargestellt, da sie von der einen Seite bzgl. Abwassertechnik als anaerob-aerob klassifiziert wird und von der anderen Seite den gleichen Sortenbereich wie Papierfabriken E und F, die über eine aerob-aerobe ARA verfügen, abbildet.



**Abbildung 25:** Verlauf der Wachstumshemmung entlang der anaerob-aeroben Abwasserreinigung

Die deutlichste Änderung der  $G_w$ -Werte von Papierfabriken, die über eine anaerob-aerobe ARA verfügen, findet vom Zulauf ARA bis zur ersten oder zweiten biologischen Stufe statt. Die Wachstumshemmung der Proben von der zweiten biologischen Stufe bis zum Endablauf zeigen nur eine minimale Verringerung. Außer bei Werk C lag der  $G_w$ -Wert der Abwasserproben des Endablaufes bei 1 oder 2. Es konnte gezeigt werden, dass die aktuell verwendeten Abwasserreinigungstechniken den  $G_w$ -Wert deutlich reduzieren. Außerdem muss der Einfluss der chemischen und physikalischen Parameter auf die Wachstumshemmung der Wasserlinsen berücksichtigt werden.

**Abbildung 26** fasst die Änderung der Wachstumshemmung der Wasserlinsen für die unverdünnte Abwasserproben der graphischen Papierhersteller des Zulaufs ARA bis zum Ablauf der Nachkläranlage zusammen. Werke E und F produzieren ähnliche Papiersorten und verfügen über eine aerob-aerobe Abwasserreinigungstechnik. Im Werk G wird Abwasser dagegen anaerob-aerob gereinigt. Es ist bei Werk G eine deutlich höhere Wachstumshemmung nach der ersten biologischen Stufe zu sehen. Allerdings wurde für alle Fabriken am Endablauf ein  $G_w$ -Wert von unter 10 % für die unverdünnten Abwasserproben gemessen.



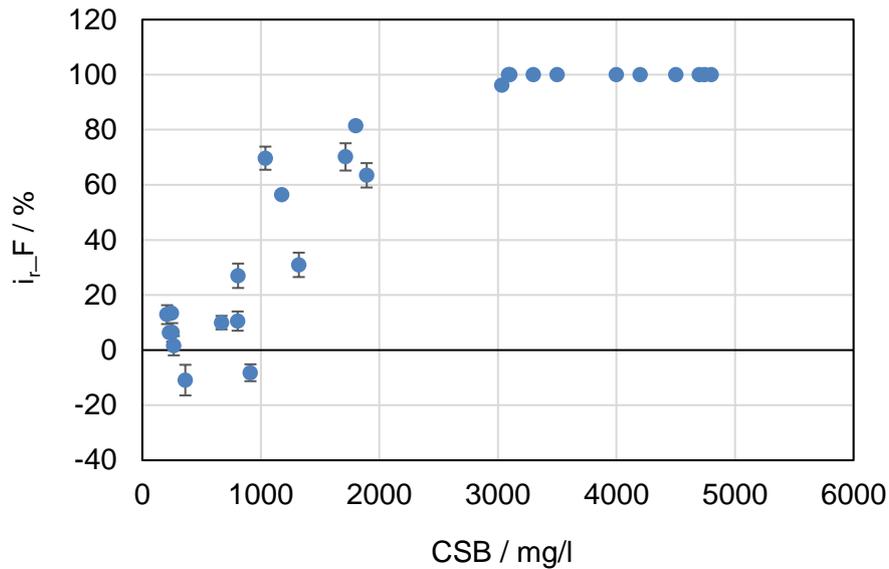
**Abbildung 26:** Verlauf der Wachstumshemmung entlang der Abwasserreinigung für aerob-aerobe Abwasserreinigung

### 5.3.2 Einfluss der Abwasserparameter auf das Testergebnis

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von chemischen und physikalischen Abwasserparametern auf das Wasserlinsen-Testergebnis untersucht und diskutiert. Dafür wurden die entnommenen Abwasserproben vor Testbeginn analysiert und die Zusammenhänge zwischen den gemessenen Abwasserparametern und den erzielten Ergebnissen der Wachstumshemmung charakterisiert.

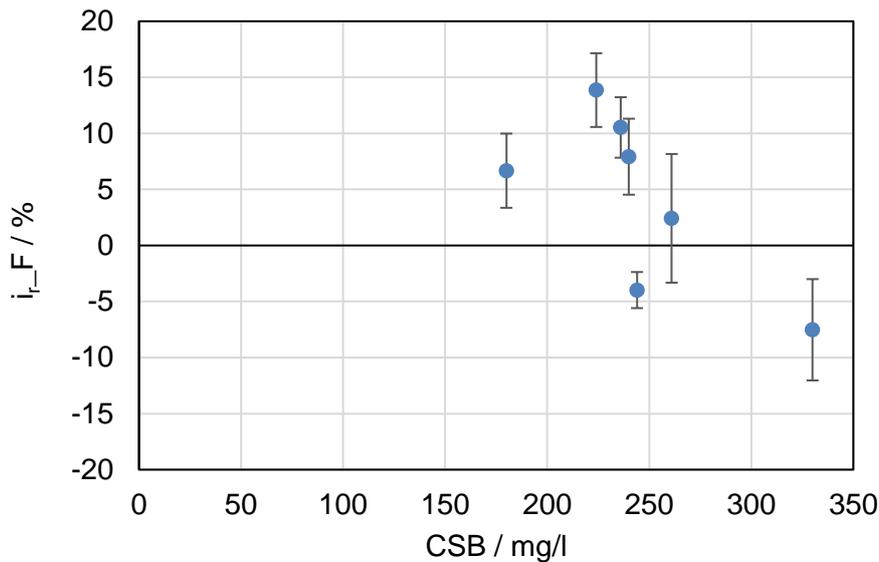
#### 5.3.2.1 CSB

Die Abhängigkeit der Wachstumshemmung von den gemessenen CSB-Werten der Abwasserproben von allen vier verschiedenen Probenahmestellen (Zulauf ARA, erste biologische Stufe, zweite biologische Stufe und Ablauf der Nachkläranlage) für alle untersuchten Papierfabriken (siehe **Tabelle 5**) ist in **Abbildung 27** dargestellt.



**Abbildung 27:** Zusammenhang zwischen CSB und Wachstumshemmung von Abwasserproben an vier verschiedenen Stellen (Zulauf ARA, erste biologische Stufe, zweite biologische Stufe und Ablauf der Nachkläranlage)

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei höheren CSB-Werten (ab  $\approx 1.000$  mg/l) auch höhere Wachstumshemmungen auftreten. Diese höheren CSB-Konzentrationen treten ausschließlich in den nicht vollständig gereinigten Papierfabriksabwässern auf. In **Abbildung 28** ist die Wachstumshemmung über den gemessenen CSB-Werten des Ablaufs der Nachklärung (CSB < 350 mg/l) dargestellt. Für diese Abwasserproben wurde kein Zusammenhang zwischen CSB und Wachstumshemmung beobachtet. Bei den unbehandelten und teilbehandelten Abwasserproben ist offenbar eine Korrelation zwischen der Wachstumshemmung und der höheren Fracht an organischen Stoffen vorhanden.

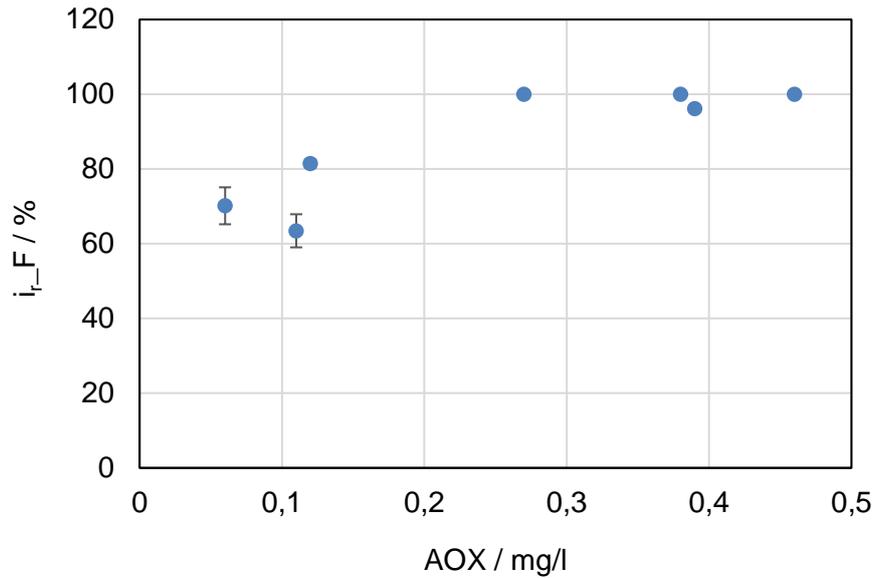


**Abbildung 28:** Zusammenhang zwischen CSB und Wachstumshemmung für die Abwasserproben des Endablaufs

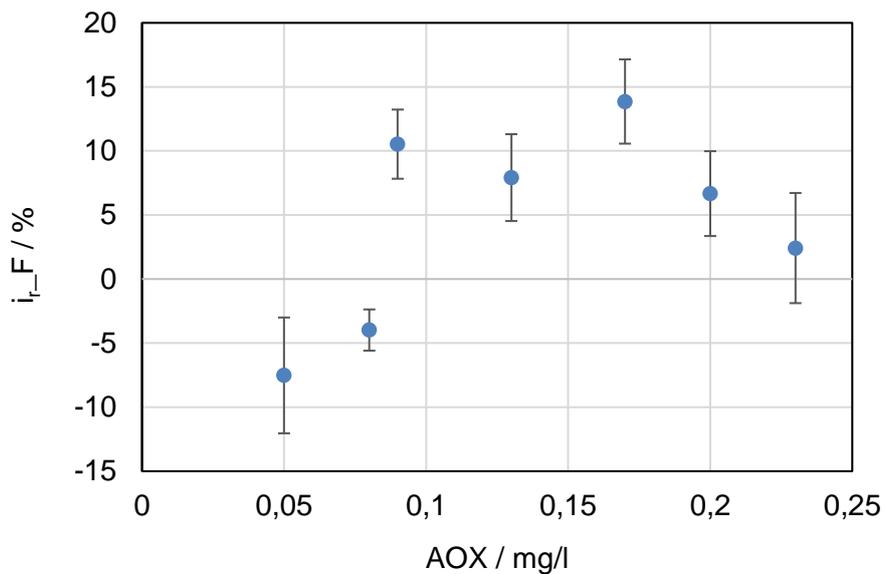
Einflussgrößen auf den CSB-Wert der Papierfabriksabwässer können eingesetzte Rohstoffe, chemische Additive, spezifische Abwassermenge sowie interne Wasserreinigungs- und -Rückführungssysteme sein [28]. Diese sind in jeder Papierfabrik abhängig von der Produktion und Abwasserreinigungstechnik unterschiedlich und führen zu unterschiedlichen CSB-Werten und Wachstumshemmungen in den verschiedenen Stufen des Abwasserreinigungsprozesses.

### 5.3.2.2 AOX

Quellen von adsorbierbaren organisch gebundenen Halogenen (AOX) im Abwasser können im Holz enthaltene natürliche Halogenverbindungen sein, ebenso Stoffe aus der Bleiche mit chlorhaltigen Chemikalien, chemische Additive oder Farbstoffe [28]. Diese können die Wachstumshemmung ebenfalls beeinflussen. **Abbildung 29** und **Abbildung 30** stellen den Zusammenhang zwischen den AOX-Werten und der gemessenen Wachstumshemmung für die Abwasserproben von Zulauf ARA und Endablauf dar.



**Abbildung 29:** Zusammenhang zwischen AOX und Wachstumshemmung für die Abwasserproben des Zulaufs ARA

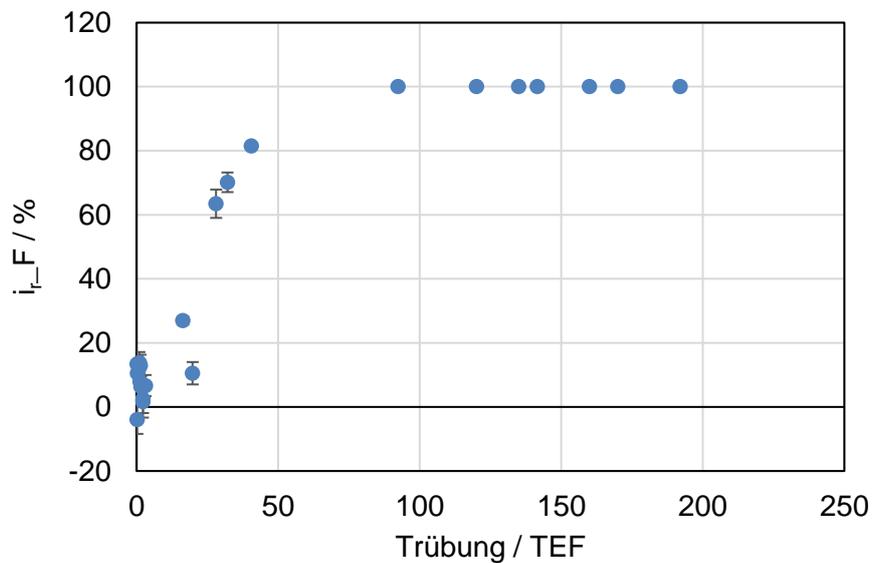


**Abbildung 30:** Zusammenhang zwischen AOX und Wachstumshemmung für die Abwasserproben des Endablaufs

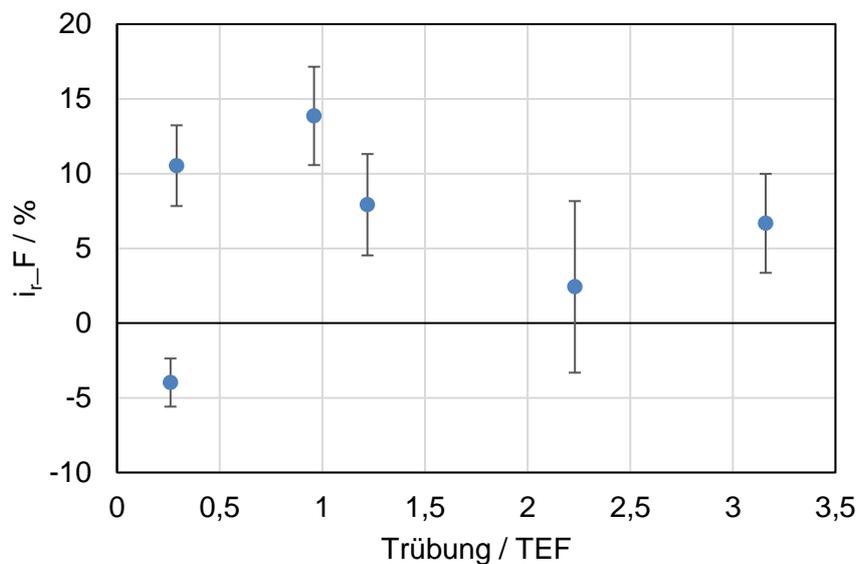
Die gemessenen AOX-Werte der Abwasserproben des Zulaufs ARA liegen im Bereich von 0,1 bis 0,5 mg/l. Laut der dargestellten Werte in **Abbildung 29** korrelieren höhere AOX-Werte mit einer höheren Wachstumshemmung. Die AOX-Werte für die Abwasserproben vom Endablauf lagen im Bereich vom 0,05 bis 0,25 mg/l, für diese Proben konnte kein Zusammenhang des AOX-Werts und der Wachstumshemmung beobachtet werden (siehe **Abbildung 30**).

### 5.3.2.3 Trübung

Die Trübung der untersuchten Abwasserproben aus den vier verschiedenen Reinigungsstufen variierten von Werten kleiner 10 TEF (Endablauf) bis über 150 TEF für die unbehandelten Abwasserproben (Zulauf ARA). Die gemessenen Wachstumshemmungen zeigen einen hohen Wert für Abwasserproben mit einer Trübung über 20 TEF. Dies entspricht den Abwasserproben von Zulauf ARA und der ersten biologischen Stufe. Für Abwasserproben mit einer Trübung unter 20 TEF, wurde kein Zusammenhang zwischen Abwassertrübung und Wachstumshemmung beobachtet (siehe **Abbildung 31**).



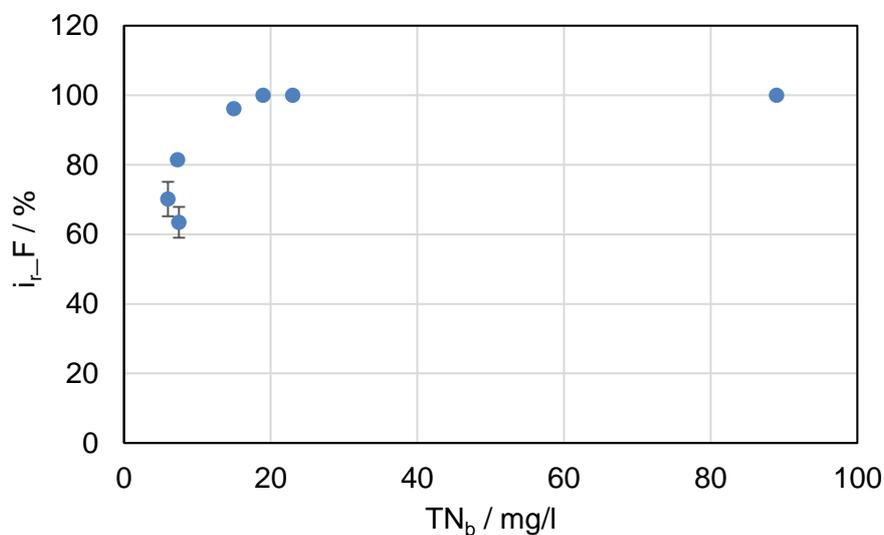
**Abbildung 31:** Zusammenhang zwischen Trübung und Wachstumshemmung von Abwasserproben an vier verschiedenen Stellen (Zulauf ARA, erste biologische Stufe, zweite biologische Stufe und Ablauf der Nachkläranlage)



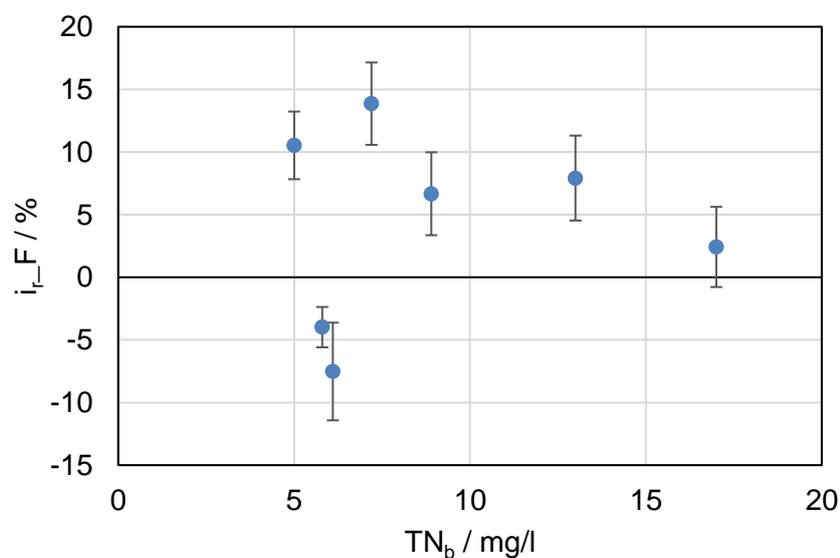
**Abbildung 32:** Zusammenhang zwischen Trübung und Wachstumshemmung für die Abwasserproben des Endablaufs

### 5.3.2.4 Stickstoff- und Phosphorgehalt

Stickstoff- und Phosphorgehalte in Papierabwässern stammen im Wesentlichen aus Nährstoffen, die zur biologischen Behandlung der Abwässer verwendet werden. Außerdem können Additive und Frischwasser eine Erhöhung der Konzentration an Stickstoff und Phosphor verursachen [28]. Stickstoff und Phosphor werden auch als Nährstoff für das Wasserlinsen-Wachstum klassifiziert und können deren Wachstum somit positiv beeinflussen. Allerdings sollten die anderen Einflussparameter wie CSB, AOX, etc. im akzeptablen Bereich liegen. Die Diagramme in den **Abbildungen 33** bis **36** zeigen die gemessenen Werte für Stickstoff und Phosphor im Zusammenhang mit der Wachstumshemmung der Proben.



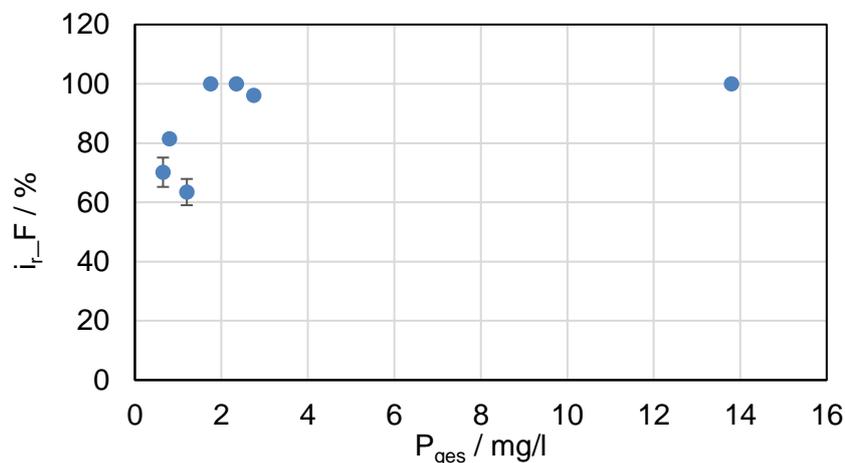
**Abbildung 33:** Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und TN<sub>b</sub> für die Abwasserproben des Zulaufs ARA



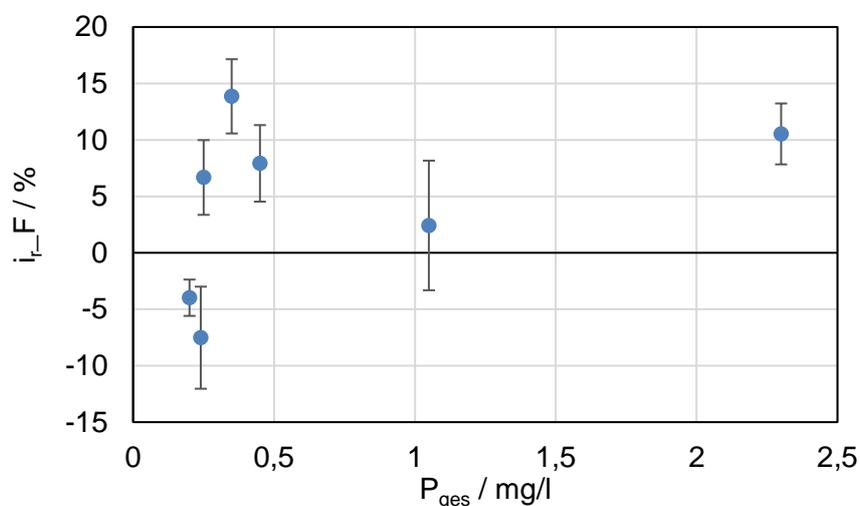
**Abbildung 34:** Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und TN<sub>b</sub> für die Abwasserproben des Endablaufs

Ein  $TN_b$ -Wert kleiner als 20 mg/l, der für alle Abwasserproben des Endablaufs bestimmt wurde, hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Wachstumshemmung. Für die Abwasserproben des Zulaufs ARA lag der  $TN_b$ -Wert bei 20 mg/l oder höher. Obwohl die hohe Menge an Stickstoff das Wachstum der Wasserlinsen positiv beeinflussen kann, wurde dieser Effekt offensichtlich durch die Wirkung anderer Inhaltstoffe in den Zulaufproben überlagert, so dass eine starke Wachstumshemmung für diese Abwasserproben trotz des hohen Stickstoffanteils gemessen wurde.

Die gleiche Tendenz wurde auch für den Phosphorgehalt beobachtet. Ein  $P_{ges}$ -Wert unter 2,5 mg/l (gemessene Werte für Endablauf) beeinflusst die Wachstumshemmung nicht. Aufgrund der Wirkung anderer Inhaltstoffe (Siehe Abschnitt 5.3.2.1 – 5.3.2.3) wurde keine Korrelation zwischen dem Phosphorgehalt der untersuchten Abwasserproben des Zulaufs ARA und der Wachstumshemmung beobachtet.



**Abbildung 35:** Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und  $P_{ges}$  für die Abwasserproben des Zulaufs ARA

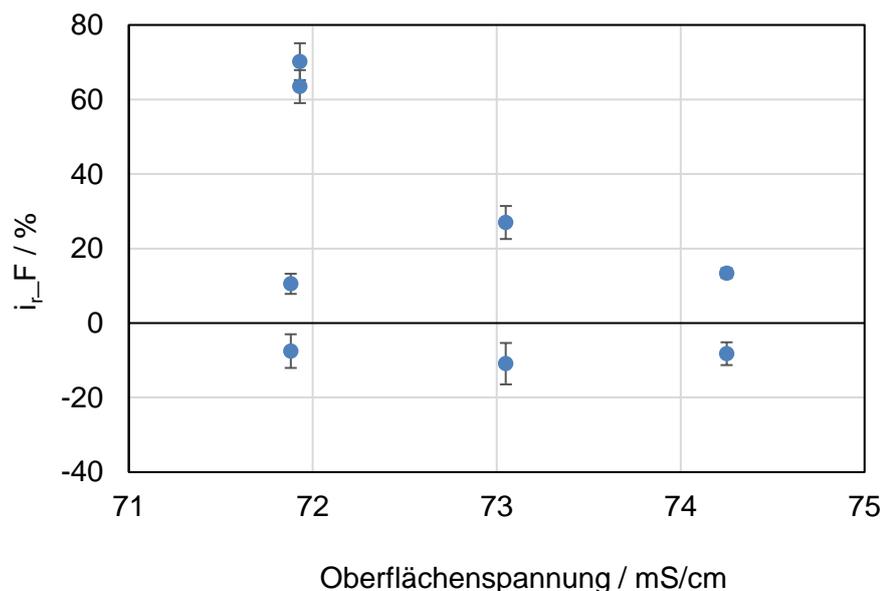


**Abbildung 36:** Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und  $P_{ges}$  für die Abwasserproben des Endablaufs

### 5.3.2.5 Oberflächenspannung

Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurde auch die Oberflächenspannung und ihr Einfluss auf die Wachstumshemmung der Wasserlinsen untersucht. Es wurde vermutet, dass geringe Mengen der verwendeten Entschäumer und anderer Tenside, die Oberflächenspannung beeinflussen und zu einer veränderten Wachstumshemmung führen können. Diese Überlegung resultiert aus der Beobachtung, dass die Wasserlinsenfronds direkt auf der Wasseroberfläche wachsen.

**Abbildung 37** fasst die gemessenen Werte für die Oberflächenspannung der Abwasserproben aus vier verschiedenen Reinigungsstufen in zwei Papierfabriken (A und E) zusammen. Es wurden nur minimale Änderungen in der Oberflächenspannung der untersuchten Abwasserproben in vier verschiedenen Reinigungsstufen gefunden. Es liegt offensichtlich keine Korrelation zwischen der Oberflächenspannung und den gemessenen Werten für die Wachstumshemmung vor.



**Abbildung 37:** Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Wachstumshemmung

### 5.3.2.6 Zusammenfassung des Einflusses der Abwasserparameter auf Wachstumshemmung

Mit Hilfe eines Toxizitätstests kann sowohl die Untersuchung des Einflusses jedes einzelnen chemischen und/oder physikalischen Abwasserparameters aber auch der Mischung von verschiedenen Abwasserparametern auf den Testorganismus erfolgen. Im vorliegenden Fall wurden reale Abwasserproben aus den Abwasserreinigungsanlagen der Papierfabriken entnommen, die sich jeweils in vielen verschiedenen Parametern unterscheiden.

Daher kann in Auswertung der Ergebnisse kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Messwerten der einzelnen Abwasserparameter und den ermittelten Wachstumshemmungen der Wasserlinsen angegeben werden. Dennoch sind folgende Aussagen aus den Messergebnissen ableitbar:

- Für die untersuchten 7 Abläufe des gereinigten Papierfabriksabwassers bestehen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Wachstumshemmung der Wasserlinsen und den untersuchten Abwasserparametern CSB, AOX, Trübung, Stickstoff- und Phosphorgehalt.
- Die Oberflächenspannung der Abwasserproben ist in dem untersuchten Bereich kein relevanter Einflussfaktor für die Wasserlinsenhemmung.
- Für die Zuläufe der ARA und die teilweise gereinigten Zwischenstufen ergeben sich höhere Werte für den CSB, den AOX und die Trübung. Diese höheren Verschmutzungsgrade des Abwassers sind mit höheren Wachstumshemmungen verbunden. Ob letztendlich einer dieser Faktoren oder ein Zusammenspiel mehrerer, auch nicht untersuchter, Faktoren verantwortlich ist für die höhere Wachstumshemmung, konnte bei dieser Probenauswahl nicht geklärt werden.
- Die in der Theorie positive Wirkung einer höheren Konzentration von biologisch verfügbaren Stickstoff- und Phosphorverbindungen wird in den Abwasserproben durch andere Effekte überlagert.

Um valide Beurteilungen des Einflusses der Abwasserparameter treffen zu können, muss eine statistische Versuchsauswertung durchgeführt werden. Die aktuellen Ergebnisse weisen aufgrund der bisher zu geringen Versuchsmatrix an manchen Stellen Ungenauigkeiten auf. Deswegen konnte eine sinnvolle Bewertung des Einflusses der Mischung von verschiedenen Abwasserparametern auf die Wasserlinsenwachstumshemmung im Rahmen des Projektes nicht erfüllt werden. Eine solche Charakterisierung von Mischungen kann nur durch die Definierung eines Modellabwassers sinnvoll durchgeführt werden. Dabei muss jeder einzelne Parameter in einer vordefinierten Versuchsreihe konstant gehalten und die restlichen Parameter innerhalb einer festgelegten Versuchsmatrix variiert werden. Zusätzlich müssen sich die zu untersuchenden Parameterkombinationen in einem ähnlichen Bereich wie die realen Papierfabriksabwässer befinden.

### 5.3.3 Fischei-Test

In diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse des Wasserlinsen-Tests mit den gewonnenen Ergebnissen von Fischei-Test verglichen (Siehe Abschnitt 4.3). Der Fischei-Test ist als aktuelle ökotoxikologische Untersuchung in vielen Anhängen der AbwV enthalten. Es wurden insgesamt 10 Abwasserproben mittels Wasserlinsen-Test und Fischei-Test untersucht. Diese Abwasserproben wurden von 5 verschiedenen Papierfabriken entnommen und mit zwei unterschiedlichen Methoden (Schwarzbandfiltration und Homogenisierung) vorbereitet. Beide Tests wurden im gleichen Labor (externes Labor) durchgeführt. Die Durchführung des Wasserlinsen-Tests erfolgte nach dem in AP 2 festgelegten Pflichtenheft (Abschnitt 5.2). **Tabelle 14** und **Tabelle 15** fassen die Ergebnisse beider Tests zusammen.

**Tabelle 14:** Ergebnisse des Fischei- und Wasserlinsen-Tests für die filtrierte Proben

Schwarzbandfiltration	Fischei-Test	Wasserlinsen-Test	
	G <sub>Ei</sub>	G <sub>w_F</sub>	G <sub>w_Z</sub>
A	1	2	1
B	1	8	4
C	1	4	2
F	6	2	2
H	1	1	1

**Tabelle 15:** Ergebnisse des Fischei- und Wasserlinsen-Tests für die homogenisierten Proben

Homogenisierung	Fischei-Test	Wasserlinsen-Test	
	G <sub>Ei</sub>	G <sub>w_F</sub>	G <sub>w_Z</sub>
A	1	2	1
B	1	8	8
C	1	4	2
F	> 8	2	1
H	4	1	1

Für die in **Tabelle 14** und **Tabelle 15** angegebenen G<sub>Ei</sub>-Werte von Papierfabriken F und H wurden die Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, da in den Kontrollen nur jeweils 60 %, statt der geforderten 90 % der Eier überlebten. Die Werte in den grau hinterlegten Zellen sind somit ungültig. Insgesamt wurden die untersuchten Abwasserproben mittels Fischei-Test als unbedenklich klassifiziert, sodass der G<sub>Ei</sub>-

Wert konstant bei 1 lag. Im Vergleich dazu variierten die  $G_w$ -Werte im Bereich von  $1 \leq G_w \leq 8$  für die homogenisierten und schwarzbandfiltrierten Abwasserproben. Es konnte keine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen des Wasserlinsen- und Fischei-Tests beobachtet werden. Offensichtlich reagiert der Wasserlinsentest etwas empfindlicher auf die Wirkung möglicher Abwasserinhaltsstoffe.

#### 5.4 Arbeitspaket 4: Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses und Laborvergleichsuntersuchung

##### 5.4.1 Reproduzierbarkeitsuntersuchung am PMV

Für die Reproduzierbarkeitsuntersuchung am PMV wurden Abwasserproben vom Ablauf der Nachkläranlage von 7 verschiedenen Papierfabriken insgesamt 3mal innerhalb der Projektlaufzeit nach dem in AP 2 festgelegten Pflichtenheft getestet (siehe **Tabelle 7**).

Die gewonnenen Ergebnisse der Wachstumshemmung der Abwasserproben auf Basis der Frondanzahl und Frondfläche für alle untersuchten Abwasserproben sind in der **Tabelle 16** dargestellt.

**Tabelle 16:**  $G_w$ -Werte der untersuchten Abwasserproben

Werkscod	$G_{w\_F}$			$G_{w\_Z}$		
	PN 1	PN 2	PN 3	PN 1	PN 2	PN 3
A	1	2	1	1	1	1
B	1	2	1	1	1	1
C	4	4	1	1	2	1
D	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1
F	1	1	8	1	1	8
G	2	1	1	1	1	1

In 2 von 7 untersuchten Endablaufproben lautet das Ergebnis für alle drei Probenahmen konstant  $G_w = 1$ , sowohl auf Basis der Frondanzahl als auch auf Basis der Frondfläche. Die dritte Untersuchung vom Werk F wurde als ungültig klassifiziert, da die Gültigkeitskriterien nach DIN-Norm wegen der Entstehung von Pilzen in den Kontroll- und Probeansätzen nicht erfüllt wurden. In der Papiersorte der

Wellpappenrohlpapier (Werk A und B) sowie im Werk G lag eine geringe Schwankungsbreite bei den  $G_w$ -Werten auf Basis der Frondfläche vor. Diese zeigen aber auf Basis der Frondanzahl einen  $G_w$ -Wert von 1 bei allen Untersuchungen. Werk C hat den höchsten  $G_w$ -Wert basierend auf beiden Beobachtungsparametern. Bezüglich der Frondfläche liegt dieser zwischen 1 und 4 und bzgl. der Frondanzahl zwischen 1 und 2. Da die gemessenen Abwasserparameter wie CSB, AOX, etc. sehr ähnliche Ergebnisse für die drei verschiedenen Proben zeigen, kann die Abweichung in den erhaltenen  $G_w$ -Werten nicht mit den gemessenen chemischen Abwasserparametern erklärt werden.

In alle untersuchten Abwasserproben (Endablauf), die mit einer anaerob-aerober ARA behandelt wurden, stellt eine höhere Wasserlinsentoxizität im Bereich von  $1 \leq G_w \leq 4$  ein. In den Werken E und F lag der  $G_w$ -Wert nach aerober Behandlung fast immer bei 1 und zeigte somit ein gutes Wachstum der Wasserlinsen in diesen Proben.

Es konnte dabei gezeigt werden, dass die  $G_w$ -Werte aus der Berechnung über die Frondfläche meist einen etwas schlechteren Wert aufweisen.

#### 5.4.2 Laborvergleichsuntersuchung

Es wurde eine Laborvergleichsuntersuchung für den Endablauf von 5 Papierfabriken durchgeführt. Es waren zwei externe Labore und somit inkl. PMV insgesamt drei Labore an den parallelen Wasserlinsen-Tests beteiligt. Die Labore erhielten die Codes „Labor 1“ und „Labor 2“. Labor 1 hat an allen Untersuchungen, Labor 2 nur bei den Untersuchungen der Werke C, F und H teilgenommen. Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß AP 2 und die Labore wurden gebeten, die Hemmungswerte  $i_r$  basierend auf Frondanzahl und Frondfläche für alle Verdünnungsstufen dem PMV zu übermitteln.

Es wurden insgesamt 10 Abwasserproben aus 5 Werken untersucht (siehe **Tabelle 8**). Diese Abwasserproben wurden mit zwei verschiedenen Methoden vorbereitet. Die gleiche Probe wurde einmal mit Schwarzband filtriert und einmal nur homogenisiert und anschließend für den Wasserlinsen-Test verwendet. Die gewonnenen  $G_w$ -Werte bzgl. der verwendeten Vorbereitungsmethode wurden auf Basis der Frondanzahl und Frondfläche in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 17:**  $G_w$ -Werte der schwarzbandfiltrierten Abwasserproben

Schwarzbandfiltration	$G_{w\_F}$			$G_{w\_Z}$		
	PMV	Labor 1	Labor 2	PMV	Labor 1	Labor 2
A	1	2	–	1	1	–
B	1	8	–	1	4	–
C	2	4	1	2	2	1
F	8	2	1	4	2	1
I	1	1	1	1	1	1

**Tabelle 18:**  $G_w$ -Werte der homogenisierten Abwasserproben

Homogenisierung	$G_{w\_F}$			$G_{w\_Z}$		
	PMV	Labor 1	Labor 2	PMV	Labor 1	Labor 2
A	1	2	–	1	1	–
B	2	8	–	1	8	–
C	4	4	1	2	2	1
F	4	2	1	8	1	1
I	1	1	1	1	1	1

Beide Methoden zeigen bezüglich Frondanzahl und – fläche unterschiedliche  $G_w$ -Werte. Die gemessenen  $G_w$ -Werte für das Werk I lagen auf Basis der Frondanzahl und Frondfläche in allen drei Laboren bei 1, unabhängig von der Vorbereitungsmethode. Im Laufe der Durchführung des Wasserlinsentests für Werk F wurde die Entstehung von Algen und Pilzen in den Bechergläsern am PMV beobachtet. Dieser Test konnte die Gültigkeitskriterien nicht erfüllen und wurde als ungültig klassifiziert. Die  $G_w$ -Werte von Papierfabrik A (Labor 1 und PMV) und F (Labor 1 und 2) schwanken zwischen 1 und 2. Die Differenz zwischen den berechneten Wachstumshemmungen von Werk A und F, welches in  $G_w$ -Werten zwischen 1 und 2 resultiert, lag unter 10 %. Komplexer gestaltet sich die Interpretation der  $G_w$ -Werte von Werk B und C. Diese wurden für das Werk B zwischen 1 und 8 und für das Werk C zwischen 1 und 4 bestimmt. Wichtig ist, dass die unterschiedlichen Vorbereitungsmethoden (Filtration und Homogenisierung) in den Laboren 1 und 2 keinen oder nur geringen Einfluss auf die Testergebnisse zeigten. Der Unterschied zwischen den gewonnenen Ergebnissen der 3 Labore kann an den verschiedenen Messsystemen (Bildanalyse) liegen. Die  $G_w$ -Werte der Werke B und C zeigten die größten Schwankungen, weshalb die von Labor 1 aufgenommenen Bilder zusätzlich durch das PMV ausgewertet wurden. **Tabelle 19**

und **Tabelle 20** fassen die berechneten  $G_w$ -Werte des PMV-Instituts und von Labor 1 zusammen. Die grau markierten Felder in der Tabelle zeigen die Untersuchungen, die in unterschiedlichen  $G_w$ -Werten resultieren.

**Tabelle 19:** Vergleich der berechneten  $G_w$ -Werte durch das PMV-Institut und Labor 1 für die filtrierte Proben

Schwarzbandfiltration	$G_{w\_F}$		$G_{w\_Z}$	
	PMV	Labor 1	PMV	Labor 1
A	2	2		1
B	8	8	4	4
C	4	4	4	2
F	1	2		2
I	1	1	1	1

**Tabelle 20:** Vergleich der berechneten  $G_w$ -Werte durch das PMV-Institut und Labor 1 für die homogenisierten Proben

Homogenisierung	$G_{w\_F}$		$G_{w\_Z}$	
	PMV	Labor 1	PMV	Labor 1
A	1	2		1
B	8	8	8	4
C	2	4	2	2
F	1	2		2
I	1	1	1	1

In 6 von 20 Auswertungen (bzgl. der Frondfläche- und -anzahl) wurden unterschiedliche Ergebnisse festgestellt. Die maximale Differenz des  $G_w$ -Wertes lag dabei bei einer Niveaustufe. Der Wasserlinsen-Test sollte an dem gleichen Tag in beiden Laboren durchgeführt werden. Die längere Lagerungszeit der Probe sowie die Lagerungsbedingungen sind ein zusätzlicher möglicher Grund für die unterschiedlichen Testergebnisse.

## **6 Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)**

### **6.1 Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse**

Die hauptsächliche Nutzung der Forschungsergebnisse wird in den Fachgebieten „Umwelttechnik“ (FB) und „Verfahrenstechnik“ (MC) erfolgen. Bezogen auf die Wirtschaftszweige wird die hauptsächliche Nutzung gemäß IGF-Kategorisierung bei der „Herstellung von Papier, Pappe und Waren daraus“ (17) sowie „Abwasserentsorgung“ (37) liegen. Darüber hinaus profitieren Ingenieurbüros und Beratungsfirmen für Abwasserreinigung in der Papierindustrie sowie Laboratorien mit ökotoxikologischen Leistungen und Hersteller entsprechender Messgeräte für die Durchführung des Wasserlinsen-Tests von den Forschungsergebnissen dieses Vorhabens.

### **6.2 Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit**

Die AbwV enthält insgesamt 53 branchenspezifische Anhänge. In 22 der 53 Anhänge in der AbwV sind Vorgaben bezüglich Biotests zur Regulierung unterschiedlicher Branchen enthalten. Für die Papierindustrie ist dies bislang nicht der Fall, obwohl in Einleitbescheiden oft eine Auflage bezüglich des Fischei-Tests nach DIN EN ISO 15088 4 erteilt wird [26]. Ein großer Vorteil von Biotests gegenüber der Betrachtung einzelner Abwasserparameter liegt darin, dass Biotests eine vollständige Betrachtung der Abwasserinhaltsstoffe zulassen [29]. Insbesondere werden sowohl abschwächende als auch verstärkende Effekte der Wasserinhaltsstoffe untereinander erfasst [29]. Auf Grund dessen könnte in der kommenden Revision des Anhangs 28 der AbwV ebenfalls ein Biotest als ökotoxikologische Untersuchungsmethode aufgenommen werden [30]. In ersten orientierenden Untersuchungen bzgl. des Wasserlinsen-Test in der Papierindustrie [5, 6] wiesen die Ergebnisse jedoch teilweise starke Schwankungen auf. In einigen Fällen wurden zudem hohe Toxizitätswerte festgestellt, für die es keine nachvollziehbare Begründung gibt. Obwohl zunächst kein Grenzwert für die Untersuchungsergebnisse des Wasserlinsen-Tests festgelegt wurde, war die Verunsicherung in der Papierindustrie, insbesondere bei den KMU, groß. Mit dem vorliegenden Vorhaben wurden offene Fragen zur Durchführung und Auswertung des Wasserlinsen-Tests geklärt und eine standardisierte Probenvorbereitung vorgeschlagen, mit der belastbare und vergleichbare Untersuchungsergebnisse gewährleistet werden können. Von der Steigerung der

Wettbewerbsfähigkeit profitieren, neben den direkt betroffenen Papierfabriken und der gesamten Papierindustrie, die Planungs- und Beratungsunternehmen sowie die Laboratorien für ökotoxikologische Messungen und die Hersteller der Messgeräte für die Durchführung und bildanalytische Auswertung dieser Tests. Diese letztgenannten Branchen bestehen im Wesentlichen aus KMU.

### **6.3 Aussagen zur voraussichtlichen Umsetzung der FuE-Ergebnisse**

Zusätzlich zu den ersten Screening-Untersuchungen in [5] wurden im Rahmen des Projektes umfassende Untersuchungen zu möglicherweise erhöhten Wasserlinsen-Toxizitäten von Papierfabriksabwässern aus dem für Deutschland wichtigen Herstellungsbereich „Papiere aus Altpapier“ durchgeführt. Die Untersuchungen umfassen, zusätzlich zu einer ausführlichen Datenerhebung in der jeweiligen Papierfabrik, die Untersuchungen der Zuläufe sowie die Abläufe einzelner Abwasserreinigungsstufen. Es wurden chemische und physikalische Abwasserparameter in jeder Reinigungsstufe gemessen und charakterisiert sowie die möglichen Ursachen für die erhöhte Wasserlinsen-Toxizität begründet. Außerdem wurden durch wiederholte Testreihen und die gezielte Variation der Probenahmemöglichkeiten, Probenkonservierung und Probenvorbereitung wertvolle Hinweise für die Standardisierung des Lemna-Tests in der Papierindustrie gegeben. Weiterhin konnten kritische Faktoren, die zu einer Kontamination in der Wasserlinsen-Kultur und bei den Testdurchführungen führen detektiert und eine Vermeidungsstrategie vorgestellt werden. Im Rahmen des Projektes wurde ein stabiles bildanalytisches System zur Auswertung der Frondanzahl- und Fläche etabliert, womit eine Auswertung mit einer Genauigkeit von über 90 % durchgeführt werden kann.

Die Untersuchungsergebnisse dieses Biotest-Verfahrens sollten auch für Anwender aus anderen Branchen von Interesse sein. Die Verwendung des Wasserlinsen-Tests wird auch zur Beurteilung der phytotoxischen Wirkung von Abwässern anderer Industriezweige (z. B. Leder-, Textil-, Chemieindustrie) diskutiert. Die Erfahrungen mit der Anwendung dieses Biotests sind in anderen Branchen ebenfalls begrenzt. Allerdings ist die Übertragbarkeit nur bedingt gegeben, da die zu untersuchende komplex zusammengesetzte Versuchsmatrix (hier: Abwässer aus der Herstellung von Papier und Pappe) eine zentrale Rolle für die Beurteilung der Eignung des Tests einnimmt.

## 7 Ergebnistransfer

Die im Projektantrag dargestellten Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft wurden planmäßig durchgeführt. Bereits während der Projektlaufzeit wurde das Thema bei verschiedenen Fachveranstaltungen und in diversen Vorträgen vorgestellt. Eine Auflistung der während der Projektlaufzeit durchgeführten Transfermaßnahmen ist in **Tabelle 21** dargestellt.

**Tabelle 21:** Durchgeführte Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel/Bemerkung	Zeitraum
Veröffentlichung auf der Internetseite des PMV	Vorstellung des Forschungsvorhabens www.pmv.tu-darmstadt.de	Q I/2019
Treffen des projektbegleitenden Ausschusses	1. Vorstellung des Forschungsvorhabens, Diskussion und Festlegung der Vorgehensweise	02.10.2018
	2. PA-Sitzung im Rahmen des AiF-Tages der Forschungsvereinigung	21.03.2019
	3. PA-Sitzung (Vortrag, Fortschrittsbericht und Diskussion, persönliche Kommunikation)	07.05.2019
	4. PA-Sitzung (Vortrag, Fortschrittsbericht und Diskussion, persönliche Kommunikation)	12.11.2019
	5. Abschlusspräsentation, Diskussion der Ergebnisse	17.12.2020
Erstellen von Berichten	Zwischenbericht für die AiF	Q I/2019 Q I/2020
	Bericht für den Verband Deutscher Papierfabriken (VDP) an europäische Papierfabriken, Zulieferer und Institute (INFOR-Forschungsreport)	Q IV/2019
Gremienarbeit	ZELLCHEMING-Fachausschuss „ENVI“	06./07.05.2019
		11./12.11.2019
Akademische Lehre, Bachelor- und Masterarbeit zur Thematik des Forschungsprojekts	Bachelorarbeit: „Untersuchung der Eignung des Wasserlinsentests als Überwachungsparameter für Papierfabriksabwässer“	Q IV/2020
Beratung kleiner und mittlere Unternehmen	Technologietransfer in interessierte Unternehmen	Kontinuierlich
Veröffentlichungen und Präsentationen von signifikanten Ergebnissen in Fachzeitschriften und bei Fachtagungen	Science Flash-Vortrag bei ZELLCHEMING-Expo	25.06.2019
	Symposium der Papieringenieure	25./26.10.2019

Durch die zahlreichen Veröffentlichungen, Vorträge und Treffen des projektbegleitenden Ausschusses war ein Ergebnistransfer zu KMU bereits während

der Projektlaufzeit gewährleistet. Ziel der Projekttreffen war die kontinuierliche Information der beteiligten Unternehmen sowie die Diskussion der Vorgehensweise und erzielten Ergebnisse. Dies diente einerseits zur Absicherung der Praxisrelevanz der durchgeführten Arbeiten und ermöglichte den Unternehmen andererseits die direkte und zeitnahe Nutzung der Forschungsergebnisse. Die Vorstellung der Forschungsarbeiten sowie detaillierter Forschungsergebnisse auf Fachtagungen und Gremien stellte die Bekanntmachung des Forschungsvorhabens und den Wissenstransfer gegenüber dem Fachpublikum aus der papierverarbeitenden Branche sicher. Außerdem wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens je eine Bachelorarbeit angefertigt. Durch die Vermittlung wissenschaftlicher Methoden und einer selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitsweise wurde somit ein Beitrag zur akademischen Ausbildung geleistet. Darüber hinaus wurde das Forschungsvorhaben Interessenten aus Industrie und Forschung auch außerhalb des projektbegleitenden Ausschusses in persönlichen Gesprächen vorgestellt und dessen Inhalte diskutiert. Weiterhin sind die in **Tabelle 22** aufgeführten Transfermaßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit geplant.

**Tabelle 22:** Geplante Maßnahmen nach Ende der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel/Bemerkung	Zeitraum
Gremienarbeit	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Präsentation aller relevanten Ergebnisse z. B. ZELLCHEMING-Fachausschüsse „ENVI“, Umweltausschuss des VDP	Q.III/ 2021
Fachtagungen	PMV-Tagung „Papier und Umwelt 2022“	Q.II/ 2022
Veröffentlichungen	Fachartikel mit Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse (z. B. Wochenblatt für Papierfabrikation)	Q.II/ 2021
Ergebnisweitergabe an interessiertes Fachpublikum	Präsentation und Diskussion der Ergebnisse im Rahmen des AiF-Tages der Forschungsvereinigung	04.11.2021
Veröffentlichung im Internet	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Veröffentlichung des Schlussberichtes auf den Internetseiten PMV, Forschungsvereinigung Zellstoff- und Papierindustrie im VDP	Q.II/ 2021
Vorlesung an der Technische Universität Darmstadt, DHBW Karlsruhe, HS München	Übernahme der Ergebnisse in die akademische Aus- und Weiterbildung	ab Q.II/ 2021
Beratung kleiner und mittelständischer Unternehmen	Technologietransfer in interessierte Unternehmen	ab Q.II/ 2021
Veröffentlichung der Ergebnisse als Poster	Posterpräsentation am PMV	Q.III/ 2021

Die im Forschungsbericht dargestellten Ergebnisse bieten für interessierte Unternehmen einen umfassenden Einblick in die Forschungsarbeiten. Eine

entsprechende Kurzzusammenfassung der Forschungsergebnisse ist auf der Homepage des PMV zu finden. Darüber hinaus wird der ausführliche Schlussbericht nach Akzeptanz durch den Fördermittelgeber publiziert und ist somit für alle Interessierten zugänglich. Weiterhin werden die Forschungsergebnisse durch Veröffentlichungen in Fachzeitschriften verbreitet und insbesondere an das Fachpublikum der oben genannten Tagungen und Gremien herangetragen. Insgesamt sind somit zahlreiche Möglichkeiten gegeben, um die Ergebnisse des Forschungsvorhabens KMUs erfolgreich verfügbar zu machen sowie den Ergebnistransfer in die Wirtschaft sicherzustellen.

## 8 Danksagung

Das IGF-Vorhaben 19761 N der Forschungsvereinigung „Kuratorium für Forschung und Technik der Zellstoff- und Papierindustrie im VDP e.V.“ wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Unser Dank gilt weiterhin den Projektbegleitern aus der Industrie für deren Unterstützung.

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## Literaturverzeichnis

- 1 Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung – AbwV) Anhang 28 Herstellung von Papier, Karton oder Pappe (Fundstelle: BGBl. I 2018, 1340 – 1344). Recherchiert unter: [https://www.gesetze-im-internet.de/abwv/anhang\\_28.html](https://www.gesetze-im-internet.de/abwv/anhang_28.html) (Zugriff: 03.03.2021).
- 2 Gartiser S., Hafner C., Hercher C., Kronenberger-Schäfer K.: Branchenbezogene Wirktestdaten für die Neukonzipierung der Abwasserverordnung; Abschlussbericht Forschungsvorhaben Nr. 206 26 302 im Auftrag des UBA, Sept. 2008, 220 S.
- 3 Gartiser S., Hafner C., Hercher C., Kronenberger-Schäfer K., Paschke A.: Whole effluent assessment of industrial wastewater for determination of BAT compliance. Part 1: Paper manufacturing industry; Environmental Science and Pollution Research 17, 865 - 865 (2010) no. 4.
- 4 DIN EN ISO 20079:2006-12: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) – Wasserlinsen-Wachstumshemmtest; Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN (Hrsgb.) Berlin: Beuth-Verlag GmbH (Dezember 2006), 38 S.
- 5 Öller H.-J.: Bewertung der aquatotoxikologischen Wirkung von Papierfabriksabwässern anhand des Lemna-Test und Ursachenermittlung bei erhöhten Dw-Werten (Wasserlinsen) München: Papiertechnische Stiftung (03/2015), 49 S. PTS-Forschungsbericht 20/14, IGF 16844. Recherchiert unter: [https://www.ptspaper.de/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06\\_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/IGF\\_16844.pdf](https://www.ptspaper.de/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/IGF_16844.pdf) (Zugriff: 12.04.2021).
- 6 Öller H.-J.: Vermeidung erhöhter Wasserlinsentoxizitäten in Papierfabriksabwässern durch gezielte Auswahl chemischer Additive zur Papierherstellung (Wasserlinsen-Additive), München: Papiertechnische Stiftung (05/2014), 50 S. PTS-Forschungsbericht 02/14, PTS-BAY IGF-1211-0005. Recherchiert unter: [http://www.ptspaper.com/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06\\_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/BAY1211\\_0005.pdf](http://www.ptspaper.com/fileadmin/PTS/PTSPAPER/06_Forschung/Dokumente/Forschungsprojekte/BAY1211_0005.pdf) (Zugriff: 15.01.2021).
- 7 Jung H., Kappen, J., Hesse, A., Götz. B.: Wasser- und Rückstandsumfrage in der deutschen Zellstoff- und Papierindustrie. Akt. Papierrundschau 01/2015; S. 26-27.
- 8 Jung, H.: Wasser- und Rückstandsumfrage in der deutschen Zellstoff- und Papierindustrie 2013. Abschlussbericht zum INFOR-Projekt 172. München 2014.
- 9 Holmborn B. et al: Fractionation, isolation and characterization of Ames mutagenic compound in kraft chlorination effluents. Environmental Science and Technology 18, 333 – 337 (1984) no. 5.
- 10 Nylund L. et al.: Gentoxicity of kraft spent liquors from different types of chlorinated procedures; Mutation Research 320, 165 – 174 (1994) no. 3.
- 11 Langi A., Priha M.: Mutagenicity in pulp and paper mill effluents and in recipients. Water Science & Technology 20, 143 – 152 (1988) no. 2.
- 12 Hamm U., Schabel S., Öller H.-J.: Comparison of the endocrine effects of treated wastewaters from different paper mills by use of an in-vitro test with modified yeast cells; Water Science & Technology 55, 213 – 221 (2007) no. 6.
- 13 Hamm U., Öller H.-J., Kuwan K.: Endokrine Substanzen in Abwässern der Papierindustrie. ipw – Das Papier -, 45 – 48 (2005) Nr. 1 und ipw – Das Papier -, 47 – 49 (2005) Nr. 2.
- 14 Christiansen-Heiska I.-L. et al.: Effects of the wood extractives dehydroabietic acid and berulinol of reproductive physiology of zebrafish (*Danio regio*) – A two-generation study; Aquatic toxicology 86, 388 – 396 (2008) no. 3.
- 15 Kovacs T. G.: Summary of case studies investigating the causes of pulp and paper mill effluent regulatory toxicity. Water Quality Research Journal of Canada 101, 21 – 25 (2004) no. 5.
- 16 Bailey H. C., Young L.: A comparison of the results of freshwater toxicity testing of pulp and paper mill effluents. Water Science & Technology 35, 350 – 313 (1997) no. 2 - 3
- 17 Pintar A. et al.: Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach effluents treated catalytic wet-air oxidation. Water Research 38, 289 – 300 (2004) no. 2.
- 18 Recherchiert unter <http://www.hydro-kosmos.de/wpflanz/h2o5.htm> (Zugriff: 03.03.2021).
- 19 Recherchiert unter <https://wildlife-media.at/bilddetails/20253/wasserlinse> (Zugriff: 03.03.2021).
- 20 "Wasserlinsentest" Skript des Fachbereichs Biologie der Hochschule Ostwestfalen-Lippe. Recherchiert unter: <https://www.hsowl.de/fb8/fileadmin/downloadverzeichnis/biologie/Wasserlinsentest.pdf> (Zugriff: 03.03.2021).
- 21 Balen B. et al.: Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. Ecotoxicology 20, 815 – 826 (2011).
- 22 John R. et al.: Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza*. Plant, Soil and Environment 54, 262 - 270 (2008) no. 6.

- 
- 23 Caicedo J. R. et al.: Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Lemna polyrrhiza*). *Water Research* 34, 3829 - 3835 (2000) no. 15.
  - 24 Lasfar S. et al.: Intrinsic growth rate: A new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus-nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication. *Water Research* 41, 2333 - 2340 (2007) no. 11.
  - 25 OECD Guidelines for the testing of chemicals, Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test, 2006. Recherchiert unter: [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhibition-test\\_9789264016194-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhibition-test_9789264016194-en#page1) (Zugriff: 03.03.2021).
  - 26 DIN ES ISO 15088:2009-06: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007); Deutsche Fassung EN ISO 15088:2008.
  - 27 Recherchiert unter <https://www.real-statistics.com/statistics-tables/dunnetts-table/> (Zugriff: 03.03.2021)
  - 28 Möbius C.-H., Abwasser der Papier- und Zellstoffindustrie (Wastewater of pulp and paper industry), 5. Auflage, Version 5.02, 2017. Recherchiert unter: [http://www.cm-consult.de/download/AbwasserCM\\_502.pdf](http://www.cm-consult.de/download/AbwasserCM_502.pdf) (Zugriff: 06.05.2020)
  - 29 Kurzweil P., Chemie: Grundlagen, technische Anwendungen, Rohstoffe, Analytik und Experimente. 11., überarbeitete und erweiterte Auflage. Lehrbuch. 2020. isbn: 978-3-658-275020.
  - 30 Papula L., Mathematische Formelsammlung: Für Ingenieure und Naturwissenschaftler: mit über 400 Abbildungen, zahlreichen Rechenbeispielen und einer ausführlichen Integraltafel. 12., überarbeitete Auflage. Wiesbaden: Springer Vieweg, 2017. ISBN: 978-3-658-16194-1. DOI: 10.1007/978-3-658-16195-8.

## Anhang

### I. NOEC

Zur Schätzung des NOEC wird die ANOVA-Methode (Analysis of Variance) verwendet. Sie dient zur Berechnung der mittleren spezifischen Wachstumsrate und der Reststandardabweichung über die Wiederholung für jede Testkonzentration. Der sich ergebende Mittelwert für jede Testkonzentration wird anschließend mit dem Kontrollmittelwert unter Verwendung des Dunnett's-Tests als geeignete Mehrfachvergleichsmethode verglichen. Der  $t_i$ -Wert jeder Verdünnungsstufe kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$t_i = Y_1 - Y_i \quad (3)$$

Die Minimum Signifikant Differenz ( $MSD$ ) wird nach Gleichung (18) zum Vergleich von Mittelwertunterschieden verwendet

$$MSD = d \cdot \sqrt{\frac{2MS_w}{n}} \quad (4)$$

$t_i$   $t$  Statistik jeder Konzentration

$MSD$  Minimum Signifikant Differenz

$Y_1$  Mittelwert der Kontrolle

$Y_i$  Mittelwert der Konzentration  $i$

$S_w$  Mittlere Quadratsumme innerhalb der Gruppe

$n$  Anzahl der Replikate

$d$  Kritischer Wert des Dunnett's-Tests [27]

Die niedrigste Verdünnungsstufe (entspricht einer hohen Abwasserkonzentration), die  $t_i > MSD$  beweisen kann, wurde als NOEC definiert. Das Wachstum der Wasserlinsen in den Proben war somit genauso oder besser als die der Kontrolle und es wurde kein toxischer Effekt beobachtet.

NOEC wurde für die schwarzbandfiltrierte Proben, die von einem Tag bis zwei Wochen im Tiefkühlschrank gelagert wurden berechnet. Diese basiert auf die Rohdaten der Wachstumsrate bzgl. der Frondfläche. Da die Auswertung der Wachstumsrate bzw. Wachstumshemmung bzgl. der Frondfläche bei allen Untersuchungen einen schlechteren Wert aufweist, wurde hier der NOEC auf Basis der Frondfläche berechnet. Die berechnete NOEC für jede Papierfabrik sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

**Papierfabrik A**

Die Abwasserprobe aus Ablauf der Nachkläranlage wurde nach der Probenahme schwarzbandfiltriert und eingefroren.

**A)** Durchführung des Wasserlinsen-Test ein Tag nach der Probenahme.

**Tabelle 22:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 1 Tag nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate	0,283	0,298	0,345	0,331	0,342	0,336	0,326
(bzgl. der	0,293	0,245	0,333	0,330	0,332	0,346	0,323
Fronfläche)	0,290	0,262	0,322	0,326	0,324	0,337	0,338

**Tabelle 23:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,013	0,002
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,0022	0,0001
Prüfgröße (F)	14,77	
P-Wert	2,45E-05	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 24:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,029)$
Kontrolle	0,289		
V1	0,268	-0,02	Nein
V2	0,333	0,044	Ja = NOEC
V4	0,329	0,040	Ja
V8	0,332	0,043	Ja
V12	0,34	0,051	Ja
V24	0,329	0,04	Ja

**B) Durchführung des Wasserlinsen-Tests zwei Wochen nach der Probenahme****Tabelle 25:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 2 Wochen nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate	0,294	0,283	0,356	0,374	0,326	0,329	0,333
(bzgl. der	0,306	0,285	0,326	0,309	0,324	0,336	0,352
Fronfläche)	0,294	0,290	0,336	0,365	0,361	0,343	0,336

**Tabelle 26:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,010	0,004
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,001	0,0003
Prüfgröße (F)	5,83	
P-Wert	0,003	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 27:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,041)$
Kontrolle	0,298		
V1	0,286	-0,012	Nein
V2	0,340	0,042	Ja
V4	0,349	0,051	Ja
V8	0,337	0,038	Nein
V12	0,336	0,037	Nein
V24	0,340	0,042	Ja

Bei dieser Untersuchung lag der NOEC erst bei V2. Danach verschlechterte sich das Wachstum der Wasserlinsen bei V8 und V12. Da die Wachstumshemmung dieser Proben noch unter 10 % lag, wurden die Proben als unbedenklich klassifiziert. Allerdings ist die Bestimmung des NOEC in diesem Fall nicht möglich. Es kann somit nicht eindeutig festgelegt werden, ob V2 oder V24 verwendet werden soll.

**Papierfabrik E**

Die Abwasserprobe aus Ablauf der Nachkläranlage wurde nach der Probenahme schwarzbandfiltriert und eingefroren.

**A)** Durchführung des Wasserlinsen-Test ein Tag nach der Probenahme.

**Tabelle 28:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 1 Tag nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate	0,281	0,343	0,318	0,338	0,337	0,338	0,331
(bzgl. der	0,299	0,349	0,330	0,331	0,336	0,375	0,344
Fronfläche)	0,306	0,301	0,329	0,326	0,332	0,347	0,327

**Tabelle 29:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,005	0,002
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,0009	0,0001
Prüfgröße (F)	4,69	
P-Wert	0,008	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 30:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,033)$
Kontrolle	0,295		
V1	0,331	0,035	Ja
V2	0,325	0,030	Nein
V4	0,332	0,036	Ja = NOEC
V8	0,335	0,040	Ja
V12	0,354	0,058	Ja
V24	0,334	0,038	Ja

**B) Durchführung des Wasserlinsen-Tests zwei Wochen nach der Probenahme****Tabelle 31:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 2 Wochen nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate	0,321	0,391	0,333	0,352	0,365	0,361	0,360
(bzgl. der	0,315	0,364	0,352	0,346	0,376	0,388	0,372
Frondfäche)	0,317	0,313	0,370	0,356	0,381	0,363	0,374

**Tabelle 32:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,006	0,004
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,001	0,0003
Prüfgröße (F)	3,33	
P-Wert	0,029	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 33:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD (=0,043)$
Kontrolle	0,318		
V1	0,356	0,038	Nein
V2	0,352	0,034	Nein
V4	0,352	0,033	Nein
V8	0,374	0,056	Ja = NOEC
V12	0,371	0,053	Ja
V24	0,369	0,051	Ja

**Papierfabrik H**

Die Abwasserprobe aus Ablauf der Nachkläranlage wurde nach der Probenahme schwarzbandfiltriert und eingefroren.

**A)** Durchführung des Wasserlinsen-Test ein Tag nach der Probenahme.

**Tabelle 34:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 1 Tag nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate (bzgl. der Fronfläche)	0,333	0,342	0,343	0,366	0,369	0,364	0,349
	0,339	0,355	0,343	0,345	0,352	0,358	0,377
	0,336	0,354	0,343	0,333	0,357	0,361	0,366

**Tabelle 35:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,001	0,001
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,0003	8,86E-05
Prüfgröße (F)	3,39	
P-Wert	0,028	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 36:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,022)$
Kontrolle	0,336		
V1	0,350	0,014	Nein
V2	0,344	0,008	Nein
V4	0,348	0,012	Nein
V8	0,359	0,023	Ja = NOEC
V12	0,361	0,024	Ja
V24	0,364	0,027	Ja

**B) Durchführung des Wasserlinsen-Tests zwei Wochen nach der Probenahme****Tabelle 37:** Wachstumsrate der Wasserlinsen 2 Wochen nach der Probennahme für verschiedene Verdünnungsstufen

Probe	Kontrolle	V1	V2	V4	V8	V12	V24
Wachstumsrate (bzgl. der Fronfläche)	0,376	0,383	0,378	0,403	0,407	0,414	0,416
	0,379	0,395	0,399	0,413	0,419	0,408	0,413
	0,382	0,439	0,380	0,406	0,416	0,408	0,405

**Tabelle 38:** Ergebnisse des Anova-Tests

$\alpha = 0,05$	Differenz zwischen den Gruppen	Differenz innerhalb der Gruppen
Quadratsummen (SS)	0,003	0,002
Freiheitsgrad	6	14
Mittlere Quadratsumme	0,0005	0,0001
Prüfgröße (F)	3,61	
P-Wert	0,022	
Kritischer F-Wert	2,84	

**Tabelle 39:** Ergebnisse des Dunnett's-Tests

Probe	Mittelwert	$t_i$	$t_i > MSD(=0,029)$
Kontrolle	0,379		
V1	0,406	0,026	Nein
V2	0,386	0,006	Nein
V4	0,407	0,028	Nein
V8	0,414	0,034	Ja = NOEC
V12	0,410	0,030	Ja
V24	0,412	0,032	Ja

## II. Fragebogen

<b>Papierfabrik (Werk-Code)</b>	
erzeugte Papiersorte	
Produktionskapazität (Jahrestonnen)	
Abwasser pro Tonne produziertes Papier (m <sup>3</sup> /t)	
Frischwassermenge (m <sup>3</sup> /t)	
Abwasserreinigungstechnologie	
<b>Parameter des gereinigten Abwassers (Nachkläranlage)</b>	
CSB homog. (mg/l)	
P gesamt (mg/l)	
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	
NH <sub>4</sub> -N (mg/l)	
AFS (mg/l)	
Trübung (TEF)	
AOX (mg/l)	
TNb (mg/l)	
Temp. (°C)	
pH-Wert	
Leitfähigkeit (mS/cm)	
<b>Zusatz von chemischen Additiven</b>	
Produktion (z.B. Retentionsmittel Fixiermittel, Komplexbildner)	
ARA (z.B. Entschäumer, Flockungsmittel)	