

Oekotoxzentrum
Eawag
Überlandstrasse 133
Postfach 611
CH-8600 Dübendorf

T +41 (0)44 823 55 62
F +41 (0)44 823 58 63
info@oekotoxzentrum.ch
www.oekotoxzentrum.ch



Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
Centre Suisse d'écotoxicologie appliquée
Eawag-EPFL

Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließsgewässern

Studie im Auftrag des BAFU

Abschlussbericht

16. Juli 2012





Impressum

Herausgeber/Auftragnehmer

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

Im Auftrag von

Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abteilung Wasser, CH-3003 Bern

Das BAFU ist ein Amt des Eidgenössischen Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Autoren

Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie
Eawag/EPFL

Cornelia Kienle, Petra Kunz, Etienne Vermeirssen, Nadzeya Homazava und Inge Werner

Danksagung

Die Initiatoren des Projekts ebenso wie die Autoren möchten den folgenden Personen für ihre wertvollen Kommentare und Beiträge danken:

Bundesamt für Umwelt

Michael Schärer, Paul Liechti

Begleitgruppe des Moduls
Ökotoxikologie im
Modulstufenkonzept

Michael Schärer (Vorsitz), Arielle Cordonier (*Service cantonal de l'écologie de l'eau*, Kt. Genf), Rik Eggen (Eawag), Andreas Häner (BMG Engineering AG), Barbara Känel (AWEL, Kt. Zürich), Margie Koster (Amt für Umwelt, Kt. Thurgau), Frank Lang (Interkantionales Labor, Kt. Schaffhausen), Sergio Santiago (Soluval Santiago), Kristin Schirmer (Eawag)

Bundesanstalt für
Gewässerkunde (BfG),
Koblenz

Georg Reifferscheid, Ramona Pfänder, Sebastian Buchinger

BMG Engineering AG

Felix Bühler, Bernhard Stettler

Envilab AG

Christian Götz

Biodetection Systems

Peter Behnisch, Harrie Besselink, Sander van der Linden

RWTH Aachen

Henner Hollert, Sibylle Maletz, Tilman Floehr

Schweizerisches Zentrum für
angewandte Ökotoxikologie
Eawag/EPFL

Carolina Di Paolo, Robert Kase, Anke Schäfer



Hinweis

Diese Studie wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt durchgeführt und durch das Schweizerische Zentrum für angewandte Ökotoxikologie kofinanziert. Der Herausgeber/Auftragnehmer ist allein für den Inhalt verantwortlich.

Kontakt

Cornelia Kienle: cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch

Petra Kunz: petra.kunz@oekotoxzentrum.ch

Zitiervorschlag

Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Homazava, N., Werner, I. 2012. Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fliessgewässern. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Eawag-EPFL, Dübendorf.

Dübendorf, Schweizerisches Zentrum für Angewandte Ökotoxikologie, Eawag/EPFL,
16.07.2012

Titelfoto: Andri Bryner, Eawag



Zusammenfassung

Einleitung: In der Schweiz werden im Rahmen der Aktivitäten der *Koordinierten Beobachtung Oberflächengewässer (KBO)* sowie des Vorgängerprojektes *Modulstufenkonzept (MSK)*, standardisierte Methoden für die Untersuchung und Bewertung des Zustandes der Fliessgewässer erarbeitet, um so strukturelle, hydrologische, biologische, chemische sowie ökotoxikologische Aspekte der Wasserqualität zu erfassen und gegebenenfalls Massnahmen zur Verminderung dieser Belastung ergreifen zu können.

Zielsetzung des *Moduls Ökotoxikologie* innerhalb des MSK bzw. der KBO ist die Entwicklung eines, auf ökotoxikologischen Biotests basierenden, Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests, bestehend aus Probenahme, Probenaufbereitung, Biotests und Beurteilung der Effekte. Die Biotests sollen sensitiv, wirkungsbasiert, einfach durchführbar, kostengünstig und gut interpretierbar sein.

In dem vorliegenden Bericht werden ausgewählte Testsysteme zur Detektion und Quantifizierung von Östrogenität in Wasserproben für eine Anwendung durch Vollzugsbehörden und private Labore evaluiert.

Inhalt/ Durchführung: Es wird aufgezeigt, welche Elemente ein Biotest-basiertes Erhebungs- und Beurteilungskonzept beinhaltet. Neben einem Vergleich der betrachteten Testsysteme werden die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben. Dazu wird insbesondere die Anwendung, Auswertung und Interpretation von Biotests zur Beurteilung von Abwasser- und Oberflächengewässerproben am Beispiel östrogenen Effekte vorgestellt und evaluiert. Neben den Resultaten einer Messkampagne an 14 Schweizerischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) im Frühjahr 2010 werden dabei auch Beispiele aus der Literatur betrachtet.

In der Messkampagne wurden zwei ausgewählte *in vitro* Tests eingesetzt, die eine östrogene Wirkung über Rezeptoraktivierung messen:

1. ein Rezeptorbindungstest mit Hefen (Yeast Estrogen Screen, YES) und
2. ein Rezeptorbindungstest mit einer menschlichen Zelllinie (Estrogen Receptor - Chemical Activated Luciferase Gene Expression, ER-CALUX®).

Als ergänzender Test wurde der Steroidhormontest H295R mit einer menschlichen Zelllinie angewendet, mit dem das Gleichgewicht körpereigener Steroidhormone im Organismus erfasst werden kann. Begleitend wurde die chemische Analytik der wichtigsten bekannten östrogenen Stoffe aus kommunalem Abwasser (17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, Estron, Bisphenol A und Nonylphenol) durchgeführt.

In Anlehnung an die Methoden des MSK bzw. der KBO wird zur Beurteilung der Messwerte exemplarisch ein 3-skalgiges Gütebeurteilungssystem verwendet, das verfügbare Vorschläge für chronische Umweltqualitätskriterien von Östrogen aktiven Substanzen einbezieht.

Ergebnisse: Mit chemischer Analytik lässt sich die Wasserqualität in Bezug auf eine Belastung mit Östrogenen nicht gesamthaft beurteilen, da die Bestimmungsgrenzen für einige der bekannten Substanzen höher als deren Effektkonzentrationen liegen und nicht alle potentiell relevanten Substanzen mit einer Einzelstoffanalytik erfasst werden können. Die Gütebeurteilung mit den erhobenen Biotestdaten von 14 Schweizerischen ARA zeigt, dass die Wasserqualität bzgl. östrogenen Belastung im ER-CALUX® teilweise schlechter bewertet wird als im YES. Je nach Biotest wurde das chronische Qualitätskriterium in 33% (ER-CALUX®) bis 67% (YES) der Oberflächengewässer vor der Abwassereinleitung der untersuchten ARA



eingehalten. In den Oberflächengewässern unterhalb der ARA wurde es im YES noch in 20% der Fliessgewässer eingehalten, in 50% der Fälle trat eine Überschreitung auf. Bei Bewertung mit dem ER-CALUX® wurde in 80% der Fälle eine Überschreitung des Qualitätskriteriums gemessen. Die Umrechnung der im ARA-Ablauf gemessenen Estradioläquivalente mit der entsprechenden Verdünnung durch das Fliessgewässer ergab eine gute Übereinstimmung mit den direkt im Oberflächengewässer gemessenen Werten.

Schlussfolgerungen: Als pragmatisches Vorgehen für die Grobbeurteilung abwasserbelasteter Gewässer wird empfohlen, die Östrogenität im ARA-Ablauf mit dem YES-Test zu messen und daraus die resultierende Gewässerbelastung über die Verdünnung im Fliessgewässer abzuschätzen. Eine solche Grobbeurteilungsmethode lässt sich auch auf weitere Testsysteme zur Messung anderer Effekte anwenden und stellt eine wichtige Ergänzung zu den gängigen im Vollzug verwendeten spurenanalytischen Methoden dar. Der YES-Test ist zwar 10-fach weniger empfindlich als der ER-CALUX®, jedoch gut für die Bewertung stärker belasteter Proben einsetzbar und geeignet, um die Einhaltung möglicher Qualitätskriterien zu überprüfen. Der Hauptvorteil dieser Testmethode liegt aber in seiner guten Eignung für eine Anwendung in kantonalen und privaten Laboratorien. Der Test ist relativ einfach durchzuführen und preiswert. Sind vertiefte oder ergänzende Untersuchungen gewünscht, können beispielsweise *in vivo*-Tests gemacht werden oder auch der H295R angewendet werden. Diese Tests sind aber momentan für Routineuntersuchungen weniger geeignet.

Aktuell lässt sich keine Biotest-basierte Methode zur direkten Beurteilung von Oberflächengewässerproben vorschlagen, da diese weniger belastet sind als Proben aus ARA-Abwasser. Dazu müssen infrage kommende Testsysteme zunächst noch besser validiert werden. Die hier aufgezeigten Konzepte und Methoden sind jedoch vielversprechend und zeigen auf, dass mit Biotests grundsätzlich die östrogene Aktivität in Fliessgewässern erfasst werden kann.

Handlungsbedarf: Ein Konzept zur ökotoxikologischen Grobbeurteilung der Wasserqualität in abwasserbelasteten Gewässern anhand von Biotests soll konkretisiert werden. Es soll geprüft werden, welche zusätzlichen Methoden dafür geeignet sind. Bereits laufende Arbeiten mit dem Ziel der internationalen Standardisierung von Biotests zur Messung östrogener Effekte und von Algentoxizität sollen weiter vorangetrieben werden. Dazu werden unter anderem Arbeiten zu Variabilität und Wiederfindung durchgeführt. Dabei sollen auch Verfahren identifiziert werden, die für eine Anwendung in Oberflächengewässern infrage kommen, z.B. ein optimiertes YES-Verfahren mit höherer Sensitivität, oder der ER-CALUX®.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abkürzungen	v
1 Einleitung	1
1.1 Das Modulstufenkonzept mit Folgeprojekt „Koordinierte Beobachtung Oberflächengewässer“	1
1.2 Gesetzliche Grundlagen	1
1.3 Das Modul Ökotoxikologie	2
1.4 Zielsetzung des vorliegenden Berichts	4
2 Überblick über verfügbare (biotestbasierte) Erhebungs- und Beurteilungsmethoden	5
2.1 Anwendung von Biotests zur Bewertung von Abwasser, Sedimenten und Altlasten	5
2.2 Anwendung von Biotests zur Erfolgskontrolle erweiterter Abwasserbehandlung	6
2.3 Biologische und chemische Erhebungs- und Beurteilungsmethoden im Modulstufenkonzept	6
2.4 Beurteilung der Wasserqualität mit Umweltqualitätskriterien	7
3 Vorschlag eines biotestbasierten Erhebungs- und Beurteilungs-konzeptes	8
3.1 Beschreibung der Elemente des Erhebungs- und Beurteilungskonzeptes	8
3.2 Probenahmestrategie und Probenahme	9
3.3 Probenaufbereitungsmethoden für <i>in vitro</i> Biotests zur Messung östrogenen Aktivität	11
3.4 Testsysteme zur Messung östrogenen Aktivität	13
3.5 Auswertungsmethoden für Biotests	18
3.6 Methodvalidierung	22
3.7 Beurteilung der Resultate anhand von Güteklassen	24
4 Ergebnisse der Biotests und Diskussion	27
4.1 Vergleich und Diskussion der EEQ Werte aus YES und ER-CALUX®	27
4.2 Vergleich der EEQ aus Biotests und chemischer Analytik	29
4.3 Umweltrelevanz der Testergebnisse	31
4.4 Vergleich der Ergebnisse der Messkampagne mit anderen Studien in der Schweiz und weiteren Ländern	32
5 Vorschlag für das Vorgehen zur Beurteilung der östrogenen Belastung von Oberflächengewässern	33
5.1 Überblick über die einzelnen Schritte	33
5.2 Risikobeurteilung der Ergebnisse aus der Messkampagne Östrogene	34
6 Gesamtdiskussion der Biotests und des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept	36
7 Schlussfolgerungen und Ausblick	40
8 Referenzen	41



9	Verzeichnisse (Tabellen und Abbildungen)	52
9.1	Abbildungsverzeichnis	52
9.2	Tabellenverzeichnis	54
Anhang 1:	Details zu den Elementen des Beurteilungskonzeptes	56
	Probenaufbereitung	56
	Beschreibung der ausgewählten Biotests	58
	Rezeptorbindungstests	58
	Tests zur Untersuchung der Steroidgenese (Bildung von Steroidhormonen)	59
Anhang 2:	Beschreibung des Vorgehens für die Messkampagne	68
a)	Auswahl der Probestellen	68
b)	Probenahme und Probentransport	68
c)	Probenvorbereitung und Aufkonzentrierung für Analytik und Biotests	69
d)	Anwendung der Biotests	69
e)	Datenauswertung	71
f)	Chemische Analytik von Östrogenen	74
Anhang 3:	Weitere Ergebnisse der Messkampagne	75
	Ergebnisse des H295R Steroidgenese Assays und Vergleich mit YES, ER-CALUX® und Analytik	75
	Ergebnisse der chemischen Analytik - Umweltrelevanz	77
	Tabellen und/oder Abbildungen mit den Ergebnissen der Biotests	78
	Tabellen mit den Ergebnissen der Östrogenanalytik	82
	Tabellen mit Ergebnissen des Screenings auf 80 Mikroverunreinigungen im Rahmen des Projektes Strategie Micropoll	84



Abkürzungen

AA-EQS	Chronisches Umweltqualitätskriterium (annual average environmental quality standard)
ACE	Analysing combination effects of mixtures of oestrogenic chemicals in marine and freshwater organisms. EU research on environment and health, 5th Framework Programme
ARA	Abwasserreinigungsanlage
BPA	Bisphenol A
CQK	Chronisches Qualitätskriterium (vergleichbar mit dem AA-EQS)
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
EC	Effektkonzentration oder Wirkkonzentration
EC _x	Konzentration bei welcher ein x%-iger Effekt induziert wird, wobei der Maximaleffekt des Standards 100% entspricht
EE2	17 α -Ethinylestradiol
EEF	Estradioläquivalenzfaktor
EEQ	17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (17 β -estradiol equivalent concentration)
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EQS	Umweltqualitätskriterium (environmental quality standard)
ER-CALUX	Estrogen Receptor-mediated Chemically Activated LUCiferase gene eXpression
ER α	Estrogenrezeptor α
FACEiT	Fast Advanced Cellular and Ecosystems Information Technologies. Research project supported by the 6th EU Framework Programme
FIRE	Risk Assessment of Brominated Flame Retardants as Suspected Endocrine-Disrupters for Human and Wildlife Health. EU research on environment and health, 5th Framework Programme
GSchV	Gewässerschutzverordnung
H295R	Steroidgenese Assay mit einer humanen Nebennierenkarzinom-Zelllinie
HPLC	Flüssigchromatographie (high-performance liquid chromatography)
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
KBO	Koordinierte Beobachtung Oberflächengewässer
LLE	Flüssig-flüssig Extraktion (Liquid-liquid extraction)
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie Massenspektrometrie (liquid chromatography tandem mass spectrometry)



LOD	Detektionslimite oder Nachweisgrenze (limit of detection)
LOEC	Niedrigste beobachtete Wirkkonzentration (lowest observed effect concentration)
LOQ	Quantifizierungslimite oder Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
MIP-SPE	SPE mit molekular aufgedruckten Polymeren
MSK	Modulstufenkonzept
MTT	Zytotoxizitätstest
NOEC	Konzentration bei der kein Effekt beobachtet wird (no observed effect concentration)
NP	Nonylphenol
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development)
Q ₃₄₇	Niedrigwasserabfluss (Abflussmenge, die, gemittelt über zehn Jahre, durchschnittlich während 347 Tagen des Jahres erreicht oder überschritten wird und die durch Stauung, Entnahme oder Zuleitung von Wasser nicht wesentlich beeinflusst ist.)
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SOP	Standardarbeitsanweisung (standard operation procedure)
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPME	Festphasen-Mikroextraktion (solid phase micro extraction)
TEQ	Toxische Äquivalenzkonzentration (toxic equivalent concentration)
YES	Yeast Estrogen Screen



1 Einleitung

1.1 Das Modulstufenkonzept mit Folgeprojekt „Koordinierte Beobachtung Oberflächengewässer“

Im Rahmen der *Koordinierten Beobachtung Oberflächengewässer (KBO)* und dem Vorgängerprojekt *Modulstufenkonzept (MSK)* werden für die Schweiz standardisierte Methoden für die Untersuchung und Bewertung des Zustandes der Fliessgewässer erarbeitet. Die Methoden dienen dazu, in verschiedenen Stufen mit unterschiedlicher Bearbeitungsintensität strukturelle und hydrologische, biologische, chemische sowie ökotoxikologische Aspekte der Wasserqualität zu erfassen (Liechti et al., 1998). Ziel ist die Einteilung der Gewässer in verschiedene Güteklassen (<http://www.modul-stufen-konzept.ch>).

Im Modulstufenkonzept wird zwischen drei Stufen (F, S, A) unterschieden, die auch unterschiedliche Detaillierungsgrade der Untersuchung beinhalten, wobei der Aufwand für die Erhebung der Daten von Stufe F zu A zunimmt. Eine flächendeckende Untersuchung (F) schliesst alle Fliessgewässer in einem Gebiet ein, systemhaft (S) werden ganze Fliessgewässer (idealerweise mit allen wichtigen Zuläufen) und abschnittsweise (A) ausgewählte Gewässerbereiche untersucht.

Die erarbeiteten Methoden sollen den kantonalen Fachstellen als Vollzugshilfen dienen. Im MSK-Folgeprojekt KBO sollen die Module nun verstärkt angewendet und weiter in der Gewässerbeurteilung implementiert werden. In der Arbeitsgruppe (AG) Methoden, bestehend aus Vertretern von Behörden, Kantonen, privaten Laboren und der Forschung, werden die erarbeiteten Methoden diskutiert und bearbeitet. Zudem soll ein Gesamtkonzept entwickelt werden, in dem die Daten aus den einzelnen Modulen integriert und eine Gesamtbewertung des Gewässerzustandes vorgenommen wird (Bundi et al., 2008).

1.2 Gesetzliche Grundlagen

Der Zweck der Schweizerischen Gewässerschutzverordnung (GSchV, SR 814.201; Art. 1) (Schweizerischer Bundesrat, 1998) ist der Schutz von ober- und unterirdischen Gewässern vor nachteiligen Einwirkungen und die Ermöglichung einer nachhaltigen Nutzung der Gewässer. In Anhang 1 (Art. 1(3)) sind die ökologischen Ziele definiert.

Darin ist u.a. festgehalten, dass Stoffe, die die Gewässer verunreinigen können und die durch menschliche Tätigkeit ins Wasser gelangen können, keine nachteiligen Einwirkungen auf die Lebensgemeinschaften von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen und auf die Nutzung der Gewässer haben dürfen. Die Ziele des Anhang 1 müssen bei Massnahmen aufgrund der GSchV berücksichtigt werden. Das Modul Ökotoxikologie soll dabei ergänzend zu anderen Methoden eine Beurteilung möglicher Einwirkungen auf die Lebensgemeinschaften von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen erlauben.



1.3 Das Modul Ökotoxikologie

Zielsetzung

Bisher existiert kein auf ökotoxikologischen Biotests basierendes Konzept für die Beurteilung der Wasserqualität Schweizerischer Oberflächengewässer. Die Zielsetzung des Moduls Ökotoxikologie innerhalb der KBO ist die Entwicklung eines belastbaren Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests. Dieses Konzept soll Probenahme, Probenaufbereitung, Biotests und die Beurteilung der Effekte umfassen. Die erarbeiteten Methoden für das Modul Ökotoxikologie sollen abschnittsweise, d.h. an ausgewählten Gewässerbereichen, angewendet werden und den kantonalen Fachstellen als Beurteilungs- und Vollzugshilfen dienen.

Das Ziel dieser Arbeiten ist die Beantwortung der Fragen:

- Welche Biotests können heute in der Praxis angewendet werden?
- Wie sollen die Biotest angewendet und interpretiert werden?
- Wo sind noch weitere Arbeiten nötig?

Erste Arbeiten und Schlussfolgerungen daraus

In der Vergangenheit wurden bereits Studien im Rahmen des Moduls Ökotoxikologie durchgeführt. Schweigert et al. (2001) schlugen eine zweistufige Vorgehensweise vor. In einer ersten Stufe sollte mit verschiedenen *in vitro* Screeningtests ein mögliches toxisches Potential evaluiert werden, um anschliessend im Rahmen einer zweiten Stufe mit ausgewählten Organismen zu überprüfen, ob das toxische Potential auch dort zu negativen Effekten führt.

Die vorgeschlagenen Screeningtests umfassen relevante toxische Endpunkte, vor allem DNA-Schäden, Neurotoxizität, Photosynthesehemmung und Reproduktionsstörungen. Anhand dieses Vorschlages wurde eine Testbatterie entwickelt, die in mehreren Studien sowohl an Abwasser- als auch an Fliessgewässerproben erprobt wurde (Chèvre und Eggen, 2006; Escher und Chèvre, 2004). Dieses Konzept wurde im Jahr 2006 durch Experten evaluiert. Hierbei wurden die verschiedenen Elemente der Beurteilungsmethode (Probenahme, Probenaufbereitung und –testung, Interpretation der Daten) beurteilt. Die Verwendung ökotoxikologischer Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität wurde grundsätzlich als sehr sinnvoll erachtet. Die vorgeschlagenen Testsysteme decken nach Einschätzung der Experten ein breites Spektrum von schädlichen Wirkungen auf das Gewässerökosystem ab, allerdings sollten die Methoden noch weiter validiert und evaluiert werden. Auch die Auswahl der Effekte bzw. ihre Vollständigkeit sollte kritisch hinterfragt werden. Zum Beispiel wurde daraufhin im Rahmen des Projektes „Strategie Micropoll“ die vorgeschlagene *in vitro* Testbatterie auf kommunale Abwasser- und Fliessgewässerproben angewendet und verschiedene Probenaufbereitungsmethoden evaluiert (Escher et al., 2007a; Escher et al., 2007b).



Heutige Organisation

Aufbauend auf den Erkenntnissen bisheriger Arbeiten soll nun - in Zusammenarbeit mit dem BAFU und einer Begleitgruppe (bestehend aus Vertretern von Behörden, Kantonen, Auftragslaboren und Forschungsinstituten) - ein Beurteilungskonzept zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests erarbeitet werden.

Der Fokus liegt zunächst auf spezifischen Problemstellen (Stufe A), wie zum Beispiel Gewässern mit einer Beeinflussung durch:

- gereinigtes Abwasser (hoher Abwasseranteil)
- Mischwasser aus Kanalsystemen,
- Stoffeinträge aus der Landwirtschaft,
- Eintrag von Strassenabwässern.

Hierfür ist die Entwicklung einer einheitlichen Vorgehensweise zur Identifikation der relevantesten Schadstoffquellen und -einträge hilfreich, insbesondere um:

- eine ökotoxikologische Beurteilung der Gewässerverschmutzung zu ermöglichen,
- die ökotoxikologische Bedenklichkeit/Unbedenklichkeit (bezüglich spezifischer Effekte) von Stoffeinträgen zu beurteilen,
- Entscheidungshilfe bei komplexen Entscheidungen, z.B. einer Massnahmenplanung, zu leisten,
- bestehende Beurteilungsmethoden zu ergänzen (z.B. Spurenanalytik (Götz et al., 2011) oder Zusammensetzung des Makrozoobenthos (Stucki, 2010)) und ein integrales Bild der Belastung zu zeigen,

und so mit Hilfe einer dafür entwickelten Probenahme- und Beurteilungsstrategie bei Bedarf die Wasserqualität anhand von Biotests zu beurteilen.

Für die Erarbeitung des Moduls sollen sowohl internationale Konzepte (z.B. aus Deutschland, Österreich, den Niederlanden, Frankreich und den USA) herangezogen werden, als auch bisherige Erfahrungen in der Schweiz.

Die Arbeiten erfolgen unter Federführung des BAFU am Oekotoxzentrum und werden durch eine Arbeitsgruppe mit Experten aus privaten Labors, kantonalen Gewässerschutzfachstellen und der Forschung gesteuert/begleitet.



1.4 Zielsetzung des vorliegenden Berichts

In dieser Studie wurde ein erster Entwurf für eine Methode zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests zur Messung der Östrogenität von kommunalem Abwasser (stellvertretend für andere wichtige Endpunkte) erarbeitet. Diese Methode soll als Ergänzung bestehender Methoden zur Beurteilung von Fliessgewässern dienen. In Box 1 sind die Gründe für den Fokus auf Östrogen aktive Substanzen erläutert.

Box 1: Warum Östrogene?

Die Stoffgruppe der Östrogen aktiven Substanzen wurde durch die Begleitgruppe des Moduls Ökotoxikologie ausgewählt, da ihr Risikopotential für empfindliche Gewässer bereits vielfach aufgezeigt wurde (z.B. NFP 50 ,2008) und zahlreiche nationale und internationale Studien hierzu vorliegen.

In der Umwelt vorkommende natürliche und synthetische Östrogene weisen eine sehr hohe biologische Aktivität auf, was sich in ökotoxikologischen Qualitätskriterien von weniger als 1 Nanogramm pro Liter für besonders aktive Stoffe wie das synthetische 17 α -Ethinylestradiol (EE2) äussert (siehe auch <http://www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege>). Solche Wirkkonzentrationen sind derzeit auch mit aufwändiger chemischer Spurenanalytik nicht nachweisbar (Götz et al., 2010a). Des Weiteren sind unbekannte Wirkungen von Chemikalienmischungen bei der Einzelstoffbewertung nicht berücksichtigt. Daher sind Methoden zur Risikobewertung, die sich auf analytische Daten stützen, nur bedingt auf Umweltproben anwendbar und Qualitätskriterien für Östrogen aktive Stoffe sind analytisch sehr schwer zu überwachen.

Die Beurteilung der Wasserqualität soll auf sensitiven, wirkungsbasierten, einfach handhabbaren, kostengünstigen und einfach interpretierbaren Biotests zur Messung östrogenen Effekte in Oberflächengewässern basieren.

In einem ersten Schritt wurden verschiedene biologische Testsysteme zur Messung östrogenen Effekte in belasteten Wasser- und Abwasserproben auf ihre Eignung für eine Anwendung im Vollzug beurteilt. Die Evaluation geeigneter Testverfahren und die Identifikation von Datenlücken und weiterem anwendungsorientiertem Forschungsbedarf erfolgte anhand einer Messkampagne an Schweizerischen Kläranlagen und Fliessgewässern und unter Einbeziehung der verfügbaren Literatur. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wird eine Beurteilungsmethode für die praktische Anwendung vorgeschlagen.

Längerfristig soll eine umfassendere (d.h. auch andere Effekte berücksichtigende) Methode zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests entwickelt werden. Dieser Bericht zeigt unter anderem den weiteren Handlungsbedarf auf.



2 Überblick über verfügbare (biotestbasierte) Erhebungs- und Beurteilungsmethoden

2.1 Anwendung von Biotests zur Bewertung von Abwasser, Sedimenten und Altlasten

Biotests werden in verschiedenen Ländern (z.B. Deutschland, Österreich, den USA und teilweise auch der Schweiz) bereits jetzt zur Bewertung der Giftigkeit von Abwässern oder Sedimenten eingesetzt. Hierfür werden in der Regel Testorganismen verschiedener trophischer Stufen/Ernährungsebenen verwendet: Vertreter von Primärproduzenten (Algen, Pflanzen), Konsumenten (z.B. Wasserflöhe, Fische) und Destruenten (z.B. Leuchtbakterien).

In Deutschland sind in der Abwasserverordnung (AbwV) (Bundesministerium der Justiz, 1997) eine Reihe von Biotests (mit Leuchtbakterien, Algen, Wasserflöhen und Fischembryonen) vorgeschrieben. Zur Untersuchung einer möglichen Gentoxizität wird der umuC-Test mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* (International Organization for Standardization, 2000) eingesetzt. Mit diesen Biotests müssen Industriebetriebe, Kläranlagenbetreiber und sonstige Abwassereinleiter die Giftigkeit ihres Abwassers prüfen. Für das Gesamtabwasser sind Anforderungen festgelegt, die von den Einleitern eingehalten werden müssen. Die Toxizität des Abwassers geht, zusammen mit weiteren physikalisch-chemischen Parametern wie z.B. Gesamtphosphor, Gesamtstickstoff, CSB-Wert und Gehalt an absetzbaren Stoffen, in die Berechnung der Abwassergebühren ein, ggfs. werden Starkverschmutzerzuschläge erhoben (Lesche et al., 2010). In Österreich kommt ein ähnliches Konzept in der Abwasseremissionsverordnung (AAEV) zum Einsatz (Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft, 1996).

Bei der Beurteilung von Sedimenten nach der Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB) (Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2000) und in Küstengewässern (HABAK) (Bundesanstalt für Gewässerkunde, 1999) werden in Deutschland Sedimente in einem 7-stufigen System von nicht belastet zu belastet eingeteilt (Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2009). Zusätzlich zu den oben genannten Testorganismen werden hier auch eine Reihe spezifischer Testsysteme eingesetzt wie der umuC-Test (International Organization for Standardization, 2000) und der Comet-Assay (Braunbeck et al., 2009; Kumaravel et al., 2009) zur Bewertung von Gentoxizität, der Ames-Test (International Organization for Standardization, 2005) zur Bewertung von Mutagenität und der E-Screen (Körner et al., 1999) zur Bewertung einer östrogenen Wirkung.

Im deutschen Wasserhaushaltsgesetz (Bundesministerium der Justiz, 2009) werden in Bezug auf toxische Wirkungen neben Kriterien wie Giftigkeit, Langlebigkeit und Anreicherungsfähigkeit auch sogenannte „neuartige Wirkungen“ berücksichtigt. Hierzu zählen z.B. krebserzeugende, fruchtschädigende und erbgutverändernde Wirkungen, aber auch neurotoxische, endokrine und immuntoxische Wirkungen.

In der Schweiz sind ökotoxikologische Testsysteme zur Bewertung von Abwasser oder Sedimenten bisher nicht gesetzlich vorgeschrieben. Biotests werden aber zur Bewertung von Sickerwasser und Eluaten von belasteten Standorten (z.B. Altlasten und Deponien) in einer Vollzugshilfe vorgeschlagen (Becker van Sloten et al., 1999). Diese empfiehlt die Anwendung



einer Basis-Testreihe (Leuchtbakterien, Algen, Krustentiere) und in bestimmten Fällen ergänzende Untersuchungen zur Genotoxizität oder chronischen Toxizität.

Allerdings sind diese breit verwendeten und standardisierten Biotests nicht geeignet für die spezifische Messung von Östrogen aktiven Substanzen. Um gezielt die östrogene Belastung einer Umweltprobe zu ermitteln, müssen effektspezifische Biotests verwendet werden. Hier können *in vitro* Testsysteme (siehe auch Kapitel 3.4) als wertvolle Screening-Werkzeuge zur Erhebung und Beurteilung möglicher Östrogen belasteter Oberflächengewässer dienen. Eine erfolgreiche Anwendung zur Erfolgskontrolle erweiterter Abwasserbehandlungsmassnahmen konnte im nachfolgend beschriebenen Projekt „Strategie Micropoll“ gezeigt werden.

2.2 Anwendung von Biotests zur Erfolgskontrolle erweiterter Abwasserbehandlung

Im Projekt „Strategie Micropoll“ des BAFU wurde eine Strategie bezüglich Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser erarbeitet. In einem Teilprojekt, in dem verschiedene weitergehende Abwasserbehandlungsmassnahmen zur Entfernung von Mikroverunreinigungen aus biologisch gereinigtem kommunalem Abwasser in Pilotstudien untersucht wurden, kam eine Vielzahl verschiedener Biotests ebenso wie eine umfangreiche chemische Analytik zum Einsatz (Abegglen et al., 2009; Margot et al., 2011). Hierbei konnten die angewendeten *in vitro* Biotests zum Nachweis spezifischer Wirkungen, u.a. östrogene Aktivität im YES, ER-CALUX® und H295R, eine deutliche Verringerung spezifischer Wirkungen durch die Behandlung des Abwassers mit Ozon oder Aktivkohle anzeigen. Die Verringerung der Östrogenität wurde auch auf Organismenebene deutlich: So wurde der in biologisch gereinigtem Abwasser signifikant erhöhte Vitellogeningehalt, der ein Indikator für eine Belastung mit Östrogen aktiven Substanzen ist (siehe auch Box 2), in jungen Regenbogenforellen durch die weitergehende Abwasserbehandlung signifikant und auf Kontrollniveau reduziert. Bei „Strategie Micropoll“ zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Biotests eine gute Übereinstimmung mit der *in vivo* Vitellogenin-Induktion bei Regenbogenforellen (Kienle et al., 2011; Stalter et al., 2010).

Insgesamt ist eine Vielzahl von vielversprechenden Biotestmethoden vorhanden, allerdings muss noch verstärkt auf eine Validierung und Standardisierung dieser Methoden für die Bewertung von Umweltproben hingearbeitet werden.

2.3 Biologische und chemische Erhebungs- und Beurteilungsmethoden im Modulstufenkonzept

Im Rahmen des Modulstufenkonzeptes (Liechti et al., 1998) wurden bereits eine Reihe von Erhebungs- und Beurteilungsmethoden für Teilaspekte der Fliessgewässergüte entwickelt.

Eine Beurteilung der biologischen Gewässergüte kann anhand der Zusammensetzung der Kieselalgen(Diatomeen)-Lebensgemeinschaft (Hürlimann und Niederhauser, 2007), des Makrozoobenthos (Stucki, 2010), der Makrophyten (Känel et al., 2009) und der Fische (Schager und Peter, 2004) erfolgen. Der chemische (v.a. auf Nährstoffe bezogene) Zustand der Fliessgewässer wird mit Hilfe des Moduls „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ bestimmt (Liechti, 2010). Als Ergänzung zu den gewässerchemischen Untersuchungen ermöglicht die Zusammensetzung der Kieselalgen-Lebensgemeinschaft ebenfalls Aussagen über die chemische Wasserqualität (Hürlimann und Niederhauser, 2007).



Im Modul „Ökotoxikologie“ soll ein analoges auf Biotests basierendes Erhebungs- und Beurteilungskonzept entwickelt werden, um mit den aus effektebasierten Biotests erhobenen Resultaten eine routinemässige Beurteilung der Wasserqualität zu ermöglichen.

2.4 Beurteilung der Wasserqualität mit Umweltqualitätskriterien

Zur Beurteilung der Wasserqualität werden in verschiedenen Ländern Umweltqualitätskriterien eingesetzt. Darunter versteht man wirkungsbasierte (d.h. auf ökotoxikologischen oder toxikologischen Effektdaten basierte) numerische Anforderungen an die Wasserqualität für Einzelsubstanzen nach EU-Wasserrahmenrichtlinie (EG, 2000).

Gemäss der EU-Wasserrahmenrichtlinie soll bis zum Jahr 2015 ein guter ökologischer und chemischer Zustand der Gewässer erreicht werden. Für die Bewertung werden derzeit für 33 prioritäre Substanzen effektebasierte Umweltqualitätsstandards nach dem *Technical Guidance Document for EQS* (EU, 2010) abgeleitet. Diese werden mit chemischen Monitoringdaten verglichen um das Gefahrenpotential für Wasserlebewesen abzuschätzen.

Mit einem ähnlichen Ansatz wurde im Jahr 2010 in der Schweiz ein Vorschlag für ein Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser entwickelt (Götz et al., 2011), in das neben chemischen Messdaten auch effektebasierte Qualitätskriterien mit einfließen. Um die Basisbelastung zu beurteilen, werden hier die Umweltkonzentrationen mit chronischen Qualitätskriterien verglichen, die Organismen vor den Auswirkungen langfristiger Belastung mit Umweltchemikalien schützen sollen. Angelehnt an das Modulstufenkonzept des BAFU wird die chemische Wasserqualität in fünf Zustandsklassen unterteilt: sehr gut / gut / mässig / unbefriedigend / schlecht (Götz et al., 2011).

Im Modul Ökotoxikologie soll ein Erhebungs- und Beurteilungskonzept mit einer ähnlichen Klassierung zunächst für östrogene Effekte erarbeitet werden.



3 Vorschlag eines biotestbasierten Erhebungs- und Beurteilungskonzeptes

Im Folgenden werden die einzelnen Elemente des Erhebungs- und Beurteilungskonzeptes beschrieben und die Kriterien für ihre Auswahl und Beurteilung vorgestellt. Der Fokus lag hierbei auf der Auswahl und Evaluation geeigneter *in vitro* Biotests als Screening-Werkzeuge zum Nachweis östrogenener Aktivität.

3.1 Beschreibung der Elemente des Erhebungs- und Beurteilungskonzeptes

Für das Erhebungskonzept wurden:

- die Probenahmestrategie (Auswahl der Gewässer und der Probenahmestellen),
- die Probenahme,
- die Probenaufbereitung,
- die Auswahl geeigneter Biotests und ihre Evaluation für eine praxisnahe Anwendung,
- die Datenanalyse und Auswertung

und für das Beurteilungskonzept

- die Beurteilung der Ergebnisse anhand von Umweltqualitätskriterien

einbezogen. Diese Elemente sind für eine aussagekräftige, zuverlässige, belastbare und vergleichbare Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests von zentraler Bedeutung.

Abb. 1 gibt einen Überblick über das Vorgehen für die Erhebung und Beurteilung potentiell mit Östrogen aktiven Substanzen belasteter Gewässer.

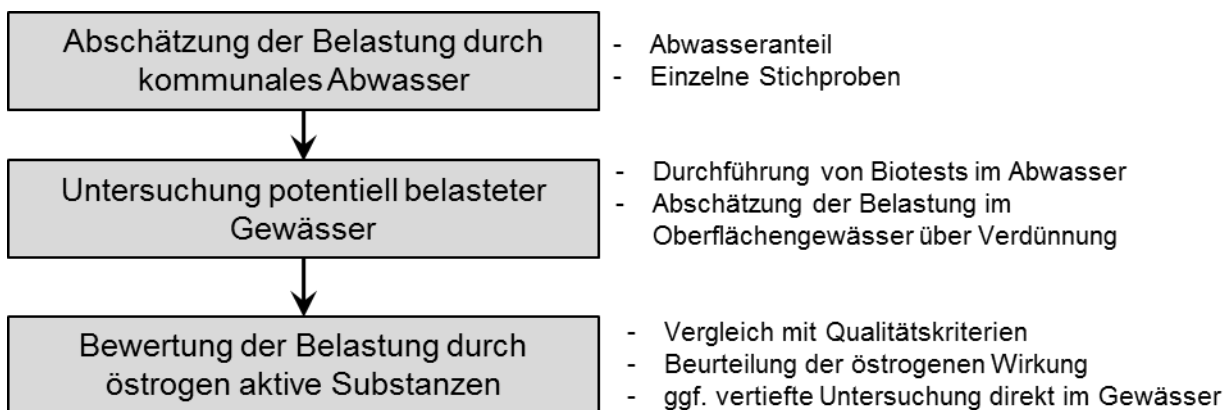


Abb. 1: Überblick über die einzelnen Elemente des Beurteilungskonzeptes für Östrogen aktive Substanzen, (verändert nach Götz et al., 2011).

In Kapitel 3.2 - 3.7 werden die einzelnen Elemente des Erhebungs- und Beurteilungskonzeptes der *Messkampagne Östrogene* (Probenahme, Probenaufbereitung, *in vitro* Biotests (mit Qualitätskontrolle), Datenanalyse und Auswertung, Beurteilungssystem) und die dazu notwendigen Arbeitsschritte näher beschrieben. Die Kriterien, welche die einzelnen Elemente erfüllen sollen, werden jeweils zu Beginn jedes Unterkapitels erläutert.



3.2 Probenahmestrategie und Probenahme

Für die Ausarbeitung der richtigen Probenahmestrategie und zur Identifikation von potentiell mit Östrogenen belasteten Gewässerabschnitten sind Informationen über den Anteil an gereinigtem Abwasser im betrachteten Fließgewässer zentral. Götz et al. (2011) schlagen hierfür die Ermittlung des Abwasseranteils eines Gewässers bei Niedrigwasserabfluss (Q_{347}) vor. Hierbei kann das Abwasser entweder:

1. Aus der über die Siedlungsentwässerung an die Gewässer angeschlossenen Bevölkerung abgeschätzt werden, oder
2. aus den gemessenen Abwassereinleitungen aus kommunalen ARA berechnet werden.

Für genauere Informationen zur Identifizierung potentiell belasteter Gewässerabschnitte über den Abwasseranteil und zur Auswahl geeigneter Probenahmestellen kann auf Götz et al. (2011) zurückgegriffen werden.

Kriterien für die Probenahme sind:

- Möglichst repräsentative Erfassung der Schadstoffkonzentrationen im Gewässer/ Abwasser,
- vertretbarer Aufwand.

Das Ziel einer Probenahme ist, einen repräsentativen Teil des zu untersuchenden Wasserkörpers so zu entnehmen und die Probe anschliessend so zu konservieren und zu lagern, dass die chemische Zusammensetzung und die Eigenschaften der gesammelten Probe diejenigen des Wasserkörpers widerspiegeln (Homazava, 2009). Bei der Probenahme für die Erfassung östrogenen Aktivität sind spezielle Vorsichtsmassnahmen zu ergreifen, um eine Kontamination der Probe mit Östrogen aktiven Substanzen während Probenahme und Transport zu verhindern (für Details siehe SOP Probenahme YES im Anhang).

Zur Bewertung der Belastung mit Östrogen aktiven Substanzen können, je nach Fragestellung, Stichproben, aktive Sammelproben oder passive, über einen meist längeren Zeitraum genommene, Proben entnommen werden.

Hierbei stellt die Entnahme von Stichproben die am wenigsten aufwändige Methode dar. Stichproben sind jedoch lediglich Momentaufnahmen, welche die Situation im Gewässer zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegeln. Für die Erfassung von zeitlichen Veränderungen kann eine Serie von Stichproben gewählt werden, wobei für die Erfassung eines Tagesganges beispielsweise mindestens 6 Probenahmen nötig sind. Mit saisonalen Stichproben (4 Stichproben pro Jahr) kann für Stoffe, die kontinuierlich in die Gewässer gelangen und keinen starken zeitlichen Schwankungen oder zusätzlichen ereignisbezogenen Eintragungspfad unterworfen sind, eine Basisbelastung erfasst werden (Götz et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden für die Beurteilung der Belastung im Gewässer Stichproben entnommen, da Sammelproben vergleichsweise aufwändig sind, falls an den entsprechenden Stellen keine fest installierten Probenahmeverrichtungen vorhanden sind. Damit kommen Sammelproben auch für eine Anwendung im Modul Ökotoxikologie für die meisten Standorte kaum in Frage (Informationen zur Methodik für die Wasserprobenentnahme siehe auch Tab. 14 im Anhang).



Mit Sammelproben (z.B. über 24 Stunden) können die durchschnittlichen Konzentrationen im Gewässer/Abwasser über einen bestimmten Zeitraum (von Stunden bis Tagen) erfasst werden. Sammelproben geben einen guten Überblick über die mittlere Gesamtbelastung, liefern aber primär keine Information über die Maximal- bzw. Minimalbelastung und deren zeitliche Dynamik während der Dauer einer einzelnen Sammelprobe (Götz et al., 2011). Kurzfristig erhöhte Konzentrationen können für die Effekte auf Wasserlebewesen jedoch sehr wichtig sein. Für die Untersuchung von kurzfristigeren Konzentrationsschwankungen während Regenereignissen können auch Probennehmer zum Einsatz kommen, welche abflussproportional beproben. Dementsprechend werden während erhöhtem Abfluss im Gewässer die Sammelproben in kürzeren Zeitperioden/abständen entnommen und separat in Probenahmegefäße abgefüllt.

Aktiv genommene Sammelproben werden generell mit automatischen Probennehmern entnommen. Hierbei können sowohl fest installierte Probennehmer (z.B. für eine Probenahme auf der ARA) als auch mobile Probensammler (z.B. für eine Probenahme im Gewässer) verwendet werden. Der Aufwand für eine solche Probenahme im Gewässer ist relativ hoch, auf Abwasserreinigungsanlagen kann dies an fest installierten Probennehmern gut und relativ einfach durchgeführt werden.

Da die Belastung der Gewässer mit Östrogenen in erster Linie kontinuierlich über den Auslauf von kommunalen ARA erfolgt, wurden in der vorliegenden Studie 24 h Sammelproben im ARA-Ablauf genommen. Bei bekanntem Abwasseranteil im Gewässer (z.B. über Modellierung oder Messung) kann von diesen Proben über die Verdünnung auf den Östrogen-Gehalt im Gewässer extrapoliert werden.

Die passive Probenahme ist eine alternative Methode zur klassischen aktiven Entnahme von Proben (Stich- oder Sammelproben) und Probenaufbereitung. Diese Methode beruht auf einer Verteilung von organischen Stoffen zwischen der Wasser- und einer Sammlerphase und ist vor allem für längere Zeitperioden geeignet (Madrid und Zayas, 2007). Passivsammler können zeitlich gemittelte Konzentrationen der in der Sammlerphase aufkonzentrierten organischen Schadstoffe liefern, d.h. die Konzentrationen einer Vielzahl von Stoffen werden über die Probenahmezeit (meist einige Wochen) integriert (Vignati et al., 2009). Gleichgewichtssammler erreichen relativ schnell (Stunden oder Tage) ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Wasser und Passivsammler; aus den Verteilungskoeffizienten und der Konzentration im Passivsammler kann man die Konzentration im Wasser berechnen. Einige Passivsammler bieten den Vorteil, dass sie die biologische Aufnahme (Biotransformation) von (eher hydrophoben) Schadstoffen aus dem Wasser simulieren. Zu beachten ist, dass ein Passivsammlerextrakt somit nicht das gleiche Stoffgemisch enthält wie es im Wasser vorhanden war (Vrana et al., 2010). Dies kann jedoch auch bei der Aufkonzentrierung von Wasserproben über Festphasenextraktion (SPE) nicht sichergestellt werden (siehe Abschnitt 3.3).

Die Kosten einer passiven Probenahme sind im Vergleich zur klassischen Probenahme und Probenaufbereitung (z.B. Stichproben, Sammelproben mit anschließender SPE) relativ gering (Kot et al., 2000). Nachteile dieser Methode sind die fehlende Standardisierung und die Abhängigkeit der Effizienz der Probenahme von Umweltfaktoren wie Temperatur, Fließgeschwindigkeit, Biofouling und den Materialeigenschaften der Passivsammler (Greenwood et al., 2007). Da die Aufnahmerate von diesen verschiedenen Parametern abhängig ist, kann man bei Passivsammlern oft nicht zuverlässig auf die Konzentration im



Wasser rückschliessen; die Substanzkonzentration wird i.d.R. pro g Passivsammler angegeben. Zudem besteht die Gefahr, dass der Passivsammler während der Probenahmezeit verloren geht (beispielsweise durch Vandalismus oder Hochwasser).

Die passive Probenahme stellt somit eine kostengünstige und prinzipiell gut geeignete Möglichkeit dar, die mittlere östrogene Belastung in einem Gewässer zu erfassen. Aus oben genannten Gründen muss diese Methodik jedoch noch genauer evaluiert werden, bevor eine Anwendung im Modul Ökotoxikologie in Frage kommt.

Nach der Probenahme müssen die Proben gekühlt ins Labor transportiert werden. Die Wasserproben sind unmittelbar nach der Probenahme zu untersuchen bzw. aufzubereiten. Ist eine umgehende Probenaufbereitung nicht möglich, kann die Probe bei 4°C gekühlt im Dunkeln, abhängig von den zu analysierenden Substanzen, von 24 h bis zu einer Woche aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung müssen die Proben bei -20°C tiefgefroren im Dunkeln gelagert werden (Götz et al., 2011). Weitere Informationen zur Aufbewahrungszeit finden sich in der ISO-Richtlinie 5667-3:2003 (International Organization for Standardization, 2003), allerdings sind darin für Östrogene im Speziellen keine Informationen vorhanden.

3.3 Probenaufbereitungsmethoden für *in vitro* Biotests zur Messung östrogenen Aktivität

Für die Probenaufbereitung wurden folgende Punkte berücksichtigt:

- Gute quantitative Extraktion der gewünschten Substanzen,
- gute Reproduzierbarkeit,
- geringe Variabilität der gewählten Methodik,
- geringer Aufwand.

Zur weiteren Aufbereitung müssen die Wasserproben filtriert werden um evtl. vorhandene feste Partikel zu entfernen.

Für die Filtration von Abwasser- und Oberflächenwasserproben zur Evaluation von östrogenen Substanzen sind Glasfaserfilter (z.B. APFD 09050, 1 µm) geeignet (siehe auch Tab.9 im Anhang). Ausserdem häufig verwendete Filtermaterialien sind Polycarbonat-Membranen oder Cellulose-Acetat-Filter mit einer Porengrösse von 0.45 bis 1 µm (Homazava, 2009). Auch bei der Auswahl des Filters und zusätzlich benötigter Materialien, die mit der Probe in Kontakt kommen, ist darauf zu achten, dass diese Materialien nicht zu einer östrogenen Kontamination der Probe führen (Glasfaserfilter und Hilfsmaterialien aus Teflon, Glas und Edelstahl sind geeignet. Kunststoffschläuche sollten dagegen wegen dem möglichen Zusatz von Östrogen aktiven Weichmachern nicht verwendet werden.). Für die Bestimmung der östrogenen Aktivität mittels *in vitro* Biotests muss auch bei der Wahl der Lösungsmittel darauf geachtet werden, dass sie keine hormonaktiven Substanzen wie beispielsweise UV-Filtersubstanzen beinhalten.

Die filtrierte Wasserprobe wird anschliessend mittels einer geeigneten Extraktionsmethode aufkonzentriert. Für die Extraktion von Östrogen aktiven Substanzen kommen vor allem Festphasenextraktion (SPE) (Liška, 2000) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) (Blumberg, 1988) in Betracht, welche auch generell die am häufigsten verwendeten Extraktionsmethoden sind. Auch neuere Methoden wie Festphasen-Mikroextraktion (SPME) (Lord und Pawliszyn, 2000), „Stir Bar Sorptive Extraction“ (SBSE) (Baltussen et al., 1999) und SPE mit molekular



aufgedruckten Polymeren (MIP-SPE) (Caro et al., 2006; He et al., 2007) wurden zur Extraktion von organischen Substanzen aus Wasserproben entwickelt. In Tab. 8 im Anhang sind die Vor- und Nachteile der verschiedenen Extraktionsmethoden für Wasserproben einander gegenübergestellt. Im Folgenden werden die beiden am häufigsten verwendeten Methoden kurz vorgestellt.

Flüssig-Flüssig Extraktionen (LLE) basieren auf der Verteilung von organischen Substanzen zwischen der Wasserphase und einer nicht mischbaren organischen Lösungsmittelphase (Pedersen-Bjergaard et al., 2000). Dabei muss das Lösungsmittel so ausgewählt werden, dass die zu analysierenden Substanzen möglichst vollständig in die Lösungsmittelphase übergehen. Je nach Eigenschaften der in der Wasserprobe vorhandenen Substanzen sind unterschiedliche Lösungsmittel hierfür geeignet (z.B. Hexan, Ethylacetat). Im Vergleich zu anderen Extraktionsmethoden weist diese Extraktionsmethode für apolare und schwach polare organische Substanzen eine hohe Effizienz bei geringen Analyse- und Materialkosten auf (Hyötyläinen, 2009). Es werden sowohl partikelgebundene, als auch gelöste Substanzen extrahiert. Diese Methode wird beispielsweise vom Auftragslabor BDS für den ER-CALUX[®] verwendet. Ein Nachteil hierbei ist der hohe Verbrauch an Lösungsmittel und die geringere Effizienz für polare Stoffe.

Für die Messung der Belastung von Oberflächenwasser und Abwasser mit Östrogen aktiven Substanzen mittels *in vitro* Biotests wird eine Festphasenextraktion (SPE) empfohlen. Dies ist die heutzutage vermutlich am häufigsten verwendete Methode zur Extraktion von organischen Substanzen aus Wasserproben. Bei dieser Methode werden die Schadstoffe zwischen einer wässrigen Phase und einem geeigneten festen Sorptionsmaterial aufgeteilt, das die organischen Stoffe selektiv abfängt. Die Wahl des Sorptionsmaterials und die Wahl der zur Elution verwendeten Lösungsmittel haben einen Einfluss auf die Wiederfindungsrate. Auch verschiedene Wasserparameter, wie z.B. der Gehalt an gelösten Huminsäuren, der Tongehalt und die Salinität der Wasserprobe, können die Wiederfindungsrate und die Reproduzierbarkeit der Extraktion beeinflussen und sollten bei der Analyse mehrerer verschiedener Arten von Wasserproben berücksichtigt (und ggf. mit Hilfe geeigneter Standardsubstanzen analytisch bestimmt) werden (Homazava, 2009).

Tab. 9 im Anhang gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte der in der *Messkampagne Östrogene* verwendeten Probenaufbereitungsmethoden.



3.4 Testsysteme zur Messung östrogenener Aktivität

Für die Auswahl der geeigneten Biotests wurden Kriterien berücksichtigt, die u.a. auch für eine potentielle Verwendung dieser Biotests in der Regulatorik von zentraler Bedeutung sind.

Für die generelle Beurteilung:

- Robustheit
- Nachvollziehbarkeit
- Sensitivität
- Grad der Validierung / Standardisierung

Für die Eignung der Testverfahren für den Vollzug:

- Interpretierbarkeit
- Kommunizierbarkeit und Bewertung der Resultate
- Eignung zur Erkennung von Schadstoff-Hotspots
- Geringe Kosten bei routinemässiger Anwendung
- Möglichst einfache Anwendung
- Anwendbar in kantonalen Gewässerschutzlaboren / privaten Laboren

Zur Messung östrogenener Aktivität können *in vitro* und *in vivo* Testsysteme eingesetzt werden. Als ***in vitro*** (lateinisch, *im Glas*) werden Experimente bezeichnet, die in einer kontrollierten künstlichen Umgebung ausserhalb eines lebenden Organismus durchgeführt werden und organische bzw. biologische Vorgänge untersuchen (im Gegensatz zu ***in vivo***, im lebenden Organismus). Im Gegensatz zur chemischen Analytik, die die Konzentrationen einer Auswahl von Substanzen messen kann, integrieren *in vitro* Biotests die Effekte aller Substanzen mit einem bestimmten Wirkmechanismus, z.B. Wirkungen auf den menschlichen Östrogenrezeptor α (hER α).

Zur integrativen Untersuchung von Auswirkungen auf Organismenebene sind standardisierte *in vivo* Tests vorhanden, wie beispielsweise der Fish Early Life Stage Test (FELST) mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Hier kann die Vitellogeninkonzentration als Indikator für eine östrogene Belastung gemessen werden (siehe auch Box 2).

Box 2: Relevanz von Vitellogenin-Induktion als Indikator für östrogene Belastung

Vitellogenin ist ein Vorläufer des Eidotterproteins. Ein erhöhter Vitellogeninegehalt in freilebenden männlichen Fischen gilt als verlässlicher Indikator für eine Störung des Hormonhaushaltes aufgrund von Östrogen aktiven Substanzen in Gewässern (Jobling et al., 2006). Dies wurde immer wieder in freilebenden Fischen in der Nähe des Auslaufs von Kläranlagenabwässern beobachtet, u.a. in der Schweiz (Vermeirssen et al., 2005), Deutschland (Schwaiger et al., 2002) und den Niederlanden (Houtman et al., 2007a). Hierbei führten Konzentrationen ab 1 ng Estradiol-Äquivalente (EEQ)/L bereits zu einer Induktion von Vitellogenin bei Bachforellen (*Salmo trutta*) (Vermeirssen et al., 2005). Die Relevanz der Vitellogenin-Induktion auf Populationsebene zeigte sich bei der Exposition eines ganzen Sees mit 5-6 ng/L EE2 über eine Zeitdauer von 2 Jahren (Kidd et al., 2007). Dies führte zunächst zu erhöhten Vitellogenin-Werten und dann zum Kollaps der Fischpopulation einheimischer Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) aufgrund fehlender Reproduktion und Rekrutierung.



Der FELST ist jedoch aus verschiedenen Gründen für Routineuntersuchungen nur begrenzt geeignet: Es sind grosse Wassermengen nötig bzw. es müssen Durchflusssaquarien installiert werden. Zudem sind der Aufwand und die Kosten hoch, und nicht zuletzt spielen Tierschutzaspekte eine grosse Rolle. Dieser Test ist daher für Monitoringzwecke kaum anwendbar. Eine weniger aufwändige, kostengünstigere Möglichkeit ist die Nutzung von geeigneten *in vitro* Biotests. Für einen ausführlichen Vergleich verschiedener *in vitro* und *in vivo* Testsysteme siehe auch (Kase et al., 2009).

Ein Screening mit *in vitro* Biotests als erster Stufe der Gewässergütebeurteilung ist aufgrund folgender Punkte sinnvoll (nach Chèvre und Eggen, 2006: Tabelle 1):

- Es besteht eine generelle Übereinstimmung, dass in der Ökotoxikologie u.a. bei der Beurteilung von Umweltproben die Nutzung von Testorganismen, insbesondere Fischen, vermieden werden sollte. *In vitro* Bioassays ermöglichen ein Screening belasteter Gewässer, ohne Tierversuche durchführen zu müssen.
- Die Nutzung von *in vitro* Biotests ermöglicht es spezifische Wirkmechanismen zu erfassen. Dies gestaltet sich mit *in vivo* Tests, die integrativ Effekte auf den ganzen Organismus untersuchen, schwieriger.

Zur Evaluation von (meist *in vitro*) Methoden für Östrogen aktive Substanzen wurden vor allem international bereits zahlreiche Messkampagnen durchgeführt, z.B. in Dänemark (Stuer-Lauridsen et al., 2005), den Niederlanden (Murk et al., 2002; Vethaak et al., 2002), Deutschland (Körner et al., 1999; Pfluger et al., 2001), Österreich (Paumann und Vetter, 2003) und Australien (Williams et al., 2007). In vielen Arbeiten wurden jeweils mehrere *in vitro* Biotests zur Detektion von Östrogen aktiven Substanzen verglichen (z.B. Leusch, 2008; Leusch et al., 2010; Murk et al., 2002; NICEATM, 2002; O'Neill, 2008; Pfluger et al., 2001; Rutishauser et al., 2004).

Für die Messkampagne Östrogene wurden zwei Rezeptorbindungstests ausgewählt, die eine östrogene Aktivität durch Aktivierung des Östrogenrezeptors anzeigen (der YES nach Routledge und Sumpter (1996) und der ER-CALUX[®] (Van der Linden et al., 2008)), sowie als ergänzender Test der H295R Steroidgenese Assay (Hecker und Giesy, 2008), der die Wirkung von Umweltproben auf die Bildung von Östrogenen untersucht. Die Auswahl erfolgte aus folgenden Gründen:

- Der YES und der ER-CALUX[®] wurden bereits in mehreren Studien (teilweise gemeinsam) angewendet und erwiesen sich als vielversprechende Screening-Verfahren zur Beurteilung von Gewässern bzgl. östrogener Aktivität (Kienle et al., 2011; Legler et al., 2002b; Leusch, 2008; Leusch et al., 2010; Murk et al., 2002). Des Weiteren zeigen die Tests auch gute Übereinstimmung mit *in vivo* Ergebnissen (z.B. Kienle et al., 2011; Kunz et al., 2006; Rutishauser et al., 2004; Vermeirssen et al., 2005).
- Der Rezeptorbindungstest mit Hefezellen (YES) nach Routledge und Sumpter (1996) ist eine einfache Methode, die an der Eawag und dem Ökotoxzentrum bereits seit mehr als 10 Jahren etabliert ist. Er zeichnet sich durch niedrige Unterhalts- und Verbrauchskosten, Einfachheit der Einarbeitung, freie Verfügbarkeit und Verbreitung in der Nutzung aus. Der Test wurde bereits in diversen Projekten zum Nachweis östrogener Aktivitäten in Abwasser und Umweltproben angewandt (Kienle et al., 2011;



Leusch et al., 2010; Murk et al., 2002; Stalter et al., 2011; Vermeirssen et al., 2005). Eine ISO-Zertifizierung des YES wurde kürzlich in die Wege geleitet.

Ausgehend vom YES nach Routledge und Sumpter wurden einige angepasste Versionen entwickelt, um den Test schneller und sensitiver zu machen. Beispielsweise bewirkt die Zugabe des Enzyms Lyticase eine Durchlöcherung der Zellwand, so dass das produzierte Enzym β -Galactosidase schneller in das Medium gelangt, um dort einen Farbumschlag zu bewirken (z.B. Schultis und Metzger, 2004). Auch Anpassungen für eine Analyse von nicht-aufkonzentrierten Umweltproben existieren in diesem Testsystem (z.B. Wagner und Oehlmann, 2009). Solche optimierten YES-Varianten werden ebenfalls bei der ISO-Zertifizierung evaluiert und könnten für eine Anwendung im Modulstufenkonzept geeignet sein.

- Als zweiter Rezeptorbindungstest wurde aufgrund seiner Sensitivität der kommerzielle ER-CALUX[®] gewählt. Im Gegensatz zu Hefezell-Östrogentests ist der ER-CALUX[®], wegen der Arbeit mit menschlichen Zelllinien, aufwändiger und teurer in der Durchführung, aber auch deutlich sensitiver als verfügbare YES-Methoden. Der ER-CALUX[®] ist eine etablierte Methode zum Nachweis von östrogenen Aktivität in Umwelt- und Trinkwasserproben (Van der Linden et al., 2008), und wurde bereits in verschiedensten EU-Projekten (FIRE, ACE, FACEIT) sowie auch in Ringversuchen (Leusch, 2008; Murk et al., 2002) eingesetzt. Eine mögliche ISO-Zertifizierung wurde hier ebenfalls kürzlich in die Wege geleitet.
- Um einen weiteren Mechanismus zu erfassen, der durch (Pseudo-)Hormone in einer Umweltprobe hervorgerufen werden kann, wurden ergänzend Auswirkungen der Proben auf die Bildung von Steroidhormonen im H295R Steroidgenese Test untersucht (Gracia et al., 2006; Hecker et al., 2006). Neben der östrogenen Aktivität einer Probe kann der H295R auch Hinweise auf antiöstrogene, (anti-)androgene und aromatasemhemmende Bestandteile einer Probe geben (Gracia et al., 2006; Grund et al., 2011). Dieser Assay wurde auch wegen seiner Validierung für die Einzelstoffbewertung im Rahmen des OECD Testrichtlinienprogrammes und des amerikanischen Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Programms sowie wegen seiner Sensitivität ausgewählt.
- Tab. 1 gibt einen Überblick über die Beurteilung der Testsysteme nach den oben aufgeführten Auswahlkriterien. Hier wird im speziellen auf die Leistungsfähigkeit und die Stärken und Schwächen der Tests eingegangen. In Tab. 2 ist ein Überblick über die nötigen Arbeitsschritte dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Testsysteme findet sich im Anhang 1. Ein Überblick über die angewendeten und weitere Methoden zur Detektion hormonaktiver Substanzen findet sich in Kase et al. (2009).



Tab. 1: Beurteilungskriterien der angewandten *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.

Beurteilung: - unter Durchschnitt; + mittelmässig; ++ gut; +++ exzellent

	Yeast Estrogen Screen (YES)	ER-CALUX [®]	H295R Steroidgenese Test
Leistungsfähigkeit			
Estradiol-Äquivalenz-Konz. (EEQ) von Umweltproben bestimmbar	(⁻¹), ++ ²	+++ ^{1,a}	Keine EEQ Auswertung
Ähnlichkeit mit vergleichbaren Testsystemen	++ ^{1,b} , +++ ²	+++ ^{1,b}	Nicht vergleichbar da andere Endpunkte
Variations-Koeffizient	+++ ^{1,c}	+++ ^{1,c}	+++ ³
Bestimmungsgrenze der Methode	++ ²	+++ ^{1,d}	+++ ³
Aus Analytik vorhergesagte vs. gemessene EEQs	(⁻¹), ++ ²	+++ ^{1,e}	Nicht vergleichbar da andere Endpunkte
Stärken und Schwächen			
Analyse von Einzelsubstanzen	+++ ¹	+++ ¹	+++ ³
Analyse von Umweltproben	(⁻¹), ++ ²	+++ ¹	+++ ^{4,5}
Einfachheit der Nutzung	++ ¹	+ ¹	-
Einfachheit der Einarbeitung	++ ¹	- ¹	-
Niedrige Unterhalts- und Verbrauchskosten	+++ ¹	- ¹	-
Freier Zugang zur Zelllinie für nicht-kommerzielle Nutzung	+++ ¹	- ¹	+++
Freier Zugang zur Zelllinie für kommerzielle Nutzung	+++	-	+++
Sensitivität	(⁻¹), ++ ²	+++ ¹	+++ ^{4,5}
Robustheit	(⁻¹), ++ ²	++ ¹	++ ³
Reproduzierbarkeit	++ ¹	+++ ¹	+++ ³
Verbreitung der Nutzung	+++ ¹	++ ¹	- (in den USA häufiger)
Hochdurchsatz-Screening	+++ ¹	+++ ¹	++
Schnelle Resultate	++ ¹	++ ¹	++

¹ Nach Leusch et al. (2010); ² wegen geringer Sensitivität, Resultate aus dem Projekt Micropoll; ³ aus Hecker et al. (2007b), OECD Validation des H295R; ⁴ Gracia et al. (2008): Untersuchung von Küstengewässern und ARA Ausflüssen; ⁵ Grund et al. (2011): Untersuchung von Sedimenten; ^a im Vergleich zum ER-CALUX[®] waren nur 10% der Proben über der Nachweisgrenze falsch Negative; Leusch et al. (2010), Abb. 1); ^b Genereller Vergleich unterschiedlicher Assays unabhängig von der Art der Probe (Leusch et al., 2010, Abb. 2); ^c Variationskoeffizient wurde anhand aller Daten berechnet (Leusch et al., 2010); ^d Methodenquantifizierungslimite aus Leusch et al. (2010); ^e Genereller Vergleich von aus Analytik vorhergesagten zu gemessenen EEQs (Leusch et al., 2010, Abb. 3 YS1, YS2 und CX) (⁻¹): Die in Klammern dargestellten Werte aus Leusch et al. (2010) wurden der Vollständigkeit halber aufgeführt, sind aber unseres Erachtens nach nicht aussagekräftig, da für diese Studie nur wenig Probenmaterial vorhanden war, was sich in zu hohen Nachweisgrenzen beim YES, daraus resultierenden falsch negativen Resultaten und so in einer schlechten Beurteilung niederschlug.

Tab. 2: Arbeitsschritte für die angewendeten *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen

	YES	ER-CALUX [®]	H295R
Allgemeine Informationen			
Testsystem	Reportergen-Testsystem mit genetisch veränderten Hefezellen	Reportergen-Testsystem mit genetisch veränderten Säugerzellen	unveränderte menschliche Zelllinie die fähig ist Steroid-Hormone zu produzieren
Testprinzip	<i>In vitro</i> Testsystem zum Nachweis der Aktivierung des menschl. Östrogenrezeptors α durch östrogene Substanzen	<i>In vitro</i> Testsystem zum Nachweis der Aktivierung des menschl. Östrogenrezeptors α durch östrogene Substanzen	<i>In vitro</i> Testsystem zum Nachweis von Veränderungen in der Bildung von Steroidhormonen
Testorganismus	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (genetisch verändert)	menschliche Zelllinie U2OS-ER α (Osteosarcom-Zelllinie) (genetisch verändert)	menschliche Nebennierenrindenkrebs-Zelllinie NCI-H295R (genetisch unverändert)
Lagerung der Zellen	Kryokultur in 15% Glycerol (Glycerolstöcke) bei -20°C für maximal 4 Monate bei -80°C für minimal 1 Jahr (stabil transfiziert)	Kryokultur in 10% DMSO in flüssigem Stickstoff mehrere Jahre (seit 2006 stabil transfiziert)	Kryokultur, in 5% DMSO in flüssigem Stickstoff
Testformat	96-Well-Platten	96-Well-Platten	24-Well-Platten
Vorkultur (ab Cryostock)	mind. 1 d (vor jedem Testansatz)	mind. 14 d (einmalig für jede Testserie)	mind. 14 d (einmalig für jede Testserie)
Testdauer (ab Exposition mit Probe)	72 h	24 h	48 h
Kosten			
Geräte	ca. 44'000 CHF (inkl. allg. Laborausrüstung) (nach Oekotoxzentrum-Aufstellung)	ca. 47'000 € (nach Informationen von BDS)	k.A.
Kosten/Probe (ohne Aufkonzentrierung)	ca. 350 / 500 CHF (Oekotoxzentrum)	Arbeits- und Materialaufwand sind höher als bei YES → ca. 600/800 CHF (Oekotoxzentrum)	ca. 1'000 € (extern, wird nicht am Oekotoxzentrum gemacht)

In Tab 1. ist ersichtlich, dass die drei Biotests in vielen Punkten ähnlich beurteilt werden. Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen Tests liegt in den Punkten: Einfachheit der Nutzung, Einfachheit der Einarbeitung, Niedrige Unterhalts- und Verbrauchskosten. In diesen Punkten schneidet der YES-Test deutlich am besten ab. Zudem ist ein freier Zugang zur Zelllinie für nicht-kommerzielle und kommerzielle Nutzung möglich.

Im Folgenden liegt der Fokus auf dem Vergleich der beiden Rezeptorbindungstests YES und ER-CALUX[®]. Ist eine vertiefte oder ergänzende Untersuchung gewünscht, kann der H295R oder auch weitere Biotests herangezogen werden. Informationen hierzu finden sich im Anhang 1.



3.5 Auswertungsmethoden für Biotests

Kriterien für die Datenanalyse und Auswertung waren:

- Einfache und möglichst robuste Ermittlung der Beurteilungswerte,
- Vergleichbarkeit,
- Aussagekraft.

In der Vergangenheit (z.B. in Pilotstudien des Projektes „Strategie Micropoll“) wurden die durchgeführten Biotests anhand unterschiedlicher Methoden ausgewertet. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über für Biotests häufig angewendete Methoden zur Auswertung und Interpretation der Daten und diskutiert deren Eignung für Biotests zum Nachweis östrogenener Effekte.

Die in den Biotests gemessenen Parameter wie Rezeptoraktivität, Zellzahl und Zellvitalität werden als Endpunkte bezeichnet. Toxizitätsparameter, die mit Hilfe statistischer oder mathematischer Methoden berechnet werden, dienen dazu, die Toxizität für die jeweiligen Endpunkte auszudrücken.

Folgende Toxizitätsparameter können für Biotests mit gängigen Programmen wie Microsoft Excel oder einem Statistikprogramm (z.B. GraphPad Prism) berechnet werden (Abb. 2):

ECx	Die ECx ist die effektive Konzentration (oder % der Probe) bei der x% (z.B. 10, 20 oder 50%) des maximal induzierbaren Effekts erreicht werden (z.B. Bindung an den Östrogenrezeptor). Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einer Regressionsanalyse und gibt, zusätzlich zum jeweils abgeleiteten Toxizitätsparameter, ein Konfidenzintervall (i.d.R. 95% Konfidenzintervall) an das den Konzentrationsbereich wiedergibt, in dem die tatsächliche Konzentration mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt. Je niedriger der ECx-Wert, d.h. je niedriger die ermittelte Konzentration ist bei der x% Effekt auftritt, desto toxischer ist die untersuchte Substanz oder Probe.
NOEC	No Observed Effect Concentration (höchste getestete Konzentration die noch keinen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle bewirkt).
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (niedrigste getestete Konzentration die einen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle hervorruft).
TEQ	Die toxische Äquivalenzkonzentration (TEQ) ist definiert als jene Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt haben würde wie die Umweltprobe (z.B. Escher et al. ,2008a). Die Referenzsubstanzen variieren je nach gemessenem spezifischen Endpunkt. Somit kann eine toxische Potenz (oder Toxizitätsmenge) einer Mischung als Konzentration einer Referenzsubstanz ausgedrückt werden. Je höher der TEQ Wert, desto toxischer ist die untersuchte Probe.

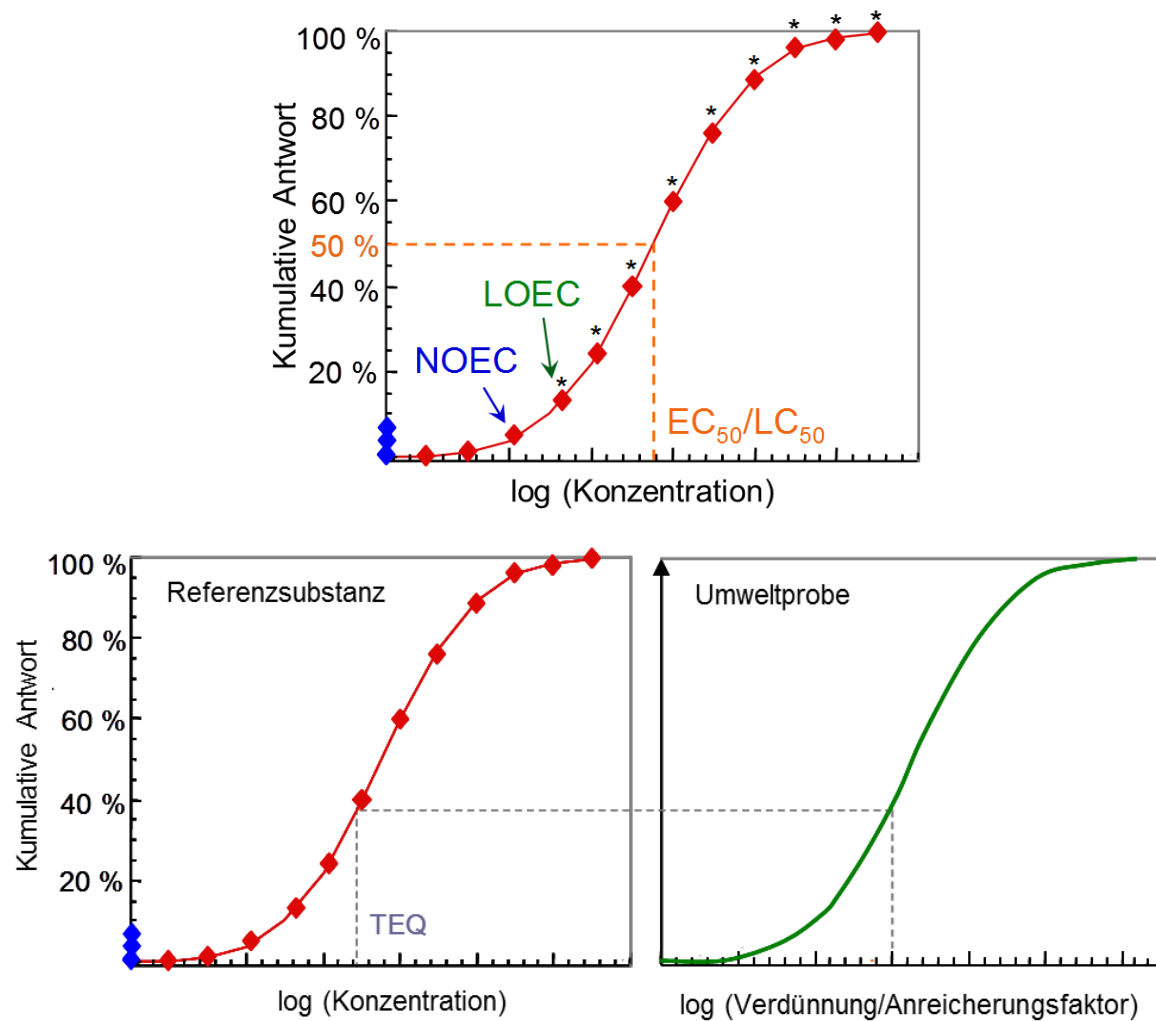


Abb. 2: Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und EC₅₀.
 ♦ Kontrolle, ♦ Behandlung, * signifikante Unterschiede zur Kontrolle (Abb. oben). Die unteren Abbildungen zeigen die Ableitung von TEQs durch den Vergleich der Effektkonzentrationen einer Umweltprobe mit jenen einer Referenzsubstanz, z.B. E2

Details zu den Auswertungsmethoden für die angewendeten Biotests finden sich im Anhang 2 (Abschnitt e).

Die Auswertung der Daten anhand der oben beschriebenen Toxizitätsparameter wird im Folgenden am Beispiel der ARA A durchgeführt und diskutiert, und ebenso die Gründe erläutert, warum für die Auswertung der Daten aus der Messkampagne Östrogene, TEQ und EC_x als geeignet erachtet werden.

In Abb. 3 und Abb. 4 werden bereits bei den Dosis-Wirkungsbeziehungen in ER-CALUX® und YES die Vor- und Nachteile der verschiedenen Toxizitätsparameter deutlich, die detailliert in Ratte und Ratte (2009) diskutiert wurden.

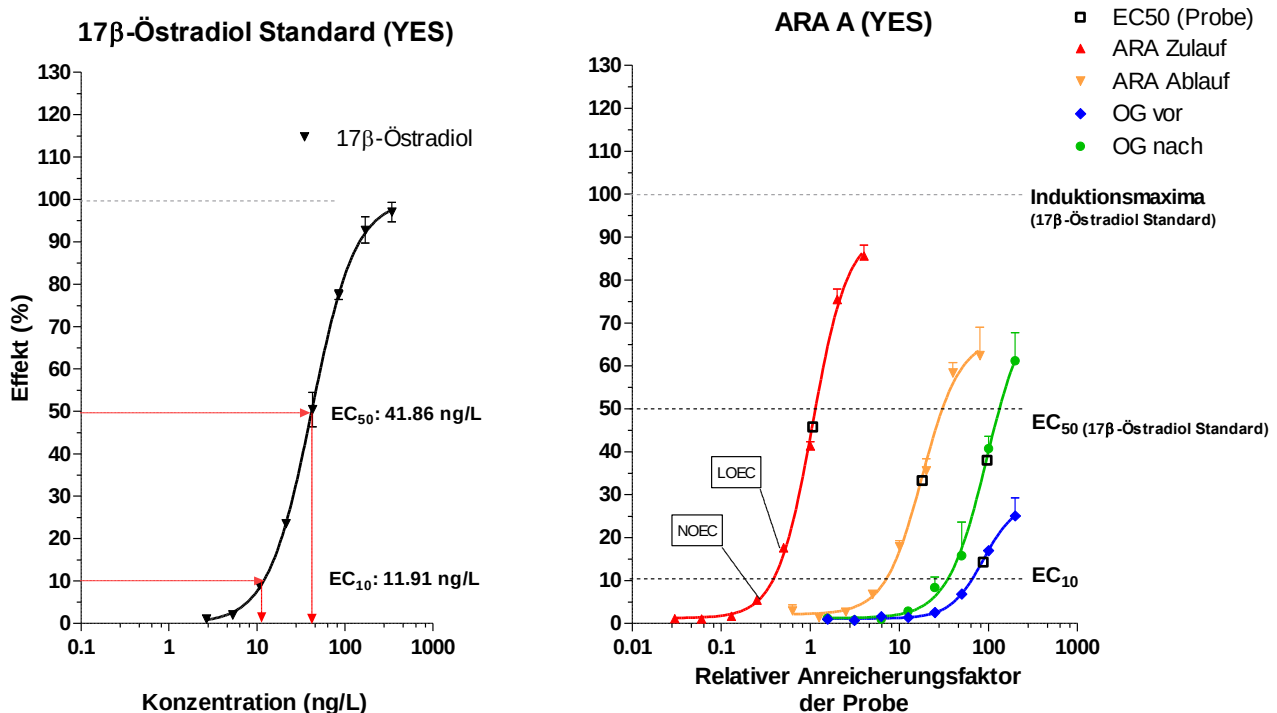


Abb. 3: YES: Einfluss der Kurvenhöhen auf die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen dem 17 β -Estradiol-Standard und den ARA- und Oberflächengewässerproben von Probenahmestelle A. Toxizitätsparameter: EC₁₀, EC₅₀, NOEC und LOEC.

Während NOEC- und LOEC-Werte aus diversen Studien in die Festlegung von Umweltqualitätsstandards (EQS) einfließen - z.B. wird der EQS für E2 anhand von NOEC- und LOEC-Werten aus Fischstudien festgelegt - braucht es zur Überprüfung dieser Qualitätsstandards in Oberflächengewässern ein Verfahren, das Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs, also eine TEQ) ermitteln kann, z.B. YES oder ER-CALUX®.

Des Weiteren haben TEQ und EC_x gegenüber NOEC/LOEC folgende Vorteile:

- EC_x integrieren über die gesamte getestete Konzentrationsreihe, d.h. der jeweils abgeleitete EC_x-Wert kann unabhängig von den konkret getesteten Konzentrationen interpoliert werden. Im Gegensatz dazu entsprechen die ermittelten NOEC und LOEC Werte immer zwei der getesteten Konzentrationen (siehe Zulauf in Abb. 3) und sind dadurch abhängig von der Auswahl der Testkonzentrationen. Eine eindeutige Aussage ist nur möglich, wenn mindestens noch eine höhere bzw. niedrigere Konzentration untersucht wurde.
- Für die EC_x kann ein Vertrauensbereich (95%-Vertrauensbereich) angegeben werden. So können EC_x aus verschiedenen Behandlungsstufen und/oder Biotests verglichen werden. Überlappen die Vertrauensbereiche zweier EC_x-Werte nicht, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den EC_x-Werten. Für eine exakte Aussage können hier auch statistische Tests herangezogen werden (Ratte und Ratte, 2009). Im Gegensatz dazu ist der LOEC nur begrenzt „vertrauenswürdig“, da zwischen LOEC als niedrigste Konzentration mit signifikantem Effekt und dem NOEC als nächst niedrigere



getestete Konzentration diverse Konzentrationen liegen können, die noch immer zu signifikanten Effekten führen können. So entspricht der ermittelte LOEC nicht unbedingt der tatsächlich niedrigsten beobachteten Effektkonzentration, zudem zeigt die nächst höhere, getestete Konzentration nicht immer einen signifikanten Effekt (z.B. Abb. 4 Zulauf).

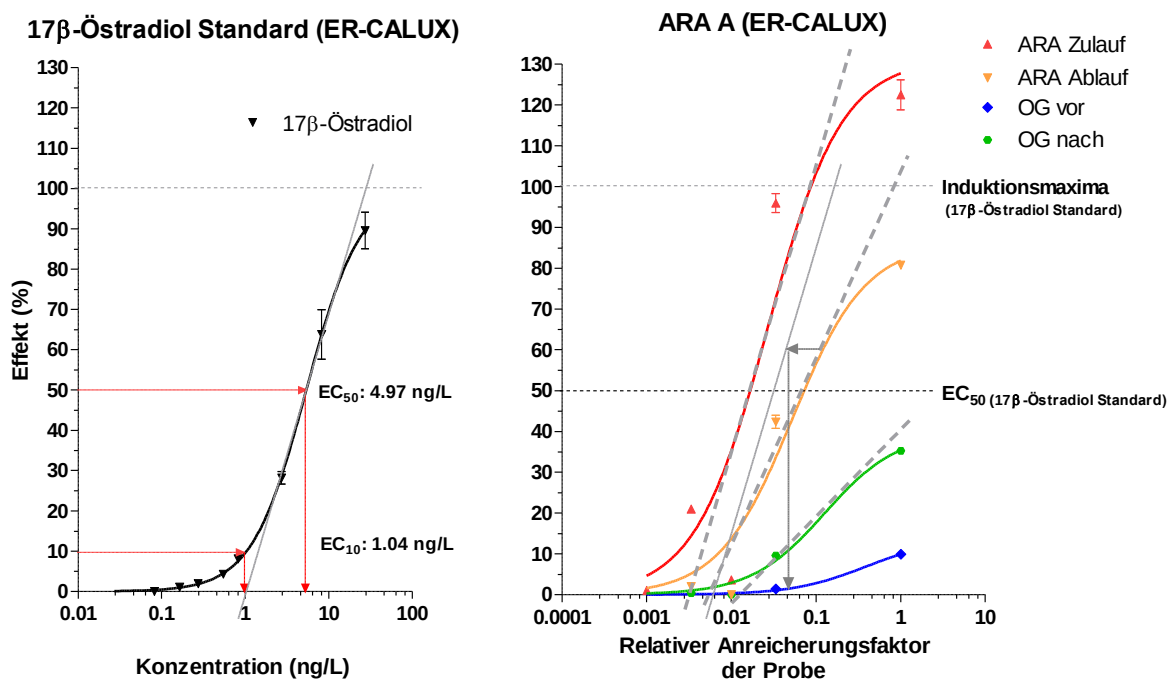


Abb. 4: ER-CALUX®: Einfluss der Kurvensteigung auf die Dosis-Wirkungsbeziehung des 17β-Estradiol-Standards und der Proben von ARA A und Oberflächengewässer A. Toxizitätsparameter: EC_{10} , EC_{50} . Gestrichelte Linien: Kurvensteigung der Proben, ausgezogene Linie: Kurvensteigung des E2-Standards.

TEQs, und damit die direkte Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Biotests und der chemischen Analytik, können nur mit Hilfe von gefitteten Dosis-Wirkungskurven bestimmt werden, NOEC und LOEC-Werte sind dazu nicht geeignet.

Problematisch ist im EC_x /TEQ-Ansatz, wenn die Dosis-Wirkungs-Kurven der untersuchten Proben sich in ihrer Höhe (Abb. 3) und Steigung (Abb. 4) vom E2-Standard unterscheiden. Im ersten Fall erreicht die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht die Höhe des Standards (= 100%) und die berechneten EC_x -Werte der Proben (EC_{50} -Werte in Abb. 3) liegen nur zwischen 15-45% der maximalen Höhe des Standards. Die östrogenen Aktivitäten von beispielsweise ARA Zulauf und Ablauf sind anhand ihrer EC_{50} -Werte nicht miteinander vergleichbar. Im Falle unterschiedlicher Kurvenhöhen lässt sich jedoch der EC_x als prozentuale Induktion von der Basis errechnen (mit dem jeweiligen Standard als Mass), wie dies in Abb. 4 für den EC_{10} und den EC_{50} (horizontal gestrichelte Linien) dargestellt ist (Kunz und Fent, 2009).

Im zweiten Fall, bei unterschiedlichen Steigungen von Standard- und Probenkurven (Nicht-Parallelität), ist die Berechnung der EEQ der untersuchten Probe aufgrund der Unterschiede in der Kurvensteigung problematisch (Abb. 4, verdeutlicht durch gestrichelte und ausgezogene Linien). So wird tendenziell mit zunehmender Aufkonzentrierung der Probe deren ermittelter



EEQ unterschätzt (siehe graue Pfeile in Abb. 4, z.B. ARA Ablauf: die grau gestrichelte Linien repräsentiert die Kurvensteigung der Probe, die ausgezogene Linie die Kurvensteigung des Standards) (Kunz und Fent, 2009; Villeneuve et al., 2000).

Für die in Kapitel 4 vorgestellten Ergebnisse der Biotests wurde versucht, das Problem der Nicht-Parallelität zu verringern, indem für die EEQ Berechnung nur die untersten 3 Konzentrationen (wo die Unterschiede in den Steigungen noch kleiner ausfallen als bei höheren Konzentrationen) im linearen Bereich der Kurve (üblicherweise zwischen >5- und ≤80%-Induktion) genommen wurden.

3.6 Methodvalidierung

Elemente einer Methodvalidierung (abgeleitet aus der Validierung der chemischen Analytik) sind:

- Bestimmung der Wiederfindungen,
- Ermittlung der Bestimmungsgrenzen,
- Überprüfung der Wiederholbarkeit.

Innerhalb dieses Projektes konnten die Methoden der Festphasenextraktion, YES, ER-CALUX[®] und H295R nicht komplett validiert werden. Es wurden jedoch die Bestimmungsgrenzen der Methoden berechnet und die Wiederfindungen bestimmt. Die Wiederholbarkeit und die Unsicherheit bei der Untersuchung von komplexen Umweltproben wurden für den YES- und den ER-CALUX[®] Test in diesem Projekt nicht bestimmt. Dies wird für den YES-Test und den ER-CALUX[®] im Rahmen der laufenden ISO-Zertifizierung erfolgen. Der ER-CALUX[®] ist bei BDS für Probenvorbereitung, Extraktion, Aufkonzentrierung, Aufreinigung und die Messung der östrogenen Aktivität gemäss ISO/IEC 17025 akkreditiert. Die erweiterte Messunsicherheit (Measurement Uncertainty, MU) der gesamten Analyse wurde nach der ISO 5725 Norm ermittelt und berücksichtigt unter anderem Reproduzierbarkeit und Präzision des gesamten Verfahrens. Die MU liegt für die gesamte ER-CALUX[®] Analyse bei 26%. Der H295R wurde im Rahmen der Einzelstoffbewertung des OECD Testrichtlinienprogrammes wie auch des amerikanischen Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) validiert und es wurden bereits mehrere Ringtestungen durchgeführt (Hecker et al., 2011; Hecker et al., 2007b).

Bestimmung der Wiederfindungen nach Festphasenextraktion und Biotest

Eine Bestimmung der Wiederfindung einer Substanz (z.B. nach Festphasenextraktion, SPE) wird in der chemischen Analytik mit Hilfe der Addition einer definierten Konzentration einer oder mehrerer Standardsubstanzen zu Reinstwasser und/oder einer Umweltprobe bestimmt. In der Regel werden hier markierte (deuterierte) Standards verwendet. Die Standardsubstanz wird vor Beginn der Festphasenextraktion zur Wasserprobe zugegeben und mit der Wasserprobe aufkonzentriert. Anschliessend erfolgt die Messung der Konzentrationen. Da von der Standardsubstanz genau bekannt ist, welche Menge zugegeben wurde, kann so bestimmt werden, wie viel des Standards nach der Extraktion noch vorhanden war, d.h. wiedergefunden wurde. Dadurch können Verluste während der Extraktion wie auch Matrixeffekte von Umweltproben berücksichtigt werden.

Für Biotests ist eine solche Wiederfindungsbestimmung nicht üblich. Der Effekt einer Umweltprobe wird in der Regel mit dem einer Referenzsubstanz verglichen. Es handelt sich



hier um biologische Systeme, in denen teilweise sehr komplexe Prozesse ablaufen. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine Standardsubstanz, die einer komplexen Mischung aus Chemikalien in einer Umweltprobe zugegeben wird, sich gleich auf die biologische Aktivität auswirkt wie eine Einzelsubstanz. In einer Umweltprobe können sich verstärkende (synergistische), sich addierende (additive) oder auch sich abschwächende (antagonistische) Wirkungen auftreten, die sich je nach Verdünnung der Mischung unterscheiden können (Kunz und Fent, 2009).

Aus der Literatur sind nur wenige Informationen zur Anwendung von Rezeptorbindungstests für die Bestimmung der Wiederfindung nach dem Extraktionsschritt mittels Standardaddition bekannt (z.B. Escher et al., 2008b; Zhao et al., 2009). In der Regel wird dies mittels chemischer Analytik bestimmt (z.B. Céspedes et al., 2004; Houtman et al., 2007b). Erfolgt eine Wiederfindungsbestimmung mit Biotests, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass sowohl die Wiederfindungsrate der Extraktion selbst (z.B. 90%) als auch die Wiederfindungsrate und Variabilität im Biotest eine Rolle spielen und die Gesamtwiederfindungsrate von SPE und Biotest bestimmen.

Soll nur die Wiederfindung im Biotest betrachtet werden, wird normalerweise im Test (nach der Probenaufbereitung) eine definierte Menge von Standardsubstanz zugegeben, anschliessend wird die Wiederfindung durch den Vergleich der zugegebenen mit den gemessenen EEQ-Werten bestimmt (z.B. Houtman et al., 2006; Li et al., 2004; Wozel und Hermanowicz, 2006).

Zur Kontrolle der Wiederfindung nach SPE und Biotest wurde daher im Rahmen dieses Projektes ein erster Versuch mit Standardadditionen durchgeführt, um abzuklären, ob diese Art der Qualitätskontrolle sinnvoll ist. Dieser Versuch wurde einmal mit einer Auswahl von wenigen Proben durchgeführt, wodurch die Aussagekraft der Daten als niedrig einzustufen ist. Für Aussagen über die Wiederfindung von Standardsubstanzen in den beiden Testsystemen sind unbedingt weitere Experimente notwendig, daher wird auch auf eine Diskussion der Resultate in diesem Bericht verzichtet.

Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Für alle Tests wird der Mittelwert der Kontrolle plus die 3-fache Standardabweichung der Kontrolle als Nachweisgrenze (LOD) bestimmt. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) ist der 3.3-fache Wert der Nachweisgrenze. Ein Überblick über die Ermittlung der Bestimmungsgrenzen für die Tests ist in Tab. 15 im Anhang gegeben.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der verschiedenen Testsysteme wurde im Rahmen dieser Studie nicht evaluiert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Resultate in SPE und Biotests sollten stark und schwach belastete künstlich zusammengesetzte und native Umweltproben mittels SPE mehrmals extrahiert werden und in den Biotests mehrmals an unterschiedlichen Tagen untersucht werden. Für YES und ER-CALUX® wird im Rahmen der Vorarbeiten für die ISO-Zertifizierung die Reproduzierbarkeit mit Standardsubstanzen (E2, EE2 und BPA), Gemischen und Umweltproben untersucht, so dass für diese Tests in absehbarer Zeit Daten zur Vergleichbarkeit von verschiedenen Laboren vorliegen. Für die Interpretation der Ergebnisse und das Erstellen eines Beurteilungsschemas ist die Reproduzierbarkeit der angewandten Test essentiell.



3.7 Beurteilung der Resultate anhand von Güteklassen

Das Beurteilungssystem für die Ergebnisse soll:

- die Identifizierung von Gewässern oder Gewässerabschnitten ermöglichen, in denen problematische Konzentrationen von Östrogenen zu erwarten sind,
- eine differenzierte Beurteilung der Wasserqualität mit Einteilung in verschiedene Güteklassen ermöglichen und
- aufzeigen, ob effektbasierte Qualitätskriterien überschritten werden und somit eine mögliche Gefährdung von Wasserlebewesen nicht ausgeschlossen werden kann.

Um die Belastung eines Fließgewässers mit Östrogenen beurteilen zu können, werden die ermittelten EEQs aus Biotests und Analytik mit dem chronischen Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol (E2) verglichen, das in beiden Tests auch als Referenzsubstanz dient.

Tab. 3 gibt einen Überblick über verschiedene Vorschläge für chronische Qualitätskriterien (CQK, internationale Bezeichnung: AA-EQS, annual average environmental quality standard) der EU und der Schweiz.

Tab. 3: Vorschläge für chronische Umweltqualitätskriterien (AA(Annual average)-EQS, CQK) der EU Working Group E (WG E; Stand: 11.2011) und des Schweizerischen Oekotoxizitätszentrums (Stand 11.2011).

Substanz	AA-EQS Vorschlag WG E	AA-EQS Vorschlag Oekotoxizitätszentrum
Estron (E1)	noch nicht verfügbar	3.6 ng/L
17 β -Estradiol (E2)	0.4 ng/l	0.4 ng/l
17 α -Ethinylestradiol (EE2)	0.035 ng/l	0.037 ng/l
Nonylphenol (NP)	300 ng/L	13 ng/L

Die gemessene östrogene Belastung (als EEQs) eines Gewässers wird z.B. mit einem 3-skalgigen Beurteilungssystem eingeteilt (Tab. 4). Eine solche Güteklassierung ist aufgrund der derzeitigen Datenlage als vorläufig zu betrachten. Bei welchen Über- bzw. Unterschreitungen des Qualitätskriteriums ein Risiko für die Wasserlebewesen besteht respektive mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann und ob die im Modulstufenkonzept übliche 5-stufige Bewertung verwendet werden kann, muss in weiteren Untersuchungen zur Variabilität und Reproduzierbarkeit der Biotest-Ergebnisse noch erarbeitet werden.

Für die Ermittlung der Wasserqualitätsklassen werden die Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen mit dem Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol verglichen. Somit können aus den gemessenen EEQ-Werten direkt die Gewässergüteklassen abgeleitet werden.

Aus dem Verhältnis der beiden Werte werden anschliessend Risikoquotienten berechnet. Darunter versteht man das Verhältnis zwischen der gemessenen Umweltkonzentration und dem Qualitätskriterium. Gemessene Umweltkonzentrationen sind im Fall von spezifischen Biotests Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen (TEQs) z.B. EEQ aus dem YES oder ER-CALUX[®] und Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) aus dem Algentest.

Ist das Verhältnis von TEQ zu Qualitätskriterium grösser als 1, besteht ein intolerierbares Risiko; ist es kleiner als 1, so ist das Risiko tolerierbar (Knacker, 2007).



Tab. 4: Vorläufiger Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für Östrogen aktive Substanzen aus kommunalem Abwasser (angepasst nach Götz et al. (2010a) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).

EEQ = Estradiol-Äquivalenzkonzentration, CQK = chronisches Umweltqualitätskriterium, RQ = Risikoquotient = Verhältnis von EEQ zu CQK

Evaluation		Kriterium/Beschreibung		Einhaltung d. Qualitätskriteriums
	Gut	EEQ ist kleiner als das 0.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol	$RQ < 0.5$	Eingehalten
	Im Bereich des Qualitätskriteriums	EEQ ist kleiner als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol	$0.5 \leq RQ < 2.5$	Im Grenzbereich
	Unbefriedigend bis schlecht	EEQ ist gleich oder grösser als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol	$RQ \geq 2.5$	Überschritten

Das chronische Umweltqualitätskriterium für E2 liegt zwischen dem Kriterium von E1 (3.6 ng/L) und EE2 (0.037 ng/L) und wurde aus folgenden Gründen als Qualitätskriterium gewählt:

- Die Hauptanteile der östrogenen Aktivität in Oberflächengewässern werden meist durch E1 und E2 verursacht. Dies wird mit dem AA-EQS von E2 berücksichtigt, da E1 *in vitro* weniger potent ist als E2.
- Bei einer Verwendung von EE2-Äquivalenten könnte das Risiko möglicherweise überschätzt werden. E2 ist *in vitro* und *in vivo* ähnlich potent. EE2 hingegen hat *in vitro* eine ähnliche Potenz wie E2, *in vivo* kann es aber, je nach betrachtetem Endpunkt, 10 – 25-mal potenter wirken als E2. Dies könnte zu falsch positiven Resultaten führen. E2-Äquivalente sind aus diesem Grund geeigneter zur Interpolation von *in vitro* zu *in vivo*.
- Die Beurteilung ist leicht durchzuführen, da in den Biotests die östrogene Wirkung bereits in E2-Äquivalenten ermittelt wird.

Mit der Einteilung der Güteklassen nach dem chronischen Qualitätskriterium für E2 wird daher ein guter Schutz von aquatischen Organismen erreicht. Hiermit können die Wirkungen aller in einer Wasserprobe vorhandenen Substanzen auf die Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor erfasst werden, was dadurch auch eine Beurteilung der Mischung dieser Substanzen ermöglicht.

In Werten ausgedrückt ergibt sich die Aufteilung in folgende Klassen (Tab. 5):

Tab. 5: Vorläufiger Vorschlag für eine Einteilung in verschiedene Wasserqualitätsklassen anhand der gemessenen Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ) Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium (AA-EQS) für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).

Evaluation		Kriterium		Einhaltung d. Qualitätskriteriums
	Gut	EEQ <	0.2	Eingehalten
	Im Bereich des Qualitätskriteriums	0.2 ≤ EEQ <	1	Im Grenzbereich
	Unbefriedigend bis schlecht	EEQ ≥	1	Überschritten

Bis zu einer Konzentration von 0.4 ng/L sind, unter Berücksichtigung der bekannten ökotoxikologischen Daten und bestimmter Sicherheitsfaktoren (je Substanz unterschiedlich



hoch, je nachdem wie viele Daten zu einem Stoff vorhanden sind), keine chronischen Effekte auf Organismen zu erwarten. Treten höhere Konzentrationen auf, können solche Effekte nicht ausgeschlossen werden.

Da die im Biotest erhaltenen Werte allerdings eine gewisse Schwankungsbreite aufweisen, die in weiteren Arbeiten noch genauer definiert werden soll, ist in die mittlere Klasse eine Sicherheitsmarge von 50% (0.2 ng/L) nach oben bzw. 75% (1 ng/L) nach unten einberechnet. Die untere Grenze von 1 ng/L wurde gewählt, da bei dieser Konzentration bereits biologische Effekte (mässig erhöhte Vitellogeninwerte) in wildlebenden Forellen auftreten können (Vermeirssen et al., 2005, siehe auch Box 2). Die vorgeschlagene Einteilung stellt daher eine vorläufige Einteilung dar, die gegebenenfalls noch angepasst werden wird.

Abb. 5 zeigt in welchem Bereich 17β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen auf Basis von Biotests und chemischer Analytik aufgrund der jeweiligen Bestimmungsgrenzen (LOQ) zuverlässig bestimmt werden können.

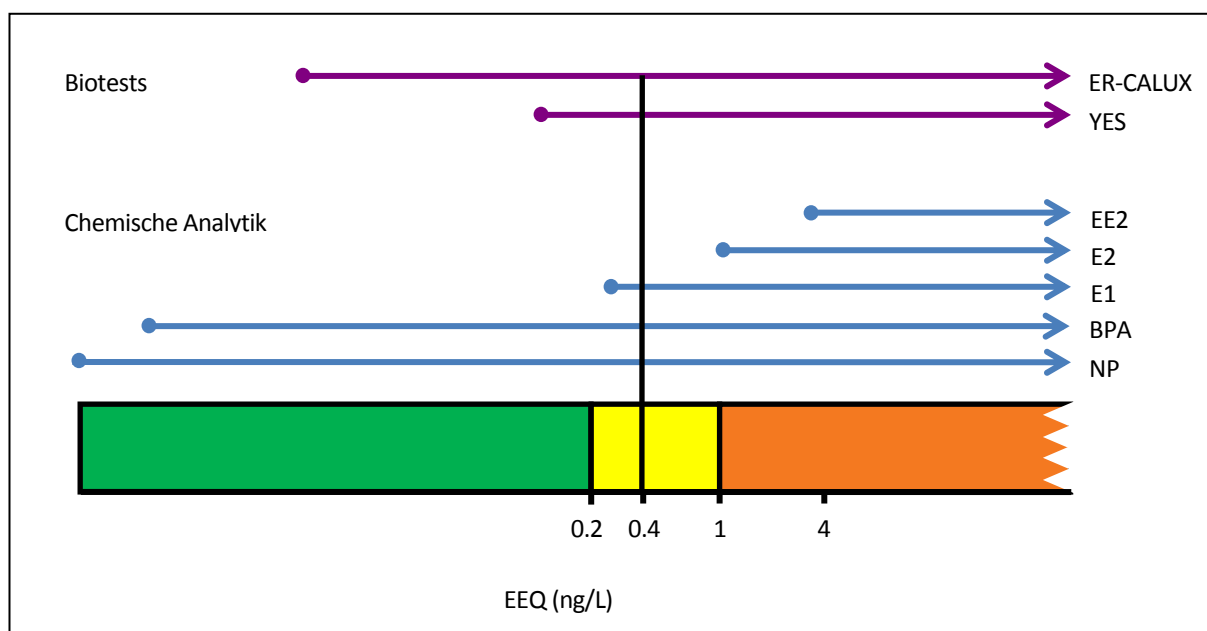


Abb. 5: Verteilung der 17β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) anhand der 3-skalierten Güteklassenverteilung von grün (gut) nach orange (unbefriedigend bis schlecht). Pfeile deuten an, in welchem Konzentrationsbereich EEQs aufgrund der Bestimmungsgrenzen (LOQ, ● o. ●) der jeweiligen Methodik zuverlässig bestimmt werden können, auf Basis von chemischer Analytik (Estron, E1; 17β -Estradiol, E2; 17α -Ethinylestradiol, EE2; Bisphenol A, BPA; Nonylphenol, NP mit Äquivalenzfaktoren (vgl. Tab. 17) auf EEQs umgerechnet) und biologischer Analytik (YES und ER-CALUX®).

Hier wird deutlich, dass die aktuellen Methoden der chemischen Analytik vor allem bei den sehr potenten Östrogenen EE2 und E2 die Konzentrationen, bei denen bereits biologische Effekte zu erwarten sind, nicht bestimmen können. Lediglich die weniger potenten Östrogene Bisphenol A und Nonylphenol haben ausreichend tiefe analytische Nachweisgrenzen, um EEQs zu berechnen, die auf eine gute bis sehr gute Wasserqualität hindeuten. Sowohl der YES als auch der ER-CALUX® können dagegen anzeigen, ob das Qualitätskriterium von 0.4 ng/L eingehalten ist oder nicht.



4 Ergebnisse der Biotests und Diskussion

Im Folgenden werden die Resultate der *Messkampagne Östrogene* vorgestellt und diskutiert. Dabei ist die Wahl der geeigneten Auswertungsmethoden (wie in Kapitel 3.5 beschrieben) entscheidend, um die Resultate der verschiedenen Testsysteme und der Analytik vergleichen und eine verlässliche Beurteilung der östrogenen Belastung eines Oberflächengewässers durchführen zu können.

4.1 Vergleich und Diskussion der EEQ Werte aus YES und ER-CALUX®.

Die wichtigsten Ergebnisse der *Messkampagne Östrogene* sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Beim Vergleich der Empfindlichkeiten von YES und ER-CALUX® konnten Daten aus der Literatur bestätigt werden. Der YES hat sich als 10-mal weniger sensitiv als der ER-CALUX® erwiesen (YES: EC₅₀ des Standards: 42 ng/L; EC₁₀ (=LOD): 12 ng/L und ER-CALUX®: EC₅₀: 5.0 ng/L, EC₁₀ (= LOD): 1.0 ng/L) (siehe auch Abb. 3 und Abb. 4).
2. Die EEQ-Werte im YES variierten zwischen 22 und 40 ng/L für Zulaufproben. Östrogene wurden gemäss YES zu 55% bis 95% durch die biologische Reinigung entfernt, so dass im Ablauf noch 0.6 bis 11 ng/L EEQ (mit einer Ausnahme von 48 ng/L) gemessen wurden.
3. Die EEQ-Werte im ER-CALUX® variierten im ARA-Zulauf von 12 bis 69 ng/L, die Elimination in der ARA lag gemäss ER-CALUX® bei 22 bis 92%, was in Ablaufkonzentrationen von 5.5 bis 29 ng/L resultierte.
4. Im OG nach Einleitung des ARA-Wassers waren die Konzentrationen bei allen Probenahmestellen höher als vor der ARA. Gemäss ER-CALUX® lagen sie bei 0.4 bis 20 ng/L (OG nach) bzw. bei <LOQ bis 1.4 ng/L (OG vor); gemäss YES lagen sie bei 0.1 bis 5.5 ng/L (OG nach) bzw. bei <LOQ bis 1.8 ng/L (OG vor).
5. Generell geben die jeweils ermittelten EEQ-Werte in YES und ER-CALUX® ein übereinstimmendes Belastungsbild ab, jedoch mit teilweise sehr unterschiedlichen Induktionsmaxima.

Die Gründe für die Unterschiede in den EEQ-Werten aus YES und ER-CALUX® sind in den Unterschieden der beiden Testsysteme zu suchen. YES- wie auch ER-CALUX® sind Rezeptorbindungs-Tests, jedoch werden im YES Hefezellen und im ER-CALUX® Säugerzellen verwendet. Bei der Interpretation der Daten müssen daher folgende Test-spezifische Faktoren berücksichtigt werden (siehe auch Tab. 11 im Anhang):

- Estron und Bisphenol A zeigen im ER-CALUX® eine 20- bzw. 4-mal schwächere östrogene Aktivität als im YES, wohingegen Nonylphenol im ER-CALUX® 23-mal stärker wirkt als im YES (siehe auch EEQs in Tab. 17). Diese Unterschiede sind in den unterschiedlichen biologischen Systemen (menschliche Zelle vs. Hefezelle) begründet. Dies führt, je nach Zusammensetzung der Probe, zu Unterschieden in den gemessenen EEQ-Werten.
- Die Durchlässigkeit der Hefezellwand, mit geringer passiver Diffusion und geringer selektiver Aufnahme, unterscheidet sich stark von derjenigen der Säugerzellmembran

(Earl Gray Jr et al., 1997; Legler et al., 2002b) Dies zeigt sich in der deutlich geringeren Empfindlichkeit des YES, was vor allem bei wenig belasteten Proben zu einer Unterschätzung der EEQ-Werte führen kann (Legler et al., 2002b, Leusch, 2008).

- Es ist anzunehmen, dass es signifikante Unterschiede im (Steroidhormon-) Metabolismus zwischen Hefe- und Säugerzellen gibt (Earl Gray Jr et al., 1997; Gaido et al., 1997). Säugerzellen können Substanzen in östrogenwirksame Metaboliten umwandeln, dies können die im YES verwendeten Hefezellen nicht (Connolly et al., 2011). Dadurch kann die tatsächliche östrogene Aktivität durch den YES unterschätzt werden.

Obige Unterschiede können bei Umweltproben mit östrogen und anti-östrogen wirkenden Substanzen zu Unterschieden in der Hemmung bzw. Stimulierung der östrogenen Antwort im YES und ER-CALUX[®] führen (Earl Gray Jr et al., 1997; Legler et al., 2002b). Trotzdem korrelieren die EEQ-Werte von YES und ER-CALUX[®] signifikant ($r^2 = 0.71$ (log Daten); $p < 0.0001$) (Abb. 6). Bei den ARA-Zulaufproben zeigte der YES meist höhere Werte an. Bei den ARA-Ablauf- und Oberflächengewässerproben lagen die ER-CALUX[®] Werte teilweise höher. Dies wurde auch in anderen Studien beschrieben (Legler et al., 2002b; Leusch et al., 2010), wo die Korrelation von YES und ER-CALUX[®] bei $r^2 = 0.82$ lag.

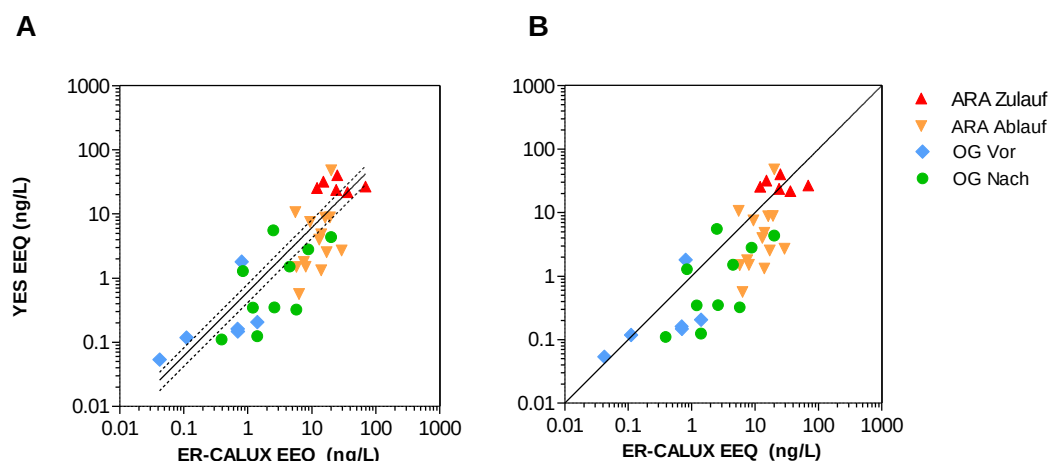


Abb. 6: (A) Korrelation der im YES und ER-CALUX[®] ermittelten EEQ-Werte (ng/L) ($r^2 = 0.71$ (log Daten), $p < 0.0001$). (B) Vergleich der im YES und ER-CALUX[®] ermittelten EEQ-Werte mittels einer 1:1-Linie.

Die Korrelation zeigt, dass die Ergebnisse beider Tests gut miteinander in Verbindung gebracht werden können. Die oben beschriebenen Unterschiede der Testsysteme, wie geringere Zellwanddurchlässigkeit und fehlende Metabolisierung im YES und unterschiedliche Sensitivitäten für bestimmte Substanzen, können die teilweise geringeren YES-EEQs im Vergleich zu den ER-CALUX[®]-EEQs erklären. Teilweise können diese Defizite durch eine Optimierung des YES-Verfahrens verbessert werden, z.B. kann ein Enzym (Lyticase) eingesetzt werden, um die Zellwand der Hefezellen zu durchlöchern, so dass das produzierte Enzym β -Galactosidase schneller in das Medium gelangt, um dort einen Farbumschlag zu bewirken, und/oder das Verfahren so modifiziert werden, dass Umweltproben direkt, ohne Extraktion eingesetzt werden können (Colosi und Kney, 2011; Schultis und Metzger, 2004;



Wagner und Oehlmann, 2009). Diese Methoden werden im Rahmen der laufenden ISO-Zertifizierung für den YES-Test ebenfalls evaluiert.

4.2 Vergleich der EEQ aus Biotests und chemischer Analytik

Vergleicht man die EEQ-Werte aus YES, ER-CALUX[®] und chemischer Analytik (Umrechnung der gemessenen Konzentrationen mit Hilfe der testspezifischen Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) (siehe auch Tab. 17) auf EEQ-Werte) zeigt sich, dass die jeweils ermittelten EEQ-Werte ein generell übereinstimmendes Belastungsbild abgeben, jedoch mit unterschiedlichen Induktionsmaxima bzw. unterschiedlicher Höhe der ermittelten EEQs (siehe Abb. 7). Die detaillierten Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 19, Tab. 20 und Tab. 22 im Anhang aufgelistet.

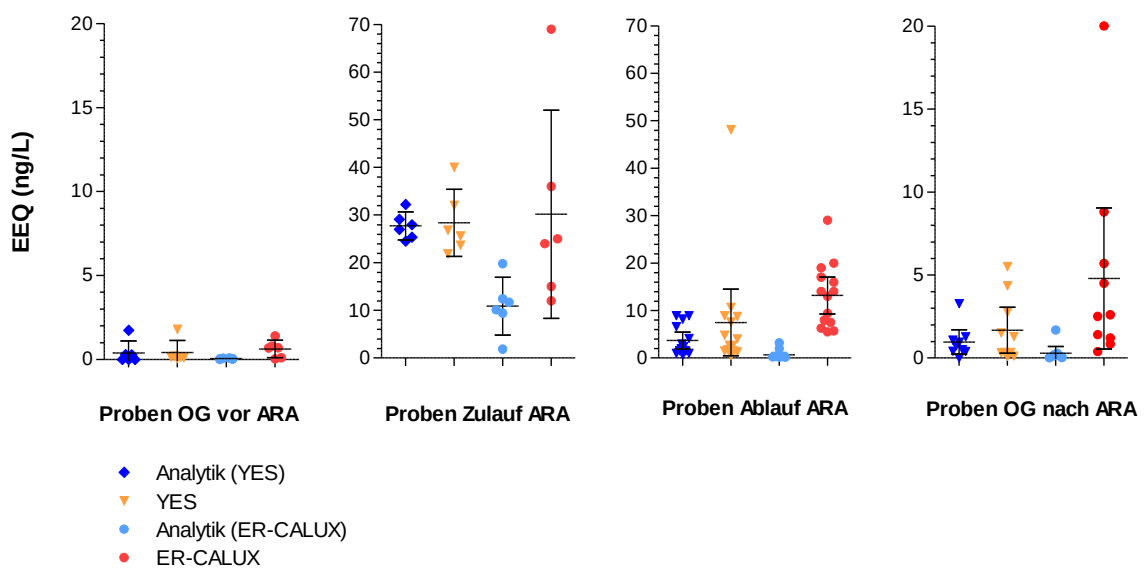


Abb. 7: Vergleich von chemischer Analytik und Biotests für verschiedene ARA-Zu- und ARA-Ablaufproben und Oberflächengewässerproben vor und nach Einleitung des ARA-Abwassers. Dargestellt sind die in den Biotests gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) und die mittels Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) (siehe auch Tab. 17) aus den Ergebnissen der analytischen Messungen berechneten testspezifischen EEQs für YES und ER-CALUX[®]. MW $\pm$ 95% Konfidenzintervall.

Die gemessene Östrogenität im ARA-Ablauf und im OG nach der ARA konnten nur teilweise durch die Summe der EEF-gewichteten Konzentrationen der analytisch gemessenen Östrogene erklärt werden. Folgende Punkte tragen zu den Unterschieden zwischen den EEQ der chemischen Analytik und der Biotests bei:

- Durch die Messung der fünf relevantesten bekannten Östrogen aktiven Substanzen bildet die chemische Analytik nur einen Teil der Gesamtbelastung ab. Es ist anzunehmen, dass sich weitere unbekannte östrogene und antiöstrogene Substanzen in einer Wasserprobe befinden, die zum Gesamteffekt einer Probe beitragen.
- Analytische Bestimmungsgrenzen liegen teilweise über den Effektkonzentrationen. Insbesondere EE2, die potenteste der gemessenen Substanzen, konnte wegen der Bestimmungsgrenze von 3 ng/L, die weit über den Effektkonzentrationen liegt, in keiner der Proben quantifiziert werden. Begründet ist dies in der niedrigeren

Sensitivität des LC-MS/MS gegenüber EE2, als beispielsweise E1 oder E2, wo die gleiche untersuchte Konzentration zu einem höheren Signal im Gerät führt. 17 β -Estradiol, die zweitpotenteste Substanz, weist eine Bestimmungsgrenze von 1.1 ng/L auf. In den meisten ARA-Ablauf-Proben und OG-Proben vor und nach der ARA wurde E2 nicht nachgewiesen (siehe auch Tab. 22 im Anhang). Dies kann bei den meisten ARA-Ablauf- und Oberflächengewässer-Proben die teils deutlich höheren aus Biotests ermittelten EEQ-Werte im Vergleich zur chemischen Analytik erklären (Abb. 8).

- Bei allen untersuchten Proben handelt es sich um komplexe, unterschiedlich zusammengesetzte Mischungen, deren Einzelsubstanzen additiv, antagonistisch oder sogar synergistisch miteinander wirken können. Solche Interaktionen können mit dem Ansatz der chemischen Analytik nicht erfasst werden, zeigen sich aber bei den ermittelten EEQs der Biotests.

Interessanterweise korrelieren jedoch die im YES ermittelten EEQ-Werte (vor allem für ARA-Zu- und Ablaufproben) insgesamt besser mit denjenigen aus der chemischen Analytik als die im ER-CALUX[®] ermittelten EEQ-Werte (nur ein Teil der Zulaufproben) (Abb. 8).

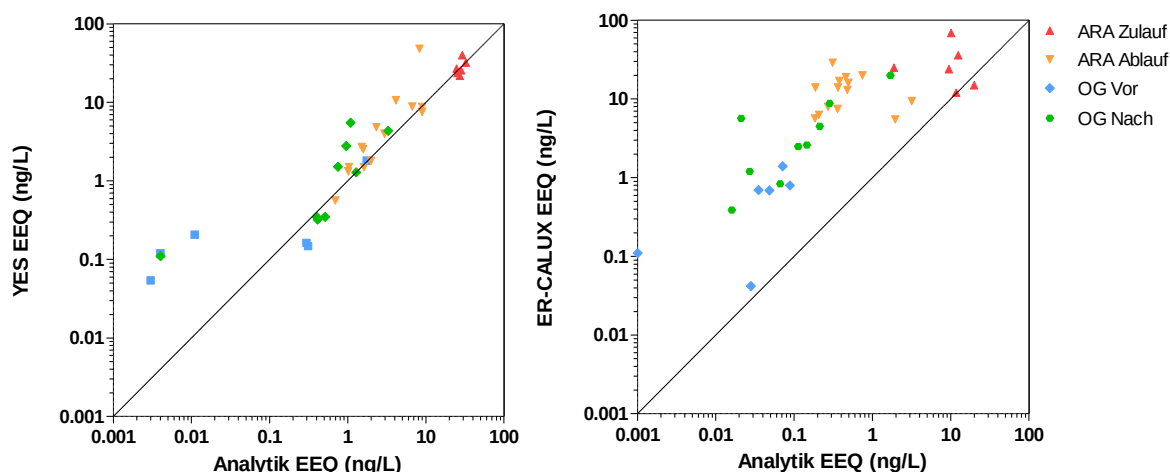


Abb. 8: (A) Korrelation der im YES und mit chemischer Analytik ermittelten EEQ Werte (ng/L) ($r^2=0.82$ (log Daten), $p<0.0001$) im Vergleich zu (B) Korrelation der im ER-CALUX[®] und mit chemischer Analytik ermittelten EEQ-Werte (ng/L) ($r^2=0.55$ (log Daten), $p<0.0001$). Die eingezeichneten Linien entsprechen der 1:1 Linie.

Oben erwähnte YES-relevante Punkte sowie die über den Effektkonzentrationen liegenden Bestimmungsgrenzen der EE2- und E2-Analytik spielen dabei möglicherweise eine Rolle. Dies führt auch dazu, dass die analytisch bestimmten EEQ sehr stark auf dem dritt-potentesten und in messbaren Konzentrationen vorkommenden Estron (E1) basieren. Im Gegensatz dazu erfassen ER-CALUX[®] und YES vorhandenes E2 und EE2, wohingegen E1 nur eine untergeordnete Rolle spielt, da es in den Biotests 2.5- (YES) bzw. 50-mal (ER-CALUX[®]) schwächer wirkt als E2. Da in den Proben verhältnismässig viel E1 vorhanden ist (siehe Tab. 22 im Anhang) und der YES E1 besser detektieren kann als der ER-CALUX[®] (EEF für E1: 0.4 (YES), 0.02 (ER-CALUX[®]), siehe Tab. 17), könnte dies ein Grund für die bessere Korrelation des YES-Tests mit der Analytik sein.



4.3 Umweltrelevanz der Testergebnisse

Nach der Diskussion der Testergebnisse stellt sich die Frage, wie relevant die in der aktuellen Messkampagne ermittelten EEQ-Werte für die in diesen Gewässern lebenden Organismen (im speziellen Fische) sind. Vergleiche mit verschiedenen Studien zeigen, dass die hier gemessenen EEQ-Werte (z.B. 4.8 ± 5.9 ng EEQ/L im Oberflächengewässer nach den Kläranlagen) zu nachteiligen Effekten bei den betroffenen Fischpopulationen führen könnten. Beispielsweise führte die Exposition eines ganzen Sees mit 5 - 6 ng/L Ethinylestradiol über eine Zeitdauer von 2 Jahren zum Kollaps der Fischpopulation einheimischer Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) aufgrund fehlender Jungfische (Kidd et al., 2007). Vermeirssen et al. (2005) detektierten leicht bis moderat erhöhte Vitellogeninwerte in männlichen Forellen im Bereich von Kläranlagen. Hierbei führten Konzentrationen von 1 ng EEQ/L bereits zu einer Induktion von Vitellogenin bei Bachforellen.

In dieser Messkampagne wurden mit dem ER-CALUX[®] durchschnittlich EEQ-Werte in Oberflächengewässern von 0.6 ± 0.5 ng EEQ/L (Minimum: <LOQ und Maximum: 1.4 ng/L) oberhalb und 4.8 ± 5.9 ng EEQ/L (Minimum: 0.4 und Maximum: 20 ng/L) unterhalb der Einleitungsstellen der untersuchten Kläranlagen gefunden. Mit dem YES-Test wurden EEQ-Werte von durchschnittlich 0.4 ± 0.7 ng EEQ/L (Minimum: <LOQ und Maximum: 1.8 ng/L) oberhalb und 1.7 ± 1.9 ng EEQ/L (Minimum: 0.1 und Maximum: 5.5 ng/L) unterhalb der Abwassereinleitung festgestellt.

Die in der hier durchgeführten Messkampagne detektierten Konzentrationen haben daher wahrscheinlich, mindestens nach der Einleitung durch kommunale Kläranlagen, eine hohe Umweltrelevanz.

Die Frage, ob der YES möglicherweise zu einer Unterschätzung der Oberflächengewässer-Belastung, bzw. der ER-CALUX[®] zu einer Überschätzung führt, kann noch nicht abschliessend beantwortet werden. Die Qualität des Gewässers für dessen Organismen kann nur mit aufwändigen *in vivo* Versuchen oder Ökosystemstudien ermittelt werden (z.B. Messung von Vitellogenin in Fischen).

Zellen oder Testorganismen in *in vitro* Tests besitzen im Allgemeinen nur beschränkte metabolische Fähigkeiten. Dies führt dazu, dass die Extrapolation von *in vitro* nach *in vivo* für Substanzen, die eine Bioaktivierung durchlaufen, zu falsch negativen Befunden führen kann, wohingegen die Wirkung von Substanzen, die *in vivo* leicht abgebaut werden, überschätzt wird. Zudem werden bei *in vitro* Biotests Bioverfügbarkeit, Interaktionen zwischen biologischen Stoffwechselwegen und komplexe Prozesse wie Aufnahme, Bindung an Transportproteine, Transport an Zielort und Ausscheidung nur begrenzt berücksichtigt. Sie messen einzig die Östrogenität einer Probe durch Bindung und Aktivierung des Östrogenrezeptors nach Aufnahme und Verteilung in der Zelle. Weitere östrogene Aktivitäten, die durch andere Mechanismen als Rezeptorbindung hervorgerufen werden (z.B. Wechselwirkung mit Hormonsynthese oder Metabolismus), werden von *in vitro* Biotests ebenfalls nicht erkannt.

Der YES wie auch der ER-CALUX[®] können jedoch einen ersten Hinweis auf eine mögliche östrogene Aktivität der Probe bezüglich Rezeptoraktivierung geben (wobei die menschliche Zelllinie des ER-CALUX[®] beispielsweise einem Fisch ähnlicher ist als die Hefezelle des YES).



In ausgewählten Fällen könnten Umweltproben mit hoher Östrogenität im *in vitro* Biotest in einem folgenden Schritt auch in einem relevanten *in vivo* Test untersucht werden (z.B. Vitellogenin-Konzentration in Fischen). Dies wäre den Vollzugsbehörden im Einzelfall im Rahmen eines Einzugsgebietsmanagements zu überlassen.

4.4 Vergleich der Ergebnisse der Messkampagne mit anderen Studien in der Schweiz und weiteren Ländern

Biotestergebnisse - Vergleich mit Studien im In- und Ausland. YES und ER-CALUX[®] detektierten EEQs von 12 bis 69 ng EEQ/L in ARA-Zuläufen. Abläufe enthielten noch 0.6 bis 29 ng EEQ/L. Im OG nach der ARA-Einleitung waren die Konzentrationen mit 0.4 bis 20 ng EEQ/L meist höher als vor der ARA-Einleitung mit <LOQ bis 1.4 ng EEQ/L).

Diese Konzentrationen liegen im ähnlichen Bereich wie die in früheren Untersuchungen in Kläranlagenabläufen und Schweizer Flüssen gemessenen EEQ-Werte. Die im Jahr 2003 von Vermeirssen et al. (2005) in 18 Schweizer Flüssen ermittelten EEQ-Werte reichten von 0.3 bis 2 ng/L (Winter) und 0.4 bis 7 ng/L (Sommer). Im Schweizer Fluss Lützelurm wurden im Jahr 2004 im Mittel EEQs von 0.82 ng/L gemessen, der Maximalwert lag bei 2.1 ng/L. Im Ablauf der angegliederten ARA Aadorf reichten die Werte von 0.2 bis 7.7 ng/L (Vermeirssen et al., 2006). Im Projekt COMPREHEND (Community Programme of Research on Environmental Hormones and Endocrine Disruptors) konnte gezeigt werden, dass in der Regel natürliche und synthetische Hormone aus häuslichen Abwässern für die östrogene Aktivität in Wasserproben verantwortlich sind (Aerni et al., 2004). Auch wurden die Konzentrationen östrogenen Stoffe in Oberflächengewässern abgeschätzt und z.B. für E2 Konzentrationen von 0 bis 5 ng/L ermittelt (Legler et al., 2002a). Diese Belastung mit Östrogen aktiven Substanzen kann vor allem an Hot Spots problematisch sein, wenn eine ausreichende Verdünnung des gereinigten Abwassers aus der ARA nicht gewährleistet ist.

In Oberflächengewässern im nahen Ausland wurden ebenfalls ähnliche Werte gemessen. Beispielsweise wurden in den Niederlanden mit dem ER-CALUX[®] im Rhein 0.08 bis 0.36 ng und in der Maas 3.6 bis 9.4 ng EEQ/L gemessen (Murk et al., 2002). Insgesamt ist die östrogene Belastung in Schweizer Gewässern und Kläranlagenausflüssen leicht bis moderat und vergleichbar mit jener in Deutschland und den Niederlanden.

Ein Vergleich der Ergebnisse der chemischen Analytik mit Studien aus In- und Ausland findet sich im Anhang 3.

5 Vorschlag für das Vorgehen zur Beurteilung der östrogenen Belastung von Oberflächengewässern

5.1 Überblick über die einzelnen Schritte

Für die Beurteilung der Wasserqualität in Bezug auf eine Belastung mit Östrogen aktiven Substanzen wurde ein auf 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) basierendes Vorgehen verwendet.

Dieses Vorgehen wurde angelehnt an den Vorschlag für ein Beurteilungskonzept für Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser von Götz et al. (2011) entwickelt. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie werden folgende Schritte vorgeschlagen (Abb. 9).

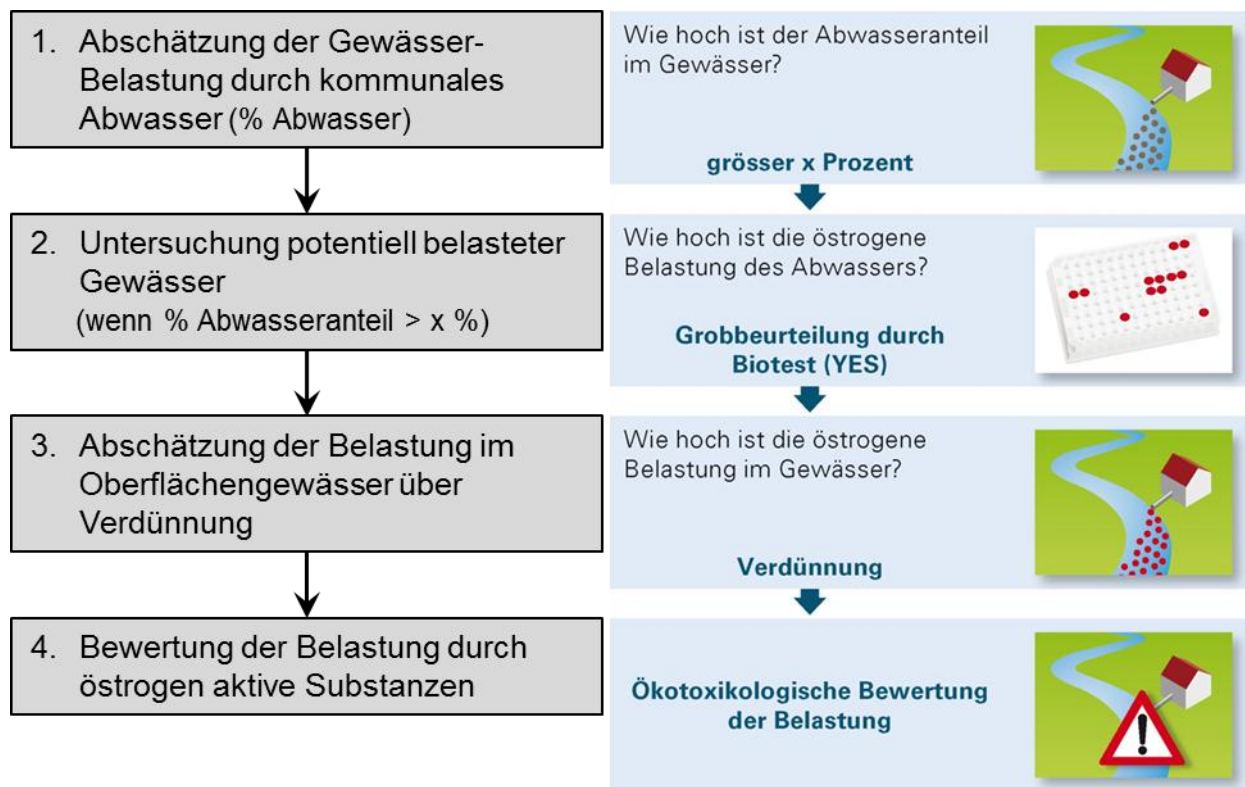


Abb. 9: Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzepts für die Belastung von Oberflächengewässern mit Östrogen aktiven Substanzen (Grafik rechts: Eawag)

Der erste Schritt ist die Abschätzung der Belastung durch kommunales Abwasser. Zur Bestimmung des Abwasseranteils kann, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, analog zum Beurteilungskonzept für Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser von C. Götz (Götz et al., 2011) vorgegangen werden. Der Abwasseranteil im Gewässer kann hierfür entweder aus dem Minimal-Ablauf abgeschätzt oder aus der gemessenen Abwassermenge und dem Ablauf im Fliessgewässer berechnet werden.

Übersteigt der Abwasseranteil eine bestimmte Schwelle (z.B. 10%), sollte eine Untersuchung potentiell belasteter Gewässer mit Biotests erfolgen. Aufgrund der Ergebnisse der



vorliegenden Studie wird ein pragmatisches Vorgehen hierfür vorgeschlagen. Für eine Grobbeurteilung kann beispielsweise die östrogene Wirkung im YES im Abwasser ermittelt werden und anschliessend über die Verdünnung eine Abschätzung der Belastung im Fliessgewässer erfolgen.

Wurde eine östrogene Belastung im Gewässer ermittelt, sollte sie anschliessend bewertet werden. Dies kann wie in Kapitel 3.7 beschrieben mit einem 3-stufigen Bewertungssystem vorgenommen werden. Damit kann eine grobe Beurteilung der Belastung der Gewässer mit Östrogenen vorgenommen werden.

Im Einzelfall können auch Gewässerproben analysiert werden. Mit dem YES-Test kann dabei überprüft werden, ob das Qualitätskriterium von 0.4 ng/L Estradioläquivalente eingehalten wird. Es können hierfür auch andere Biotests verwendet werden wie z.B. sensitivere YES-Varianten oder der ER-CALUX[®]. Aktuell lässt sich jedoch keine breit abgestützte Methode zur Beurteilung der östrogenen Effekte anhand von Gewässerproben empfehlen.

5.2 Risikobeurteilung der Ergebnisse aus der Messkampagne Östrogene

Die in Kapitel 3.7 vorgeschlagene Einteilung der Güteklassen wurden auf die EEQ-Werte aus YES und ER-CALUX[®] der *Messkampagne Östrogene* angewendet. Tab. 6 zeigt den Vergleich der so ermittelten Wassergüteklassen für alle Probenahmestellen. Da die Beurteilung auf Gewässer fokussiert ist, wird die Wasserqualität der Oberflächengewässer oberhalb und unterhalb der Einleitstelle der ARA beurteilt. Zusätzlich wird die Belastung im Oberflächengewässer über die Verdünnung abgeschätzt und mit den im Gewässer gemessenen Werten verglichen. Die Messergebnisse für ARA-Zu- und Abläufe finden sich im Anhang in Tab. 19 (ER-CALUX[®]) und Tab. 20 (YES).

Im YES wurde das chronische Qualitätskriterium in Bezug auf Östrogen aktive Substanzen bei 67% der Oberflächengewässer vor ARA eingehalten und im ER-CALUX[®] bei 33% der Proben. Die Wasserproben aus dem Fliessgewässer unterhalb der Einleitstelle der ARA zeigen in fast allen Fällen eine Verschlechterung der Wasserqualität in Bezug auf Östrogen aktive Substanzen im Vergleich zum entsprechenden Fliessgewässer oberhalb der Einleitstelle der ARA an. Im YES wurde das chronische Qualitätskriterium noch bei 20% der Oberflächengewässer eingehalten, in 50% der Fälle wurde es überschritten. Im ER-CALUX[®] wurde das Qualitätskriterium in 80% der Proben überschritten.

Tab. 6 zeigt den Vergleich der nach dem vorläufigen Vorschlag aus Biotests ermittelten Wassergüteklassen bzgl. östrogenen Belastung.



Tab. 6: Vergleich der aus Biotests ermittelten Wasserqualitätsklassen an 13 Probenahmestellen für Östrogen aktive Substanzen im Oberflächengewässer ober- und unterhalb der Einleitstelle der ARA. Wassergüteklassen: grün: Qualitätskriterium eingehalten, gelb: im Bereich des Qualitätskriteriums, orange: Qualitätskriterium überschritten. Die Oberflächengewässer unterhalb der Einleitstelle der ARA werden zusätzlich über die EEQ-Werte der Abläufe sowie die jeweiligen Verdünnungsfaktoren beurteilt.

	EEQ YES	EEQ YES * Verdünnung	EEQ ER CALUX®	EEQ ER CALUX® * Verdünnung
Oberflächengewässer vor ARA				
A	0.16		0.69	
B	0.21		1.40	
H	1.80		0.80	
I	0.12		0.11	
M	0.05		0.04	
N	0.15		0.70	
Oberflächengewässer nach ARA				
A	0.35	1.03	2.60	5.47
B	2.79	0.29	8.80	3.19
C	0.11	6.50	0.39	2.70
E		0.32		0.58
F		1.08		4.51
G	0.13	0.07	1.40	0.69
H	1.29	3.00	0.84	3.72
I	5.52	10.68	2.50	5.50
K	4.36	4.00	20.00	13.00
L	0.32	0.65	5.70	1.39
M	1.51	1.87	4.50	12.47
N	0.35	1.50	1.20	5.70
O		0.22		2.41

Vergleicht man die aus den jeweiligen Verdünnungen berechneten EEQ-Werte mit den gemessenen Werten zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung. So ergibt sich beim YES bei Berechnung und Messung in 6 von 10 Fällen die gleiche Wasserqualitätsklasse, in den übrigen Fällen ergibt die Berechnung eine schlechtere Wasserqualitätsklasse als die Messung (Ausnahme ARA B). In Anbetracht dessen, dass die Verdünnungen aus einer Modellierung des Abwasseranteils bezogen auf Niedrigwasser (Q_{347}) stammen (sozusagen das „worst case“-Szenario) und im Gewässer Stichproben, also lediglich eine Momentaufnahme, genommen wurden, sind die Ergebnisse schlüssig. Mit einer Abschätzung des Abwasseranteils wäre man auf jeden Fall auf der sicheren Seite und kommt nicht in Gefahr aufgrund einer wenig repräsentativen Stichprobe die östrogene Belastung zu unterschätzen oder evtl. auch zu überschätzen. Auch beim ER-CALUX® ergibt die Berechnung über den Abwasseranteil meist die gleiche oder schlechtere Wasserqualitätsklassen. In einem von 10 Fällen fällt die Gewässerqualität bei beiden Tests allerdings bei der Abschätzung auch besser aus als bei der Messung. Eine abschliessende Erklärung, warum die Wasserqualität im ER-CALUX® teilweise schlechter als im YES-Test eingestuft wird, lässt sich mit dem vorliegenden Wissen nur teilweise geben (siehe testspezifische Unterschiede in Kapitel 4.1), hierfür sind weitere Studien nötig. Auch die Erkenntnisse aus der ISO-Zertifizierung können hier zum weiteren Verständnis beitragen.

Insgesamt sollten diese ersten Ergebnisse anhand weiterer Messungen überprüft und präzisiert werden.



6 Gesamtdiskussion der Biotests und des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept

In diesem Kapitel soll der in der Messkampagne Östrogene exemplarisch angewendete vorläufige Vorschlag für ein Erhebungs- und Beurteilungskonzept und dessen Methoden diskutiert werden und Empfehlungen für die Erfassung östrogenen Effekte in abwasserbelasteten Gewässern gegeben werden.

Beim Vergleich von YES und ER-CALUX[®] haben sich Unterschiede in der Güteklasseneinteilung gezeigt, die mit abnehmender östrogenen Belastung (ARA Ablauf > OG nach ARA > OG vor ARA) zunehmen. Generell wird die Wasserqualität bzgl. östrogenen Belastung im ER-CALUX[®] schlechter bewertet als im YES, dennoch zeigen die Ergebnisse der beiden Testsysteme eine gute Korrelation (Abb. 6).

Gründe für diese Unterschiede lassen sich, wie in Kapitel 4.1 diskutiert, in den Unterschieden zwischen ER-CALUX[®] und YES finden. Zusammenfassend zeigt die hier vorgestellte Studie, dass:

- der YES und der ER-CALUX[®] für das Screening und die Beurteilung von ARA-Ablaufproben grundsätzlich geeignet sind, jedoch der YES die Belastung in den meisten Fällen niedriger einstuft als der ER-CALUX[®]. Aufgrund der besseren Praktikabilität des YES und der Korrelation beider Methoden, kann als pragmatisches Vorgehen eine Grobbeurteilung anhand des YES im gereinigten Abwasser vorgenommen werden. Eine Extrapolation auf den Östrogengehalt im Gewässer kann über Umrechnung der EEQs anhand des Abwasseranteils im Gewässer erfolgen. Allerdings sollte hierfür die Methodenvalidierung, insbesondere die Wiederfindung, des Verfahrens noch genauer evaluiert werden. Ebenso sollten die unterschiedlichen YES-Varianten auf ihre Eignung untersucht werden.
- eine Beurteilung der Östrogenität von Oberflächengewässerproben nach dem vorgestellten Vorgehen noch nicht praxisreif ist, da die Variabilität und Reproduzierbarkeit der Methodik noch genauer evaluiert werden muss. Für die praxisorientierte Umsetzung soll ein breit abgestütztes Vorgehen entwickelt werden und auch die Arbeiten im Rahmen des ISO-Arbeitskreises abgewartet werden. Ebenso müssen mehr Erfahrungen mit der Anwendung dieser Testsysteme in belasteten Oberflächengewässern gesammelt werden.
- Es müssen verschiedene Fragen geklärt werden (z.B. Wiederfindung, Reproduzierbarkeit, Interpretation, Praktikabilität), bevor eine Auswahl des bestgeeigneten Testsystems getroffen, sowie eine Empfehlung für die Beurteilung von Oberflächengewässerproben für den Umweltvollzug gegeben werden kann. Eine Übersicht der in dieser Studie betrachteten Testsysteme ist in Tab. 7 zusammen gefasst. Hier wird ergänzend auch noch der H295R aufgeführt, der im Rahmen des hier vorgeschlagenen Beurteilungskonzeptes aktuell nicht in Frage kommt, u.a. auch deshalb, weil dieser Test keine EEQ-Werte liefern kann.
- Im Einzelfall, beispielsweise für besonders ökologisch wertvolle Gewässerabschnitte, bei potentiell hohen östrogenen Belastungen oder aus anderen besonderen Interessen, können vertiefte Untersuchungen im Gewässer durchgeführt werden. Dafür kommt grundsätzlich ein breites Spektrum an Untersuchungen infrage (Untersuchung an freilebenden Fischen, Fish-Early-Life Stage-Untersuchungen, ER-CALUX[®] etc.).



Tab. 7: Eignung verschiedener *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen für den Vollzug.

Beurteilung: - unter Durchschnitt; + mittelmässig; ++ gut; +++ exzellent

	Yeast Estrogen Screen (YES)	ER-CALUX®	H295R Steroidgenese Test
Pro	- <u>wissenschaftlich fundiert /akzeptiert</u> - vielfach angewendet - sehr praktikabel - kostengünstig - frei verfügbar für (nicht-) kommerzielle Nutzung - Kandidat für ISO Zertifizierung für Umweltproben - Aufwand vertretbar	- <u>wissenschaftlich fundiert /akzeptiert</u> - vielfach angewendet - praktikabel - sehr sensitiv - Metabolisierung der Probe - nicht-kommerzielle Version frei verfügbar (T47D-KBluC) - 2008 durch die EC/ECVAM validiert - Kandidat für ISO Zertifizierung für Umweltproben	- <u>wissenschaftlich fundiert/akzeptiert</u> - praktikabel - ergänzender Endpunkt zu Rezeptorbindungstests - frei verfügbar - validiert/standardisiert im Rahmen der US EPA und der OECD - Bestandteil des US EPA EDTA Programms
Contra	- nicht validiert - Bewilligung für GVO nötig - steriles Arbeiten - relativ unsensitiv (hohe LOQ, schlechte Permeabilität durch Zellwand)	- Bewilligung für GVO nötig - aufwändig und teuer (u.a. Lizenzkosten) - steriles Arbeiten - Zellkulturlabor-Ausstattung notwendig - nur kommerziell verfügbar (Lizenz)	- steriles Arbeiten - Zellkulturlabor-Ausstattung notwendig - in Europa noch kaum genutzt - Interpretation, Extrapolation der Daten noch schwierig - aufwändig und teuer (u.a. wegen geringer Verbreitung) - im Wesentlichen für Einzelstoffbestimmung validiert
Interpretierbarkeit, Kommunizierbarkeit und Bewertung der Resultate	+++	+++	++
Generelle Eignung zur Erkennung von Schadstoff-Hotspots in Oberflächengewässern	Abwasser: +++ Oberflächengewässer: +	Abwasser: +++ Oberflächengewässer: +++	Abwasser: ++ Oberflächengewässer: +++
Niedrige Kosten (Investition in Laborgeräte, Materialkosten)	+++	- (++ wenn durch BDS durchgeführt)	-
Generelle Eignung für den Vollzug (Durchführbarkeit durch kantonale/private Labors, etc.)	+++	- (+++ bei externem Auftrag an BDS)	-



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der YES preisgünstiger, aber auch deutlich weniger sensitiv ist als der ER-CALUX[®] und so mehr Probenvolumen braucht (Legler et al., 2002b).

Im Hinblick auf eine Anwendung der Testsysteme in der Routineanalytik ist der YES jedoch im Vergleich zu ER-CALUX[®] und H295R deutlich anwenderfreundlicher und hinsichtlich Material- und Gerätekosten in der Anschaffung weniger kostenintensiv. Aufgrund seiner generell einfacheren Durchführbarkeit ist der YES, im Gegensatz zum ER-CALUX[®], auch eher für ein erstes Screening von Umweltproben auf das Vorhandensein einer Östrogenität geeignet, unter Berücksichtigung seiner methodischen Schwächen.

Bei der ausschliesslichen Anwendung von Rezeptorbindungstests wie dem YES oder ER-CALUX[®] besteht jedoch die Gefahr, wichtige, nicht-rezeptorvermittelte Effekte, die beispielsweise im H295R gemessen werden können, nicht zu erfassen.

Eignung der untersuchten Testsysteme für die Bestimmung von Östrogen aktiven Substanzen in Umweltproben:

- Chemische Analytik ist zur Gütebewertung von Oberflächengewässern hinsichtlich einer Belastung mit Östrogen aktiven Substanzen nicht ausreichend, da die Bestimmungsgrenzen der wichtigsten steroidal Östrogene (E2, EE2, E1) über dem AA-EQS von E2 (0.4 ng/L) liegen.
- Die betrachteten Testsysteme haben ihre Vor- und Nachteile, es lässt sich aktuell keine definitive Empfehlung für eine Beurteilungsmethode für Oberflächengewässer machen.
- Der YES eignet sich in einer ersten Beurteilung potentiell für eine Verwendung im Vollzug und zur Etablierung und Anwendung in kantonalen und privaten Laboren. Es sollen aber noch weitere, insbesondere empfindlichere YES-Varianten evaluiert werden. Ebenso müssen für die Einführung die wichtigsten methodischen Eckdaten (Wiederfindung, Bestimmungsgrenzen, etc., siehe oben) noch ausführlicher validiert werden.
- Eine vorläufige erste Beurteilung belasteter Proben soll anhand des praktikablen, jedoch weniger empfindlichen YES-Test vorgenommen werden. Dabei empfiehlt sich eine Anwendung des YES in Proben des ARA-Ablaufes und eine Abschätzung der Gewässerkonzentration anhand des Abwasseranteils im Oberflächengewässer. Diese Methode zur groben Beurteilung abwasserbelasteter Gewässer sollte um weitere Biotests zum Nachweis anderer Wirkungen (z.B. Algtoxizität) ergänzt werden.
- YES, ER-CALUX[®], wie auch weitere Testsysteme, werden voraussichtlich im Rahmen der ISO-Zertifizierung validiert werden. Aus dieser Validierung entstehende Verbesserungen der Methodik sollen kontinuierlich übernommen werden.
- Der aufwändige und teure H295R ist derzeit aufgrund seiner geringen Verbreitung in Europa und der relativ schwierigen Interpretierbarkeit der Daten für praktische Anwendungen im Rahmen der vorgeschlagenen Gewässerbeurteilung noch nicht zu empfehlen. Er kann allenfalls in ausgewählten Fällen, bei denen eine weitergehende Untersuchung erforderlich ist, zur Erfassung der Belastungssituation in Bezug auf Wirkungen auf die Steroidgenese sinnvoll sein.



- Es soll längerfristig eine breit abgestützte Methode zur Beurteilung belasteter Fließgewässer anhand von Gewässerproben erarbeitet werden. Es müssen verschiedene Fragen geklärt werden (siehe oben, z.B. Methodenvvalidierung, Interpretierbarkeit der Daten, etc.), bevor eine Auswahl des bestgeeigneten Testsystems getroffen, sowie Empfehlungen für die Beurteilung von Oberflächengewässerproben für den Umweltvollzug gegeben werden können. Dabei soll eine internationale Zusammenarbeit angestrebt werden.

Trotz der hier erwähnten Einschränkungen und offenen Punkte zur Anwendung von Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität können aufgrund der bisherigen Erfahrungen einige konkrete Empfehlungen zur Durchführung dieser Tests und der Untersuchung von Gewässern gemacht werden.

Empfehlungen für eine Grobbeurteilung der Belastung von Östrogen aktiven Substanzen in Fließgewässern und ARA Ausläufen:

- Für die Erfassung östrogener Aktivität in Wasserproben sind 24 Stunden-Mischproben zu empfehlen, was in ARA-Ablaufproben gut praktikabel ist, da dort automatische Probenehmer vorhanden sind. Daher empfiehlt sich eine Beprobung der ARA-Ausläufe.
- Die Belastung der Gewässer soll aus den gemessenen Abwasserproben, anhand der Verdünnung des Abwassers im Gewässer (Abwasseranteil), extrapoliert werden.
- Es empfiehlt sich eine Probenaufbereitungsmethode zu wählen, die die Extraktion und Aufkonzentration von möglichst vielen, chemisch unterschiedlichen östrogen und antiöstrogen aktiven Substanzen erlaubt. (z.B. Festphasenanreicherung mit LiChrolut EN RP-18 Kartuschen).
- Die Datenauswertung mit EC_x und EEQs ist zu empfehlen, da so die Vergleichbarkeit der Resultate garantiert ist.
- Eine Grobbeurteilung anhand des chronischen Qualitätskriteriums von 0.4 ng/L und allenfalls mit Hilfe des 3-stufigen Beurteilungskonzeptes unter Verwendung des AA-EQS für 17 β -Estradiol (0.4 ng EEQ/L) soll weiter geprüft werden.



7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In diesem Bericht wurde ein erster Vorschlag für die Beurteilung der Wasserqualität mit Methoden für den effektebasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fliessgewässern erarbeitet. Die hier vorgestellten Methoden und das vorgeschlagene Vorgehen für die Beurteilung der durch kommunales Abwasser verursachten östrogenen Aktivität sind vielversprechend. Erste Messkampagnen haben gezeigt, dass mit den hier angewendeten *in vitro* Biotests eine östrogene Aktivität im Abwasser und belasteten Oberflächengewässern erfasst werden kann. *In vitro* Biotests scheinen u.a. auch als Ergänzung zu spurenanalytischen Untersuchungen der Wasserqualität geeignet und decken dabei zusätzliche Aspekte ab, welche mit einer rein spurenanalytischen Messung nicht erfasst werden können. Es gibt jedoch noch einige Unsicherheiten betreffend der Beurteilung der Wasserqualität und die eingesetzten Methoden sind noch nicht abschliessend validiert. Die Einsetzbarkeit als Ergänzung zu spurenanalytischen Methoden in der Praxis und für den Umweltvollzug ist mit dem vorhandenen Wissen noch nicht gegeben. Dazu müssen (i) die eingesetzten *in vitro* Biotests für die Untersuchung von Umweltproben noch vollständig validiert werden (z.B. im Rahmen des ISO-Zertifizierungs-Verfahrens), (ii) die Unterschiede zwischen den Tests bei der Interpretation der Ergebnisse besser verstanden und integriert werden, und (iii) der Vorschlag für die Einstufung der Wasserqualität nach den Gewässergüteklassen des MSK unter Einbezug einer breiteren Datenbasis überprüft und gegebenenfalls überarbeitet werden.

Als pragmatisches Vorgehen für die Grobbeurteilung abwasserbelasteter Gewässer wird empfohlen, die Östrogenität im ARA-Ablauf mit dem YES-Test zu messen und daraus die resultierende Gewässerbelastung über die Verdünnung im Fliessgewässer abzuschätzen. Eine solche Grobbeurteilungsmethode lässt sich auch auf weitere Testsysteme zur Messung anderer Effekte anwenden und stellt eine wichtige Ergänzung zu den gängigen im Vollzug verwendeten spurenanalytischen Methoden dar.

Um die Validierung und Standardisierung von *in vitro* Biotests zur Detektion östrogen und androgen aktiver Substanzen voranzubringen, ist das Oekotoxzentrum derzeit aktiv an der ISO-Zertifizierung eines solchen Testes beteiligt. Im Moment stehen im DIN Arbeitskreis „Hormonelle Wirkungen“ der hier angewendete YES nach Routledge Sumpter sowie andere YES Varianten zu Diskussion ebenso wie der ER-CALUX[®] und der E-Screen. Im ISO Arbeitskreis sollen auch die Resultate dieser Messkampagne einen Beitrag zur Erarbeitung eines internationalen zertifizierten Standardprotokolls (ISO/CEN) leisten. Das Oekotoxzentrum wird die Validierung und Implementierung dieser Tests in der Schweiz betreuen, weiterhin selbst an Ringversuchen mit ER-CALUX[®] und YES beteiligt sein und interessierte Labore bei der Implementierung dieser Tests unterstützen.

Die Erkenntnisse aus der *Messkampagne Östrogene* werden in die weitere Entwicklung eines praktikablen, von den Vollzugsbehörden anwendbaren Moduls Ökotoxikologie einfließen, d.h. einer breit abgestützten Biotest-basierten Methode zur Beurteilung der Wasserqualität.



8 Referenzen

- Abegglen C, Escher B, Hollender J, Koepke S, Ort C, Peter A, Siegrist H, von Gunten U, Zimmermann S, Koch M, Niederhauser P, Schärer M, Braun C, Gälli R, Junghans M, Bocker S, Moser R, Rensch D, 2009. Ozonung von gereinigtem Abwasser Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf. Eawag, Dübendorf. p. 80.
- Aerni HR, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbühler A, Marazuela MD, Peter A, Schönenberger R, Vögeli AC, Suter MJF, Eggen RIL, 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:688-696.
- Arditsoglou A, Voutsas D, 2008. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Pollution* 156:316-324.
- Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C, 1999. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11:737-747.
- Becker van Sloten K, Rossel D, Tarradellas J, 1999. Altlasten, Gefährdungsabschätzung: Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren auf Sickerwasser und Eluate von belasteten Standorten. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, BUWAL. p. 45.
- Blumberg R, 1988. Liquid-liquid extraction. London: Academic Press.
- Braunbeck T, Brauns A, Keiter S, Hollert H, Schwartz P, 2009. Fish populations under stress - the example of the Lower Neckar River (Fischpopulationen unter Stress - das Beispiel des Unteren Neckars). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 21:197-211.
- Bundesanstalt für Gewässerkunde, 1999. Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (HABAK-WSV). 2. überarbeitete Fassung ed: Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen. p. 49.
- Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2000. Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB-WSV). 2. überarbeitete Fassung ed: Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen. p. 294.
- Bundesanstalt für Gewässerkunde, 2009. BfG-Merkblatt "Ökotoxikologische Baggergutuntersuchung". Ökotoxikologische Untersuchung von Sedimenten, Eluaten und Porenwässern.
- Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft, 1996. 186. Verordnung des Bundesministers für Land- und Forstwirtschaft über die allgemeine Begrenzung von Abwasseremissionen in Fließgewässer und öffentliche Kanalisationen (AAEV).
- Bundesministerium der Justiz, 1997. Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV).



- Bundesministerium der Justiz, 2009. Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts (Wasserhaushaltsgesetz - WHG). p. 52.
- Bundi U, Langhans S, Weber C, 2008. The Swiss Modular Stepwise Procedure (Das Modul-Stufen-Konzept). Eawag Special Seminar.
- Burshell A, Stathis PA, Do Y, 1984. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 259:3450-3456.
- Caro E, Marcé RM, Borrull F, Cormack PAG, Sherrington DC, 2006. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25:143-154.
- Céspedes R, Petrovic M, Raldúa D, Saura Ú, Piña B, Lacorte S, Viana P, Barceló D, 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:697-708.
- Chèvre N, Eggen RIL, 2006. Intermediate report on module ecotoxicology, MSK Part 1 of Phase 2. Eawag, Dübendorf.
- Colosi JC, Kney AD, 2011. A yeast estrogen screen without extraction provides fast, reliable measures of estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30:2261-2269.
- Connolly L, Ropstad E, Verhaegen S, 2011. In vitro bioassays for the study of endocrine-disrupting food additives and contaminants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30:227-238.
- De Boever P, Demaré W, Vanderperren E, Cooreman K, Bossier P, Verstraete W, 2001. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. *Environmental Health Perspectives* 109:691-697.
- Earl Gray Jr L, Kelce WR, Wiese T, Tyl R, Gaido K, Cook J, Klinefelter G, Desaulniers D, Wilson E, Zacharewski T, Waller C, Foster P, Laskey J, Reel J, Giesy J, Laws S, McLachlan J, Breslin W, Cooper R, Di Giulio R, Johnson R, Purdy R, Mihaich E, Safe S, Sonnenschein C, Welshons W, Miller R, McMaster S, Colborn T, 1997. Endocrine Screening Methods Workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology* 11:719-750.
- EG, 2000. RICHTLINIE 2000/60/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften: Europäisches Parlament und Rat der europäischen Union.
- Escher B, Bramaz N, Richter M, Rutishauser S, 2007a. Überwachung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials durch Mikroverunreinigungen in Abwasserreinigungsanlagen



- und Fließgewässern mittels einer wirkmechanismenbasierten ökotoxikologischen Testbatterie, Schlussbericht, Teil 1, zuhanden des BAFU, Strategie MicroPoll. Eawag, Dübendorf. p. 79.
- Escher B, Chèvre N, 2004. Ökotoxikologische Untersuchung von Wasserproben aus der Glatt, April bis Oktober 2004 - Eine Untersuchung im Rahmen des Modulstufenkonzepts, Modul Ökotoxikologie. Eawag, Dübendorf.
- Escher B, Ort C, Rutishauser S, Richter M, Vermeirssen E, 2007b. Passive Probenahme und Ökotoxikologische Testbatterie für die Überwachung des ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials durch Mikroverunreinigungen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließgewässern, Schlussbericht, Teil 2, zuhanden des BAFU, Strategie MicroPoll. Eawag, Dübendorf. p. 39.
- Escher BI, Bramaz N, Mueller JF, Quayle P, Rutishauser S, Vermeirssen ELM, 2008a. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *Journal of Environmental Monitoring* 10:612-621.
- Escher BI, Bramaz N, Quayle P, Rutishauser S, Vermeirssen ELM, 2008b. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. *Journal of Environmental Monitoring* 10:622-631.
- EU, 2010. Chemicals and the Water Framework Directive: Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Draft 2010. Draft version 6.0, 23 February 2010.
- Floehr T, Maletz S, Hollert H, 2011. Abschlussbericht Modulstufenkonzept H295R Steroidgenese Assay - Modul Ökotoxikologie, Messkampagne zur Evaluation von hormonaktiven Substanzen. RWTH Aachen, Institut für Umweltforschung, Aachen.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babaï D, Portier CJ, McDonnell DP, 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143:205-212.
- Gälli R, Ort C, Schärer M, 2009. Mikroverunreinigungen in den Gewässern. Bewertung und Reduktion der Schadstoffbelastung aus der Siedlungsentwässerung. Umwelt-Wissen: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 103.
- Götz CW, Kase R, Hollender J, 2011. Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU: Eawag, Dübendorf. p. 108.
- Götz CW, Kase R, Kienle C, Hollender J, 2010a. Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser - Kombination von Expositions- und ökotoxikologischen Effektdaten. *Gas, Wasser, Abwasser* 7:575-585.



- Götz CW, Singer H, Longrée P, Hollender J, 2010b. Micropoll Messkampagne - Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Screening von organischen Spurenstoffen in kommunalen Kläranlagen. Eawag, Dübendorf. p. 16.
- Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Zhang X, Hecker M, Higley EB, Sanderson JT, Yu RMK, Wu RSS, Giesy JP, 2006. The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:293-305.
- Gracia T, Jones PD, Higley EB, Hilscherova K, Newsted JL, Murphy MB, Chan AKY, Zhang X, Hecker M, Lam PKS, Wu RSS, Giesy JP, 2008. Modulation of steroidogenesis by coastal waters and sewage effluents of Hong Kong, China, using the H295R assay. *Environmental Science and Pollution Research* 15:332-343.
- Greenwood R, Mills GA, Roig B, 2007. Introduction to emerging tools and their use in water monitoring. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26:263-267.
- Grund S, Higley E, Schönenberger R, Suter MJ, Giesy JP, Braunbeck T, Hecker M, Hollert H, 2011. The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by *in vitro* bioassays and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research* 18:446-460.
- He C, Long Y, Pan J, Li K, Liu F, 2007. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70:133-150.
- Hecker M, Coady K, Jones P, Giesy J, Newsted J, 2007a. Standard Operating Procedure "Culturing of the H295R human adrenocortical carcinoma cell line (ATCC CLR-2128)" (Version 3; May 30, 2007). Aquatic Toxicology Laboratory, University Research Containment Facility, Michigan State University, USA.
- Hecker M, Giesy JP, 2008. Novel trends in endocrine disruptor testing: The H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390:287-291.
- Hecker M, Hollert H, Cooper R, Vinggaard A, Akahori Y, Murphy M, Nellemann C, Higley E, Newsted J, Laskey J, Buckalew A, Grund S, Maletz S, Giesy J, Timm G, 2011. The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. *Environmental Science and Pollution Research* 18:503-515.
- Hecker M, Hollert H, Cooper R, Vinggaard AM, Akahori Y, Murphy M, Nellemann C, Higley E, Newsted J, Wu R, Lam P, Laskey J, Buckalew A, Grund S, Nakai M, Timm G, Giesy J, 2007b. The OECD validation program of the H295R Steroidogenesis Assay for the identification of *in vitro* inhibitors and inducers of testosterone and estradiol production. Phase 2: Inter-laboratory pre-validation studies. *Environmental Science and Pollution Research* 14:23-30.
- Hecker M, Laskey J, Angela Buckalew A, Jones P, Newsted J, Giesy J, 2007c. Standard Operating Procedure "Exposure of H295R human adrenocortical carcinoma cells to



- assess the effects of chemicals on testosterone and 17 β -estradiol production (ATCC CLR-2128)" (Version 2; April 23, 2007) Aquatic Toxicology Laboratory, University Research Containment Facility, Michigan State University, USA.
- Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, Giesy JP, 2006. Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. Toxicology and Applied Pharmacology 217:114-124.
- Homazava N, 2009. Organic pollutants in water. Influence of the sample preparation and extraction method on the chemical analysis/ bioassay results.: Oekotoxzentrum Eawag/EPFL, Dübendorf.
- Houtman CJ, Booij P, Van Der Valk KM, Van Bodegom PM, Van Den Ende F, Gerritsen AAM, Lamoree MH, Legler J, Brouwer A, 2007a. Biomonitoring of estrogenic exposure and identification of responsible compounds in bream from Dutch surface waters. Environmental Toxicology and Chemistry 26:898-907.
- Houtman CJ, Leonards PEG, Kapiteijn W, Bakker JF, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J, Klammer HJC, 2007b. Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts. Science of The Total Environment 386:134-144.
- Houtman CJ, Sterk SS, van de Heijning MPM, Brouwer A, Stephany RW, van der Burg B, Sonneveld E, 2009. Detection of anabolic androgenic steroid abuse in doping control using mammalian reporter gene bioassays. Analytica Chimica Acta 637:247-258.
- Houtman CJ, Van Houten YK, Leonards PEG, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J, 2006. Biological validation of a sample preparation method for ER-CALUX bioanalysis of estrogenic activity in sediment using mixtures of xeno-estrogens. Environmental Science and Technology 40:2455-2461.
- Hürlimann J, Niederhauser P, 2007. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Kieselalgen Stufe F (flächendeckend). Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. p. 43.
- Hyötyläinen T, 2009. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. Analytical and Bioanalytical Chemistry 394:743-758.
- ICCVAM, 2003. ICCVAM Review of *In Vitro* Endocrine Disruptor Screening Assays. Research Triangle Park, NC 27709: National Toxicology Program.
- International Organization for Standardization, 2000. Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. EN ISO 13829 (2000) and 38415-3 (1996).
- International Organization for Standardization, 2003. Water quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. ISO 5667-3:2003



- International Organization for Standardization, 2005. Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome test (Ames test). ISO 16240:2005. p. 20.
- Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M, Tyler CR, van Aarle R, Santos E, Brighty G, 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114 Suppl 1:32-39.
- Jonkers N, Kohler HPE, Dammshäuser A, Giger W, 2009. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environmental Pollution* 157:714-723.
- Känel B, Göggel W, Weber C, 2009. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. *Wasserpflanzen: Anleitung zur Probenahme*. Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 60.
- Kase R, Kunz P, Gerhardt A, 2009. Identification of reliable test procedures to detect endocrine disruptive and reproduction toxic effects in aquatic ecosystems [Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen]. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 21:339-378.
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW, 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8897-8901.
- Kienle C, Kase R, Werner I, 2011. Evaluation of Bioassays and Wastewater Quality - *In vitro* and *in vivo* Bioassays for the Performance review in the Project "Strategy Micropoll". Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Knacker T, 2007. Möglichkeiten der ökotoxikologischen Bewertung für Einzelstoffe und Gemische. IKS-Workshop Mikroverunreinigungen aus der Siedlungswasserwirtschaft, Bonn.
- Körner W, Hanf V, Schuller W, Zwirner M, Hagenmaier H, 1999. Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien. Projekt Umwelt und Gesundheit PUG U 95 004. p. 104.
- Kot A, Zabiegała B, Namieśnik J, 2000. Passive sampling for long-term monitoring of organic pollutants in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 19:446-459.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN, 2009. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25:53-64.
- Kunz PY, Fent K, 2009. Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - An analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234:77-88.
- Kunz PY, Galicia HF, Fent K, 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences* 90:349-361.



- Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN, 2002. The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence. *Critical Reviews in Toxicology* 32:113-132.
- Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, Van der Burg B, Murk AJ, 2002a. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using *in vitro* reporter gene assays. *Science of the Total Environment* 293:69-83.
- Legler J, Van Den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, Van Der Saag PT, Vethaak AD, Van Der Burg B, 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences* 48:55-66.
- Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van Der Burg B, 2002b. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environmental Science and Technology* 36:4410-4415.
- Lesche H, Sbieschni G, Kayser G, 2010. Wann gelten Starkverschmutzerzuschläge? Grenzwerte und Einflussgrößen berücksichtigen. *wwt Wasserwirtschaft Wassertechnik* 11/12:22-25.
- Leusch FDL, 2008. Tools to detect estrogenic activity in environmental waters. *Global Water Research Coalition*. p. 86.
- Leusch FDL, De Jager C, Levi Y, Lim R, Puijker L, Sacher F, Tremblay LA, Wilson VS, Chapman HF, 2010. Comparison of five *in vitro* bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. *Environmental Science and Technology* 44:3853-3860.
- Li W, Seifert M, Xu Y, Hock B, 2004. Comparative study of estrogenic potencies of estradiol, tamoxifen, bisphenol-A and resveratrol with two *in vitro* bioassays. *Environment International* 30:329-335.
- Liechti P, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. *Chemisch-Physikalische Erhebungen, Nährstoffe. Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern*. p. 44.
- Liechti P, Sieber U, von Blücher U, Willi HP, Bundi U, Frutiger A, Hütte M, Peter A, Göldi C, Kupper U, Meier W, Niederhauser P, 1998. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer in der Schweiz, Modul-Stufen-Konzept. In: Bundesamt für Umwelt WuL, Bern, editor. *Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr 26*.
- Liška I, 2000. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - Historical development and overview. *Journal of Chromatography A* 885:3-16.
- Lord H, Pawliszyn J, 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* 885:153-193.
- Madrid Y, Zayas ZP, 2007. Water sampling: Traditional methods and new approaches in water sampling strategy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26:293-299.



- Margot J, Magnet A, Thonney D, Chèvre N, De Alencastro LF, Rossi L, 2011. Traitement des micropolluants dans les eaux usées - Rapport final sur les essais pilotes à la STEP de Vidy (Lausanne). Ville de Lausanne, Lausanne.
- Murk AJ, Legler J, Van Lipzig MMH, Meerman JHN, Belfroid AC, Spenkeliink A, Van der Burg B, Rijs GBJ, Vethaak D, 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. Environmental Toxicology and Chemistry 21:16-23.
- Nativelle-Serpentini C, Richard S, Séralini G-E, Sourdain P, 2003. Aromatase activity modulation by lindane and bisphenol-A in human placental JEG-3 and transfected kidney E293 cells. Toxicology in Vitro 17:413-422.
- NFP 50, 2008. Nationales Forschungsprogramm 50 - „Hormonaktive Stoffe“. Konsensplattform „Hormonaktive Stoffe in Abwasser und Gewässern“ - Schlussdokument.
- NICEATM I, 2002. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Transcriptional Activation Assays, Background Review Document. National Institute of Environmental Health Sciences. p. 464.
- O'Neill A, 2008. Deliverable C1.2: Validation and harmonisation of analytical methodology for research laboratories: Oestrogens in sewage treatment effluents. NORMAN - Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio monitoring of emerging environmental pollutants: UK Environment Agency.
- OECD, 2011. OECD Guidelines for the testing of chemicals 456: H295R Steroidogenesis Assay. p. 21.
- Ort C, Siegrist H, Hosbach H, Studer C, Morf L, Scheringer M, 2007. Mikroverunreinigungen. Nationales Stoffflussmodell. Gas, Wasser, Abwasser 87:853-859.
- Paumann R, Vetter S, 2003. Hormonwirksame Stoffe in Österreichs Gewässern – ein Risiko? Ergebnisse aus drei Jahren Forschung. In: Austrian Research Cooperation on Endocrine Modulators, editor.: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien.
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Grønhaug Halvorsen T, 2000. Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A 902:91-105.
- Pfluger P, Wasserrab B, O'Brien E, Prietz A, Spengler P, Schneider C, Heussner T, Schmid T, Knörzer B, Metzger JW, Dietrich DR, 2001. Entwicklung und Validierung von *in vitro*-Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen: Chemisch analytische Überprüfung und biologischer Nachweis von potentiell endokrin wirksamen Fremdstoffen in Kläranlagenausläufen bzw. Vorflutern. BWPLUS (1998 – 2001): Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS). p. 174.
- Ratte M, Ratte HT, 2009. Beurteilung des Effektes von Abwasserbehandlung mittels Ozonung anhand von Toxizitätsparametern aus *in vitro*- und *in vivo*-Biotests. Daten aus Projekt



„MicroPoll“ (Ozonung von gereinigtem Abwasser), Pilotversuch Regensdorf, Teil: „Effektbasierte Testsysteme mit Aufkonzentrierung“ und „Standardisierte Testverfahren“.

- Routledge EJ, Sumpter JP, 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:241-248.
- Rutishauser BV, Pesonen M, Escher BI, Ackermann GE, Aerni HR, Suter MJF, Eggen RIL, 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:857-864.
- Schager E, Peter A, 2004. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Fische Stufe F (flächendeckend). Vollzug Umwelt Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr 44: Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft BUWAL, Bern. p. 65.
- Schultis T, Metzger JW, 2004. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57:1649-1655.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Hartmann G, Ott B, 2002. Wirkungen von Umweltöstrogenen auf Fische, Monitoring-Untersuchungen an Oberflächengewässern und Kläranlagen, Teilbericht III zum Forschungsvorhaben 77e040100. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Abteilung Gewässerökologische Forschung.
- Schweigert N, Eggen RIL, Escher BI, Burkhardt-Holm P, Behra R, 2001. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer in der Schweiz - Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie. Eawag, Dübendorf. p. 29.
- Schweizerischer Bundesrat, 1998. Gewässerschutzverordnung (GSchV) vom 28. Oktober 1998 (Stand am 1. August 2011). p. 68.
- Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JAC, Brouwer A, van der Burg B, 2005. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicological Sciences* 83:136-148.
- Stalter D, Magdeburg A, Wagner M, Oehlmann J, 2011. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Research* 45:1015-1024.
- Stalter D, Magdeburg A, Weil M, Knacker T, Oehlmann J, 2010. Toxication or detoxication? *In vivo* toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Research* 44:439-448.
- Stucki P, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Makrozoobenthos Stufe F. Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 61.
- Stuer-Lauridsen F, Kjølholt J, Høibye L, Hinge-Christensen S, Ingerslev F, Hansen M, Andersen Krogh K, Andersen HR, Halling-Sørensen B, Hansen N, Køppen B,



- Bjerregaard P, Frost B, 2005. Survey of Estrogenic Activity in the Danish Aquatic Environment. In: Agency DMotE-EP, editor. Environmental Project Nr 977 2005, Miljøprojekt.
- Van der Linden SC, Heringa MB, Man HY, Sonneveld E, Puijker LM, Brouwer A, Van der Burg B, 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science and Technology* 42:5814-5820.
- Vermeirssen ELM, Burki R, Joris C, Peter A, Segner H, Suter MJF, Burkhardt-Holm P, 2005. Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:2226-2233.
- Vermeirssen ELM, Eggen RIL, Escher BI, Suter MJF, 2008. Estrogens in Swiss rivers and effluents - Sampling matters. *Chimia* 62:389-394.
- Vermeirssen ELM, Suter MJF, Burkhardt-Holm P, 2006. Estrogenicity patterns in the Swiss midland river Lützelrmurg in relation to treated domestic sewage effluent discharges and hydrology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2413-2422.
- Vignati DAL, Valsecchi S, Polesello S, Patrolecco L, Dominik J, 2009. Pollutant partitioning for monitoring surface waters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28:159-169.
- Villeneuve DL, Blankenship AL, Giesy JP, 2000. Derivation and application of relative potency estimates based on *in vitro* bioassay results. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2835-2843.
- Voutsas D, Hartmann P, Schaffner C, Giger W, 2006. Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environmental Science and Pollution Research* 13:333-341.
- Vrana B, Vermeirssen ELM, Allan IJ, Kohoutek J, Kennedy K, Mills GA, Greenwood R, 2010. Passive sampling of emerging pollutants in the aquatic environment: state of the art and perspectives - A position paper of the expert group of the NORMAN network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants.
- Wagner M, Oehlmann J, 2009. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research*:1-9.
- Williams M, Woods M, Kumar A, Ying GG, Shareef A, Karkkainen M, Kookana R, 2007. Endocrine Disrupting Chemicals in the Australian Riverine Environment: A Pilot Study on Estrogenic Compounds. A joint project between CSIRO and Land & Water Australia: Land & Water Australia, Canberra, Australia. p. 105.
- Wilson VS, Bobseine K, Gray Jr LE, 2004. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicological Sciences* 81:69-77.



- Wozei E, Hermanowicz SW, 2006. Developing a yeast-based assay protocol to monitor total oestrogenic activity induced by 17 β -oestradiol in activated sludge supernatants from batch experiments. *Water SA* 32:345-354.
- Ying GG, Kookana RS, Ru YJ, 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28:545-551.
- Zhao Z, Fang Y, Love NG, Knowlton KF, 2009. Biochemical and biological assays of endocrine disrupting compounds in various manure matrices. *Chemosphere* 74:551-555.



9 Verzeichnisse (Tabellen und Abbildungen)

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick über die einzelnen Elemente des Beurteilungskonzeptes für Östrogen aktive Substanzen, (verändert nach Götz et al., 2011).....	8
Abb. 2: Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und EC ₅₀ . ♦ Kontrolle, ♦ Behandlung, * signifikante Unterschiede zur Kontrolle (Abb. oben). Die unteren Abbildungen zeigen die Ableitung von TEQs durch den Vergleich der Effektkonzentrationen einer Umweltprobe mit jenen einer Referenzsubstanz, z.B. E2	19
Abb. 3: YES: Einfluss der Kurvenhöhen auf die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen dem 17β-Estradiol-Standard und den ARA- und Oberflächengewässerproben von Probenahmestelle A. Toxizitätsparameter: EC ₁₀ , EC ₅₀ , NOEC und LOEC.	20
Abb. 4: ER-CALUX®: Einfluss der Kurvensteigung auf die Dosis-Wirkungsbeziehung des 17β-Estradiol-Standards und der Proben von ARA A und Oberflächengewässer A. Toxizitätsparameter: EC ₁₀ , EC ₅₀ . Gestrichelte Linien: Kurvensteigung der Proben, ausgezogene Linie: Kurvensteigung des E2-Standards.	21
Abb. 5: Verteilung der 17β-Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) anhand der 3-skaligen Güteklassenverteilung von grün (gut) nach orange (unbefriedigend bis schlecht). Pfeile deuten an, in welchem Konzentrationsbereich EEQs aufgrund der Bestimmungsgrenzen (LOQ, • o. •) der jeweiligen Methodik zuverlässig bestimmt werden können, auf Basis von chemischer Analytik (Estron, E1; 17β-Estradiol, E2; 17α-Ethinylestradiol, EE2; Bisphenol A, BPA; Nonylphenol, NP mit Äquivalenzfaktoren (vgl. Tab. 17) auf EEQs umgerechnet) und biologischer Analytik (YES und ER-CALUX®).	26
Abb. 6: (A) Korrelation der im YES und ER-CALUX® ermittelten EEQ-Werte (ng/L) (r ² = 0.71 (log Daten), p<0.0001). (B) Vergleich der im YES und ER-CALUX® ermittelten EEQ-Werte mittels einer 1:1-Linie.	28
Abb. 7: Vergleich von chemischer Analytik und Biotests für verschiedene ARA-Zu- und ARA-Ablaufproben und Oberflächengewässerproben vor und nach Einleitung des ARA-Abwassers. Dargestellt sind die in den Biotests gemessenen 17β-Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) und die mittels Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) (siehe auch Tab. 17) aus den Ergebnissen der analytischen Messungen berechneten testspezifischen EEQs für YES und ER-CALUX®. MW ± 95% Konfidenzintervall.	29
Abb. 8: (A) Korrelation der im YES und mit chemischer Analytik ermittelten EEQ Werte (ng/L) (r ² =0.82 (log Daten), p<0.0001) im Vergleich zu (B) Korrelation der im ER-CALUX® und mit chemischer Analytik ermittelten EEQ-Werte (ng/L) (r ² =0.55 (log Daten), p<0.0001). Die eingezeichneten Linien entsprechen der 1:1 Linie.	30
Abb. 9: Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept für die Belastung von Oberflächengewässern mit Östrogen aktiven Substanzen (Grafik rechts: Eawag)	33
Abb. 10: Schematische Darstellung des YES (nach Routledge und Sumpter (1996).	58
Abb. 11: Mechanismus der Östrogen-Rezeptor (ER)-vermittelten Antwort im ER-CALUX® (Schema von BDS zur Verfügung gestellt).....	59



- Abb. 12: Steroidogenese-Pfad im H295R. Hormone (fett), Pfeile zeigen in Syntheserichtung. Die Geschlechts-hormonbildung ist schwarz eingrahmt (aus Hecker und Giesy, 2008). Rote Pfeile zeigen Orte der Aromatasehemmung bzw. -induktion. 59
- Abb. 13: Zellvitalität der H295R Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (ein biologisches Replikat); NK = Negativkontrolle = 100%; n/a = nicht getestet (aus Floehr et al., 2011). 79
- Abb. 14: Relative Induktion der Produktion von Estradiol in H295R-Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten + SEM (sechs technische Replikate); Negativkontrolle = 1; n/a = nicht getestet; Statistische Analyse: One Way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc Test, a = Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle, b = Signifikanter Unterschied zwischen ARA und OG; $p \leq 0.05$ (aus Floehr et al., 2011). 80
- Abb. 15: Relative Induktion der Produktion von Testosteron in H295R-Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten + SEM (sechs technische Replikate); Negativkontrolle = 1; n/a = nicht getestet; Statistische Analyse: One Way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc Test, a = Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle, b = Signifikanter Unterschied zwischen ARA und OG; $p \leq 0.05$ (aus Floehr et al., 2011). 81



9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beurteilungskriterien der angewandten <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.....	16
Tab. 2: Arbeitsschritte für die angewendeten <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.....	17
Tab. 3: Vorschläge für chronische Umweltqualitätskriterien (AA(Annual average)-EQS, CQK) der EU Working Group E (WG E; Stand: 11.2011) und des Schweizerischen Oekotoxenzentrums (Stand 11.2011).....	24
Tab. 4: Vorläufiger Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für Östrogen aktive Substanzen aus kommunalem Abwasser (angepasst nach Götz et al. (2010a) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).	25
Tab. 5: Vorläufiger Vorschlag für eine Einteilung in verschiedene Wasserqualitätsklassen anhand der gemessenen Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ) Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium (AA-EQS) für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).	25
Tab. 6: Vergleich der aus Biotests ermittelten Wasserqualitätsklassen an 13 Probenahmestellen für Östrogen aktive Substanzen im Oberflächengewässer ober- und unterhalb der Einleitstelle der ARA. Wassergüteklassen: grün: Qualitätskriterium eingehalten, gelb: im Bereich des Qualitätskriteriums, orange: Qualitätskriterium überschritten. Die Oberflächengewässer unterhalb der Einleitstelle der ARA werden zusätzlich über die EEQ-Werte der Abläufe sowie die jeweiligen Verdünnungsfaktoren beurteilt.	35
Tab. 7: Eignung verschiedener <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen für den Vollzug.	37
Tab. 8: Vergleich von Extraktionsmethoden für flüssige Proben (aus (Hyötyläinen, 2009)	56
Tab. 9: Überblick über die Arbeitsschritte der für die chemische und biologische Analytik von Östrogen aktiven Substanzen verwendeten Probenaufbereitungsmethoden.	57
Tab. 10: Arbeitsschritte für die angewendeten <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.....	60
Tab. 11: Unterschiede verschiedener <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen	62
Tab. 12: Geräteliste zur Durchführung des ER-CALUX®-Tests (zur Verfügung gestellt von BDS)	65
Tab. 13: Geräteliste zur Durchführung des YES -Tests (Oekotoxenzentrum)	66
Tab. 14: Wasserprobenahme und Probenlagerung für <i>in vitro</i> Biotests und chemische Analytik zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.....	69
Tab. 15: Datenauswertung der angewendeten <i>in vitro</i> Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.....	73
Tab. 16: Spezifikationen zur chemischen Analytik von Östrogen aktiven Substanzen.....	74



Tab. 17: 17 β -Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) für E1, E2, EE2, BPA und NP	74
Tab. 18: Vergleich der angewendeten <i>in vitro</i> Biotests und der chemischen Analytik zum Nachweis Östrogen aktiver Substanzen. ARA: Abwasserreinigungsanlage, OG-N: OG nach ARA, E2: 17 β -Estradiol, T: Testosteron.....	76
Tab. 19: Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) (ng/L) im ER-CALUX [®] . MW, n = 3.	78
Tab. 20: Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) (ng/L) im Yeast Estrogen Screen. MW $\pm$ SD, n = 3.....	78
Tab. 21: Wiederfindungsraten für die in der chemischen Analytik (mit LC-MS/MS) gemessenen Östrogene.....	82
Tab. 22: Konzentrationen verschiedener Östrogene (ng/L). Die Substanzen wurden mit LC-MS/MS gemessen. MW $\pm$ SD,	82
Tab. 23: Positivbefunde der analysierten Substanzen in den untersuchten Kläranlagenproben (aus Götz et al., 2010b).....	84
Tab. 24: Auflistung aller analysierten Substanzen in den untersuchten Kläranlagenproben (inkl. Substanzen, die nicht gefunden wurden) (aus Götz et al., 2010b).	85

**Anhang 1: Details zu den Elementen des Beurteilungskonzeptes****Probenaufbereitung****Tab. 8: Vergleich von Extraktionsmethoden für flüssige Proben (aus (Hyötyläinen, 2009))**

Typical conditions	LLE	SPE	μ *SPE	SPME	SBSE	SDE	MASE ^a
Sample size	1–1000mL	1–100mL	10–100 μ L	0.5–20mL	1–100mL	1–100mL	0.1–100mL
Extraction efficiency	Quantitative	Quantitative	Quantitative	Not quantitative	Not quantitative–quantitative	Not quantitative	Not quantitative
Enhancement factor	Low	Moderate	Moderate	High	High	High	High
Suitability for							
very volatile	++	++	+++	++++	+++	–	++
semivolatile	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
non-volatile	+++	+++	+++	+ ^b –+++ ^c	+ ^b –+++ ^c	+++	+++
nonpolar	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
semipolar	++	+++	+++	+	++	++	+++
polar	++	+++	+++	–	–	++	++
ionisable	++	+++	+++	+	+	+++	+++
Simplicity	High	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
Ruggedness/repeatability	Moderate	Good	Good	Moderate	Good	Moderate	Good
Extraction time	2–30min	2–10min	2–10min	10–90min	90–720min	10–120min	10–120min
Solvent volume	10–200mL	1–5mL	0.01–0.5mL	–	–	0.001–0.005mL	0.01–0.5mL
Key factors to be optimised	Type of solvent, ion strength, pH, solvent volume	Type of adsorbent, clean-up, elution solvent and volume	Type of adsorbent, clean-up, elution solvent and volume	Sampling mode, type and thickness of the coating, time, pH, ionic strength, agitation, temperature, desorption conditions, calibration procedure	Sampling mode, type of coating, time, temperature, pH, ion strength, desorption conditions, calibration procedure	Volume of the droplet, type of solvent, ion strength, pH, extraction time, agitation, size of drop, shape of needle tip, time, temperature	Type of solvent, solvent volume, ion strength, pH, extraction time
Cost per analysis	Low	Moderate	Moderate	Low	Low	Low	Low
Cost of instrumentation	Low	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Low	Low
Automation	Low	High	High	High	Moderate	Low	Moderate–high

Volatiles, <C₆; semivolatile, C₁₀–C₃₀; non-volatile>C₃₁; nonpolar, log K_{ow}>5; polar, log K_{ow}<2^a Including extractions with hollow fibres, membrane bags, and flat-sheet membrane modules^b With thermal desorption^c With liquid desorption



Tab. 9: Überblick über die Arbeitsschritte der für die chemische und biologische Analytik von Östrogen aktiven Substanzen verwendeten Probenaufbereitungsmethoden.

	Festphasenextraktion für chemische Analytik (nach Suter und Schönenberger)	Festphasenextraktion für Biotests (nach Escher et al., 2008b)
Allgemeine Informationen		
Probentyp	Wasserproben	Wasserproben
Probenvolumina	1000 ml Fließgewässerproben 500 ml Abwasserablauf 250 ml Abwasserzulauf	1000 ml Fließgewässerproben 500 ml Abwasserablauf 200 ml Abwasserzulauf
Leerprobe	1000 ml Reinstwasser	1000 ml Reinstwasser
Probenvorbereitung		
Filtration	Ja, z.B. mit Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm)	Ja, z.B. mit Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm)
Ansäuerung	ja, mit HCl auf pH 3	ja, mit HCl auf pH 3
Addierung von Isotopenmarkierter interner Mischstandardlösung (IS)	30 ng von EE2-D4, E2-13C2, E1-D4, BPA-D16 und NP-13C6 zu jeder Probe	Nein, zur Kontrolle der Wiederfindung in der SPE Standardadditionen möglich
Probenaufbereitung		
Anreicherung	Festphasenextraktion (SPE)	Festphasenextraktion (SPE)
SPE Kartuschen	LiChrolut EN RP-18 (100 mg LiChrolut EN unten, 200 mg LiChrolut RP 18 oben)	LiChrolut EN RP-18 (100 mg LiChrolut EN unten, 200 mg LiChrolut RP 18 oben)
Konditionierung	6 ml Hexan 2 ml Aceton 6 ml Methanol 10 ml Wasser (pH 3.0)	2 ml Hexan 2 ml Aceton 6 ml Methanol 6 ml Wasser (pH 3.0)
Waschen	8 ml Methanol/Wasser (70:30, v/v) 6 ml Acetonitril/Wasser (30:70, v/v)	Nein, nur Auffüllen der Kartusche mit Wasser (pH 3.0)
Elution	4 ml Aceton	4 ml Aceton 1 ml Methanol
Einengen	mit N ₂ auf ca. 100 µl einengen	mit N ₂ auf ca. 500 µl einengen, dann auf 1000 µl mit Ethanol auffüllen
Aufkonzentrierungsfaktor	5000-fach Fließgewässerproben 2500-fach Abwasserablauf 1250-fach Abwasserzulauf	1000-fach Fließgewässerproben 500-fach Abwasserablauf 200-fach Abwasserzulauf
Reinigung und Lagerung des Probenextraktes		
Sorbent	Mini-Kieselgel-Säulen (1.00 ± 0.01 g)	Nein
Auftragen der Probe	100 µl der Probe + 2x 0.2ml Hexan/Aceton (60:40, v/v)	
Elution	7.1 ml Hexan/Aceton (60:40, v/v)	
Abdampfen	bis zur Trockene, mit 200 µl Ethanol aufgefüllt	
Lagerung	Dunkel, bei -20°C	Dunkel, bei -20°C

Beschreibung der ausgewählten Biotests

Rezeptorbindungstests

Rezeptorbindungstests können beispielsweise mit Säugerzellen oder Hefezellen durchgeführt werden. Entweder besitzt die Zelle bereits natürlicherweise einen Östrogenrezeptor (ER; einige Säuger-Zelllinien), oder die DNA-Sequenz des menschlichen Östrogenrezeptors α (hER α) wurde in das Genom der Hefe- oder Säugerzelle integriert, so dass diese Zellen den Rezeptor selbst produzieren können. Substanzen, aus beispielsweise einer Wasserprobe, die die Zellwand bzw. Zellmembran passieren können, binden an den ER, sofern sie eine östrogene Aktivität besitzen. So entsteht ein aktivierter Komplex, der die Ablesung eines Reporter-Gens auslöst. Dieses Gen bewirkt die Herstellung des Enzyms, welches ins umgebende Medium ausgeschieden wird und bei östrogenen Aktivität zu einem messbaren Farbumschlag bzw. erhöhter Lumineszenz des Mediums führt.

Rezeptorbindungstest mit Hefezellen

Der YES ist ein genetisch verändertes Reporter-Gen-Testsystem mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), das durch die Bindung östrogenen Substanzen an den hER α mögliche östrogene Aktivitäten einer Probe detektieren kann (Routledge und Sumpter, 1996). Die Bindung einer Substanz an den hER α aktiviert den Rezeptor, der aktivierte Komplex führt zur Ablesung des Reporter-Gens (*Lac-Z*), dies führt zur Bildung des Enzyms β -Galactosidase. Das Enzym wird ins umgebende Medium ausgeschieden und wandelt das gelbe Substrat CPRG (Chlorphenol-rot- β -D-galactopyranosid) zu einem roten Produkt (CPR) um. Der Farbumschlag kann mit einem Spektrophotometer gemessen werden (Routledge und Sumpter, 1996). Abb. 10 verdeutlicht das Prinzip des Tests.

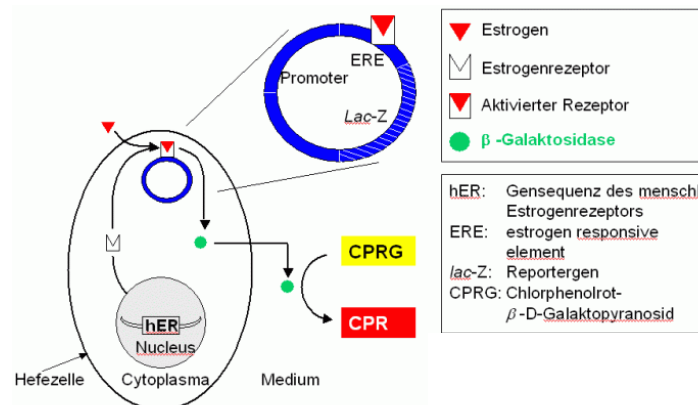


Abb. 10: Schematische Darstellung des YES (nach Routledge und Sumpter (1996).

Es existieren verschiedene andere hefebasierte Testsysteme, die auch nach diesem Prinzip arbeiten und sich geringfügig bzgl. ihrer Sensitivität und Robustheit unterscheiden. Diese Unterschiede können einerseits auf die verschiedenen benutzten Hefestämme zurückgeführt werden, andererseits auf Unterschiede in den Protokollen. Es können zusätzliche Schritte eingebaut werden um den Test schneller und sensibler zu machen. Beispielsweise bewirkt die Zugabe des Enzyms Lyticase eine Durchlöcherung der Zellwand, so dass das produzierte Enzym β -Galactosidase schneller in das Medium gelangt, um dort einen Farbumschlag zu bewirken (z.B. Schultis und Metzger, 2004). Auch Anpassungen für eine Analyse von nicht aufkonzentrierten/nativen Umweltproben existieren in diesem Testsystem (z.B. Wagner und Oehlmann, 2009).



Rezeptorbindungstest mit menschlichen Zelllinien

Bei den ER-CALUX[®] Zellen handelt es sich um eine genetisch veränderte, menschliche Osteosarcom-Zelllinie (U2OS). Gemessen wird auch hier die Bindung Östrogen aktiver

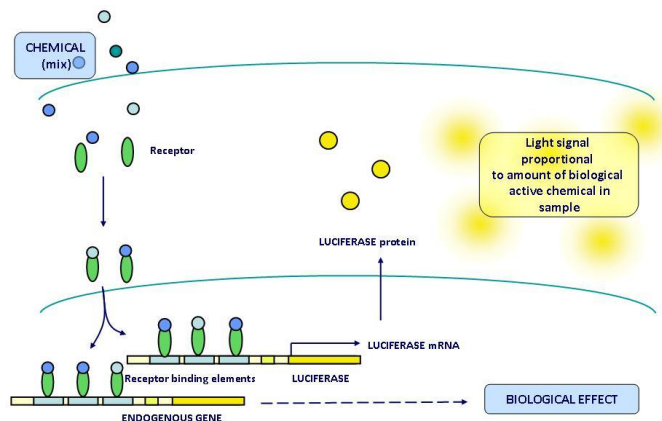


Abb. 11: Mechanismus der Östrogen-Rezeptor (ER)-vermittelten Antwort im ER-CALUX[®] (Schema von BDS zur Verfügung gestellt).

Substanzen an den hER α . Hier dient das Gen für das Enzym Luziferase als Reportergen. Die resultierende Luziferase-Aktivität, und damit das Ausmass an Östrogenität, kann anschliessend nach Zugabe des Substrats Luciferin mittels eines Lumineszenz-Messgerätes (Luminometer) quantifiziert werden (siehe Abb. 11).

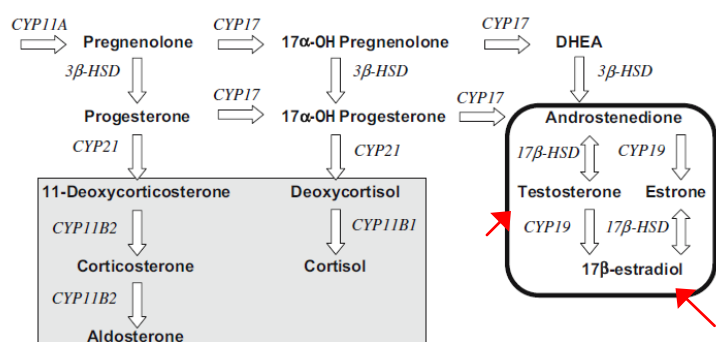
Auch hier existieren verschiedene Zelllinien. Neben der hier verwendeten kommerziellen ER-CALUX[®]-Zelllinie (U2OS-Zellen, Bio Detection Systems, Holland; (Van der Linden et al., 2008) gibt es auch frei verfügbare Zelllinien (T47D, Legler et al., 1999; T47D-KBluc, Wilson et al., 2004).

Tests zur Untersuchung der Steroidgenese (Bildung von Steroidhormonen)

H295R Steroidgenese Assay

Der H295R kann Auswirkungen von im Wasser vorhandenen hormonaktiven Substanzen auf die Bildung von Hormonen im Organismus nachweisen und somit Auswirkungen auf den Hormonstoffwechsel in einer genetisch unveränderten menschlichen Zelllinie (Nebennierenrindenkrebszellen NCI-H295R) aufzeigen (Hecker und Giesy, 2008). Im Test werden Auswirkungen auf die Bildung verschiedener Hormone gemessen (z.B. Testosteron, 17 β -Estradiol; Abb. 12). Die verwendete Zelllinie kann diese Hormone herstellen und besitzt auch alle relevanten Stoffwechselwege, die zur Bildung der Hormone nötig sind (Gracia et al., 2006). Dadurch können auch Wirkungen von Substanzen erfasst werden, die nicht über die Bindung an den Hormonrezeptor erfolgen.

Abb. 12: Steroidogenese-Pfad im H295R. Hormone (fett), Pfeile zeigen in Syntheserichtung. Die Geschlechts-hormonbildung ist schwarz eingrahmt (aus Hecker und Giesy, 2008). Rote Pfeile zeigen Orte der Aromatasehemmung bzw. -induktion.





Tab. 10 gibt einen detaillierten Überblick über die nötigen Arbeitsschritte der verwendeten *in vitro*-Biotests. In Tab. 11 werden die Unterschiede zwischen Biotests und chemischer Analytik von Östrogenen näher beleuchtet.

Tab. 10: Arbeitsschritte für die angewendeten *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen

	Yeast Estrogen Screen (YES)	ER-CALUX®	H295R
Kontrollen und Proben			
Kontrollen	Positivkontrolle 17β-Estradiol: 1.25*10 ⁻⁹ bis 9.77*10 ⁻¹² M (8 Konz.) Negativkontrolle: Farbinduktion der Hefezellen Lösungsmittelkontrolle: EtOH Zytotoxizitätskontrolle: Hefezellwachstum	Postivkontrolle 17β-Estradiol: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 1; 2; 3; 10; 30; 100 pM Negativkontrolle: Lumineszenz der Zellen Lösungsmittelkontrolle: DMSO Zytotoxizitätskontrolle: Zellwachstum in Medium (MTT)	Qualitätskontrolle: Prochloraz/Forskolin Negativkontrolle: Hormonkonzentration in Kontrollzellen Lösungsmittelkontrolle: DMSO Zytotoxizitätskontrolle: Zellwachstum (MTT)
Proben	jeweils 8 Konz., 1:2 Verdünnungsreihe: <u>Kläranlagen-Zulauf:</u> 4- bis 0.03-fach aufkonzentriert <u>Kläranlagen-Ablauf:</u> 20- bis 0.16-fach, 40- bis 0.31-fach, oder 80- bis 0.63-fach <u>Oberflächengewässer:</u> 200- bis 1.56-fach	jeweils 6 Konz, 1:3 Verdünnungsreihe: <u>Kläranlagen-Zulauf, -Ablauf und Oberflächengewässer:</u> 1; 3; 10; 30; 100; 300 und 1000-fach verdünnt	jeweils 5 Konz., 1:2 Verdünnungsreihe: <u>Kläranlagen-Ablauf:</u> 10, 5, 2.5, 1.25 und 0.625-fach aufkonzentriert <u>Oberflächengewässer:</u> 20, 10, 5, 2.5 und 1.25-fach aufkonzentriert
Replikate	3 Replikate der Proben, 6 Replikate von Kontrollen; (jeweils 1 biologisches und 3 technische/ unabhängige Replikate)	3 Replikate der Proben, 3 Replikate der Kontrollen (jeweils 1 biologisches und 3 technische Replikate)	<u>Bestimmung der Hormonkonzentration:</u> 6 Replikate der Proben und Kontrollen (jeweils 2 biologische und 6 technische Replikate)
Testdurchführung			
Vorkultur	- Animpfen von 50 mL Wachstumsmedium mit 125 µL Hefe aus Glycerolstock - 24h Inkubation bei 30°C auf Schüttelinkubator (120 rpm)	- Animpfen von x mL DMEM F12 Medium mit 1.5 mL Zellen aus Kryokultur in Zellkulturflasche - min. 20 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Schränk (95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂)	- in Zellkulturflaschen mit „supplemented medium“ DMEM Hams/F12 - bei 37°C und 5% CO₂ - Kultivierung der Zellen für mind. 5 Passagen
Animpfen der Testkultur	Zelldichte: 4*10 ⁷ Zellen pro 50 mL (1) Bestimmung der Zelldichte der Vorkultur mit Hilfe einer Zellzählkammer (z.B. Neubauer Zählkammer) (2) Volumen-Berechnung der benötigten für 4*10 ⁷ Zellen/ 50 mL (3) Animpfen von 50 mL des Minimalmediums für die Testkultur mit diesem Volumen und Zugabe von Farbstoff CPRG	Zelldichte: 1*10 ⁴ Zellen/ 100 µL Medium pro Well (1) Bestimmung der Zelldichte der Vorkultur (2) Berechnung des benötigten Volumens für 1*10 ⁴ Zellen/ 100 µL Medium (3) Zugabe der entsprechenden Menge an Zellen in jedes Well	Zelldichte: 10*10 ⁴ Zellen/ Well (3*10 ⁵ Zellen/ mL) (1) Bestimmung der Zelldichte der Vorkultur (2) Berechnung des benötigten Volumens für 10*10 ⁴ Zellen/ 1 mL Medium (3) Zugabe der entsprechenden Menge an Zellen in jedes Well



Belegen der Testplatte	Auf jeder Testplatte: Positivkontrolle (8 Konz.), Negativ-, Lösungsmittelkontrolle und Umweltproben <u>Umweltproben:</u> 1:2 Verdünnungsreihen mit EtOH direkt auf 96-well Testplatte (8 Konz.) <u>Standard:</u> 1:2 Verdünnungsreihe mit EtOH auf separater Platte (Konz. $1.25 \cdot 10^{-9}$) --> Transfer von je 10 µL auf Testplatte, vollständiges Abdampfen des Lösungsmittels	Auf jeder Testplatte: Positivkontrolle (9 Konz.), Lösungsmittelkontrolle und Umweltproben <u>Umweltproben:</u> 1:3 Verdünnungsreihen mit DMSO (3 Konz.) <u>Standard:</u> 1:2 Verdünnungsreihe mit DMSO (separat) (Konz. $1 \cdot 10^{-10}$) → Transfer von je 1 µL auf separate Platte + 1 mL Medium → davon je 200 µL auf Testplatte	Auf jeder Testplatte: Negativkontrolle und Umweltproben, separate Platte mit Qualitätskontrollen <u>Umweltproben:</u> 1:2 Verdünnungsreihen mit DMSO (5 Konz.) <u>Qualitätskontrollen:</u> je 2 Konzentrationen in DMSO
Zugabe der Testorganismen	<u>nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels:</u> Transfer von 200 µL der Testkultur in jedes Well (mit 12-er Mehrkanal-Pipette) --> Verschlussen der Platte mit Klebefolie (Plate Sealer)	<u>24h vor Testbeginn:</u> Besiedlung der Testplatte mit Zellen und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ <u>nach 24 h:</u> Austausch von Wachstumsmedium (DMEM F12) mit Expositions-Medium (DMEM F12 ohne Phenolrot) mit Extrakten (0.1% DMSO; 1 µL Probe in 1 mL Medium → davon je 200 µL auf Testplatte)	<u>24 h vor Testbeginn:</u> Besiedlung der Testplatte mit Zellen und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ <u>nach 24 h:</u> Austausch von Wachstumsmedium (DMEM F12) mit Expositions-Medium (DMEM F12) mit Extrakten (0.1% DMSO)
Proben-Rücklösung	2 min bei 120 rpm auf Schüttelinkubator schütteln	nicht nötig, da direkte Zugabe des Extrakts ins Medium	nicht nötig, da direkte Zugabe des Extrakts ins Medium
Inkubation	3 Tage bei 30°C (mit Schütteln nach 24 h)	24 h bei 37°C und 5% CO ₂	48 h bei 37°C und 5% CO ₂
Messungen am Testende	<u>1h vor Testende:</u> Schütteln der Testplatte für 2 min auf Schüttelinkubator (120 rpm) --> Stehen lassen <u>Nach 72h:</u> Messung der Absorption bei 620 nm (Zellwachstum) und bei 540 nm (Farbinduktion) mit Spektrophotometer	<u>nach 24 h Inkubation:</u> (1) Entfernung des Expositions-Mediums (2) Lysierung der Zellen in 30 µL Triton-Lyse-Puffer (3) Zugabe von 100 µL GlowMix (4) Messung der Luciferase-Aktivität mit Luminometer	<u>nach 48 h Inkubation:</u> <u>Bestimmung der Hormonkonzentration im ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)</u> (1) Transfer von 450 µL Testmedium (Überstand) in Eppendorf Tubes und Aufbewahrung bei -80°C (zur Messung von 17β-Estradiol und Testosteron) (2) Rücklösen der Extrakte in 250 µL Elisa-Puffer (3) Auftragen auf 17β-Estradiol - bzw. Testosteron-Platten
Benötigte Materialien			
Geräte	Mikrotiterplatten-Schüttler, Schüttelinkubator Mikrotiterplatten-Spektrophotometer zur Absorptionsmessung -80°C Schrank	CO₂-Inkubationsschrank Mikrotiterplatten-Luminometer zur Lumineszenzmessung -80°C Schrank	CO₂-Inkubationsschrank Mikrotiterplatten-Spektrophotometer zur Absorptionsmessung -80°C Schrank
Materialien	Ein- (10-100 µL) und Mehrkanalpipetten (20-200 µL), 96Well-Mikrotiterplatten mit Deckel (durchsichtig) und Verschlussfolie (Plate sealer), Erlenmeyerkolben (250 mL), verschiedene Schottflaschen zur Medienherstellung (von 20 mL bis 2 L)	Ein- und Mehrkanalpipetten, 96Well Mikrotiterplatten mit Deckel (durchsichtig) und Verschlussfolie (Plate sealer), Gewebekulturflaschen, verschiedene Schottflaschen zur Medienherstellung (von 20 mL bis 2 L)	Ein- und Mehrkanalpipetten, 24 Well Mikrotiterplatten mit Deckel (durchsichtig) und Verschlussfolie (Plate sealer), Elisa-Kits (Cayman Chemicals), Gewebekulturflaschen, verschiedene Schottflaschen zur Medienherstellung (20 mL - 2 L).
Referenzen			
Testguideline	SOP nach Routledge & Sumpter	Richtlinie EC/70/2002	OECD Guideline 456 (OECD, 2011)



Relevante Literatur	Routledge & Sumpter, 1996	Van der Linden et al., 2008	Hecker et al. 2007a und b; Hecker et al. 2011
Bemerkungen	Ähnlich auch für anti-östrogene und (anti)-androgene Endpunkte ((anti-)YES, (anti-) YAS) durchführbar	Ähnlich auch für anti-östrogene, (anti)-androgene und weitere Endpunkte durchführbar (z.B. AR-, GR-, PR- und PPar-CALUX®)	zahlreiche weitere Parameter messbar, z.B. Hemmung der Aromatase, Veränderung der Genexpression, Messung weiterer Hormone wie Progesterone, Glukocorticoide...

Tab. 11: Unterschiede verschiedener *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen

	Yeast Estrogen Screen (YES)	ER-CALUX®	H295R Steroidgenese Test	Analytik
Methode	Reportergen-Testsystem Genetisch veränderte Hefezelle mit stabil transfiziertem exogenem hERα und ERE-LacZ-Plasmid.	Reportergen-Testsystem menschliche U2OS Osteosacroma Zelllinie mit stabil transfiziertem exogenem hERα- und ERE-Luc-Plasmid	Steroidgenese (Hormonstoffwechsel) in menschlicher, genetisch nicht modifizierter Nebennierenrindenkrebs-Zelllinie. Endogene Produktion sämtlicher fetaler und adulter Steroidhormone der Nebennierenrinde.	Mittels LC/MS MS wird die Konzentration von 5 bekannten Östrogen aktiven Substanzen gemessen, die in einer Umweltprobe zu erwarten sind.
Probenart	Extrakt (SPE) der Umweltprobe	Extrakt (SPE) der Umweltprobe	Extrakt (SPE) der Umweltprobe	Extrakt (SPE) der Umweltprobe
Referenzsubstanz bzw. Interner Standard	17β-Estradiol (E2) → Bindung an den hERα → Farbumschlag	17β-Estradiol (E2) → Bindung an den hERα → Luciferaseaktivität.	Prochloraz: Aromatase- und CYP-Hemmer. → ↓Estradiol (E2), ↓ Testosteron (T) Forskolin: Genereller Steroidogenese-Induzierer durch cAMP-Pfad Aktivierung → ↑ E2, ↑ T	Isotopenmarkierte Substanzen: E1-D ₄ , E2-13C ₂ , EE2-D ₄ , NP13C ₆ , BPA-D ₁₆
Endpunkt	17β-Estradiol Äquivalenzkonzentration (EEQ), Bindung an den hERα (östrogen- und antiöstrogen-wirkende Substanzen), sichtbar durch Farbumschlag im Medium.	17β-Estradiol Äquivalenzkonzentration (EEQ), Bindung an den hERα (östrogen- und antiöstrogen- wirkenden Substanzen) sichtbar durch Luciferaseaktivität.	Veränderungen in der nicht-rezeptorvermittelten Hormonhomöostase (X-fache Induktion des E2- bzw. T-Levels im Medium) z.B. durch Beeinflussung der Modulation von Enzymen die wichtig für Produktion, Transformation/Umwandlung und Elimination von Steroidhormonen im Blut sind.	Konzentrationen von : - Estron (E1) - 17β-Estradiol (E2) - 17α-Ethinylestradiol (EE2) - Nonylphenol (NP) - Bisphenol A (BPA) - EEQ-Äquivalente: diese berücksichtigen keine Interaktionen u/o Antagonismus zwischen den gemessenen Substanzen
Nachweisgrenzen	Referenzsubstanz: ca. 6 ng/L E2 Proben**: LOD: 0.03 - 0.3 ng/L E2	Referenzsubstanz: ca. 0.03 - 0.34 ng/L E2 Proben**: LOD: 0.03 - 27 ng/L E2	Methode*: LOD: 7.8 pg/mL E2 LOD: 3.9 pg/mL T	** LOQ E1: 0.6 ng/L LOQ E2: 1.1 ng/L, 2.8 ng/L (Zulauf) LOQ EE2: 6.1 ng/L (Zulauf), 3.2 ng/L (Ablauf), 3 ng/L (Vor/Nach) LOQ BPA: 4.9 ng/L LOQ NP: 22.9 ng/L
Agonisten in der Probe	Bindung von (Xeno-)Östrogenen an den hERα führt zu β-Galactosidase-Aktivität	Bindung von (Xeno-)Östrogenen an den hERα führt zu Luciferaseaktivität	Erhöhung der gemessenen E2- und T-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle	E1, E2, EE2, NP und BPA messbar
Antagonisten in der Probe	Antiöstrogene alleine führen zu keinem Effekt. Sind Östrogene und Antiöstrogene	Antiöstrogene alleine führen zu keinem Effekt. Sind Östrogene und	Verringerung der gemessenen E2- und T-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle	Werden nicht gemessen.



	vorhanden vermindert die Bindung von Antiöstrogenen an den ER die Gesamtöstrogenität.	Antiöstrogene vorhanden, vermindert die Bindung von Antiöstrogenen an den ER die Gesamtöstrogenität.		
Mischungseffekte	Messbar	Messbar	Messbar	Nicht messbar
Zellwand Verfügbarkeitsunterschiede	Transport grosser oder lipophiler Moleküle durch die Zellmembran ist beeinträchtigt.	Hydrophile und lipophile Moleküle können Zellmembran passieren.	Hydrophile und lipophile Moleküle können Zellmembran passieren.	--
Andere endogene Rezeptoren	östrogen-bindende Hefeproteine ⁶	Kaum vorhanden	Vorhanden und Teil der Methode	--
Cytotoxizität	Messbar (Hefe Wachstum)	Messbar (MTT Vitalitätstest)	Messbar (MTT Vitalitätstest)	--
Vorteile	- Rezeptoraktivierung ist messbar - Robuster als H295R und ER-CALUX^{®1} - Agonismus und Antagonismus bestimmbar - Gute Resultate bei stark östrogenen Proben⁴	- Rezeptoraktivierung ist messbar - Sensitiver als YES¹ - Agonismus und Antagonismus bestimmbar - Östrogen aktive Metaboliten auch messbar (z.B. E2 ↔ E1)¹ - keine östrogene Aktivität durch endogene Rezeptoren (kein Crosstalk)	- Zelllinie die zur vollen Steroidogenese befähigt ist, - Zeigt Veränderungen in der nicht-rezeptorvermittelten Hormonhomöostase an, beispielsweise verursacht durch Enzymmodulation (z.B. CYP), - Erweiterbar auf Progesteronkonzentration, Genexpression, Enzymatische Aktivität (z.B. Aromatase).	Konzentrationsmessungen ausgewählter Östrogen aktiver Substanzen
Nachteile	- falsch negative Befunde durch geringere passive Diffusion, geringere selektive Aufnahme durch die Zellwand als ER-CALUX[®] und H295R^{2,4} - Östrogen aktive Metaboliten nicht messbar¹ - Weniger sensitiv als ER-CALUX^{®1} - Schwierigkeiten mit dem Nachweis schwach östrogenen Proben⁴ - Mögliche östrogene Aktivität des Farbstoffes bei hohen Konzentrationen³ - niedrige intrazelluläre Steroidhormonkonzentrationen durch Zellwand und Transportsysteme⁵ - Hinweise auf keine klare Unterscheidung zwischen hER Agonisten und Antagonisten⁵	- Weniger robust als YES¹ - Teurer als YES - Aufwändiger als YES - Weniger praktikabel wie YES	- reagiert nicht auf natürliche Adenocorticotrophe Hormone¹ - optimale Resultate nur während einer limitierten Anzahl von Zellpassagen¹	- Mischungseffekte sind nicht messbar - Unbekannte Substanzen werden nicht berücksichtigt - Nur sehr bedingt Aussage über mögliche Effekte machbar - Effektkonzentrationen liegen oft unter den Nachweisgrenzen

* Hecker et al. (2006);

** Diese Werte hängen vom Aufkonzentrations- bzw. Verdünnungsfaktor der Probe ab

¹ (Connolly et al., 2011), ² (ICCVAM, 2003), ³ (De Boever et al., 2001), ⁴ (Leusch et al., 2010), ⁵ (Earl Gray Jr et al., 1997), ⁶ (Burshell et al., 1984)



SOP für Probenahme zum YES-Test

Eawag/EPFL
Oberlandstrasse 133
Postfach 611
CH-8600 Dübendorf

<http://www.oekotoxzentrum.ch>

oekotoxzentrum
centre ecotox

Seite 1/1

Probenahme für den YES-Test

Probenahme für den YES-Test

Während der Probenahme

- Verwenden Sie wenn möglich Nitril-Handschuhe.
- Vermeiden Sie die Verwendung von Kosmetika (z.B. Handcreme) vor der Probenahme.
- Vermeiden Sie Hautkontakt mit dem beprobten Wasser.
- Bitte verwenden Sie kein Plastikmaterial: Schläuche, Trichter etc., sondern ausschliesslich Material aus Teflon, Edelstahl oder Glas, falls dies für die Probenahme nötig ist.

Flaschen für Probenahme

- Geeignet sind saubere Glasflaschen (Duran oder Schott) mit PP- oder teflonbeschichteten Verschlüssen. Bitte teilen Sie uns mit, falls Sie andere Verschlüsse verwenden.
- Verwenden Sie wenn möglich Braunglas-Flaschen.

Vorbehandlung der Probenflaschen und Material

- Fabrikneues Material vor der Reinigung gut mit Wasser spülen.
- Nach der Routinereinigung sollten die Probenflaschen zusätzlich wie folgt gereinigt werden:
- Die gewaschenen Flaschen sollten spätestens einen Tag vor der Probenahme dreimal mit Aceton (p.a.) gespült werden, wobei kleine Volumina ausreichen. Das Aceton muss über Nacht in einer Kapelle abgedampft werden.
- Spülen sie bitte die Flaschen unmittelbar vor der Probenahme mit etwas Probenmaterial.
- Material, welches mit der Probe in Kontakt kommt (Glasmaterial, Spatel etc.) sollte vor der Probenahme dreimal mit Aceton (p.a.) gespült werden.

Probenahme und Lagerung

- Um das Zerbrechen der Glasgefässe beim Einfrieren zu verhindern, füllen Sie sie bitte nur bis zur Hälfte (z.B. 1L Probenflüssigkeit in einer 2L Flasche).
- Verschiessen Sie die Flasche unmittelbar nach der Probenahme.
- Die Proben sollten mit einem Aufkleber (Proben Nr./Info) eindeutig markiert sein.
- Falls Sie durchsichtige Probeflaschen verwenden, umhüllen Sie sie bitte in Alufolie.
- Bis zum Zeitpunkt des Transports sollten die Proben liegend bei -20°C gelagert oder gekühlt aufbewahrt werden.

Transport

- Füllen Sie bitte das *Auftragsformular* aus.
- Transportieren Sie die Proben gekühlt (Kühlelemente oder Trockeneis) baldmöglichst an das Oekotoxzentrum.
- Falls Sie sich für einen Transport auf Trockeneis entscheiden, umhüllen Sie bitte die Flaschen mit Papier oder Luftpolsterfolie um einen direkten Kontakt der Flaschen mit dem Trockeneis zu vermeiden.

08.12.2010



Tab. 12: Geräteliste zur Durchführung des ER-CALUX®-Tests (zur Verfügung gestellt von BDS)

Item no	CALUX Specific Laboratory Equipment	ER-CALUX analysis	Extraction/Clean-up	Costs in EURO	Supplier
1	Luminometer with 2 injectors and software	X		16500	Berthold
2	Laminar flow cabinet	X		8000	Heraeus
3	CO2 incubator	X		5295	Heraeus
4	Shaker for samples		X	2580	IKA
5	Liquid nitrogen container	X		2000	Bio-Cane
6	Relief phase contrast culture microscope	X		2000	Olympus
7	Shaker for 96 well plates (optional)	X		840	IKA
8	Pipette pump	X		250	BRAND
Sum CALUX specific laboratory equipment				37465	
General laboratory equipment					
9	Evaporation device for vials			3000	Pierce
10	Waterbath	X		2000	GFL
11	Steriliser (autoclave)	X		1500	Prestige Medical
12	Analytical balance		X	1110	Sartorius
13	Freezer for sample storage		X	1000	Liebherr
14	Cooler/freezer combination	X		500	Bosch
15	Orbital shaker for vials/tubes	X	X	300	IKA
16	pH meter	X		300	SHOTT
Sum CALUX specific laboratory equipment				9710	
SUM Equipment for ER-CALUX				47'175	



Tab. 13: Geräteliste zur Durchführung des YES -Tests (Oekotoxzentrum)

Name of equipment (Manufacturer)	Minimum requirements or description on website	Approx. Price* (CHF) / lower price range	upper price range	Distributor
Instrumentation to conduct the assay				
Plate Reader (Absorbance) (e.g. Biotek, BMG Labtech, Tecan)	OD measurement at 540 and 620 nm	from 9 000 CHF (only absorbance)	up to 54 000 CHF (for absorbance, fluorescence and luminescence measurement)	Manufacturer
Sterile bench (Microbiological Safety Work Bench) (e.g. Heraeus, Airstream)	Laminar flow	from 8 600 CHF	up to 20 000 CHF	Huber or Faust AG
Centrifuge (e.g. Eppendorf, Heraeus)	<u>Minimum requirements:</u> Centrifugation at 2000g and 4°C; including rotor for 1.5/2 ml vials; cooling, e.g. Eppendorf Zentrifuge 5415 R	6000.00		Manufacturer, Huber or Faust AG
Vortex Schüttler (IKA)	IKA - VORTEX Genius 3 Schüttler	451.00		Huber or Faust AG
Orbital Kleinschüttler (IKA)	IKA-Kleinschüttler MS 3 digital, mit Kreisbewegung, Orbit von 4.5 mm	831.00		Huber & Co. AG
Orbital shaker (Heidolph)	Plattformschüttler Unimax 1010, temperature- controlled; Minimal specifications: Shake at 120 rpm at 30°C	2181.00		Huber & Co. AG
Inkubator (e.g. Heidolph)	<u>Minimum requirements:</u> Keep temperature constant at 30 °C (± 1 °C)			Faust Laborbedarf AG
Heizmodul (Heidolph)	Incubator 1000, Heizmodul	1546.00		Faust Laborbedarf AG
Inkubationshaube (Heidolph)	Inkubationshaube, hoch	981.00		Faust Laborbedarf AG
Sum instrumentation to conduct the assay		ca. 29'600 CHF		
Microscopy				
Light microscope (e.g. Leica, Nikon, Olympus, Zeiss)	<u>Minimum requirements:</u> 200 x Magnification	prices vary widely from around 1000 CHF	up to 20 000 CHF and more	Manufacturer
Sample Storage				
Fridge and Freezer	<u>Minimum requirements:</u> Keep temperature constant at 4°C or -20°C			Huber or Faust AG



Gefrierschrank (Liebherr)		1570.65	Huber & Co. AG
Kühlschrank (Liebherr)	Kühlgerät LIEBHERR FKEX mit explosions- geschütztem Innenraum	1'960.95	Huber & Co. AG
Weighing and media preparation			
Analytical balance (e.g. Mettler, Sartorius)	<u>Minimum requirements:</u> Measurements from 20 mg to 13.61 g	from 5 400 CHF (Range 0.1 mg – 61 g, e.g. Mettler XS64)	up to 8 500 CHF (Range: 0,01 mg - 0,1 mg 0...81 g - 220 g, e.g. Mettler XS205 DualRange)
pH-Meter (e.g. Mettler, WTW)	<u>Minimum requirements:</u> High precision	around 900 CHF	Manufacturer, Huber or Faust AG
Magnetic stirrer (Heidolph)	HEIDOLPH - Magnetrührer Hei-Standard, mit Heizung, mit Messfühleranschluss	805.00	Huber & Co. AG
Pipetting			
8-channel-pipette 0.5-10 µL (Socorex)	SOCOREX-ACURA variable 8-Kanal-Pipette Typ 855, 0.5 - 10 ul, Digital-Display	658.00	Huber & Co. AG
12-channel-pipette 20-200 µL (Socorex)	SOCOREX-CALIBRA 12-Kanalpipette Typ 852 digital, 20 - 200 ul, voll montiert	835.00	Huber & Co. AG
Micropipette 10- 100 µL (Socorex)	SOCOREX-CALIBRA variable Mikropipette Typ 822, digital, 10 - 100 ul	279.00	Huber & Co. AG
Micropipette 20- 200 µL (Socorex)	SOCOREX-CALIBRA variable Mikropipette Typ 822, digital, 20 - 200 ul	279.00	Huber & Co. AG
Micropipette 100- 1000 µL (Socorex)	SOCOREX-CALIBRA variable Mikropipette Typ 822, digital, 100 - 1000 ul	279.00	Huber & Co. AG
Pipettenstand (Socorex)	SOCOREX-Pipettenständer für 7 Pipetten Typ 337	89.00	Huber & Co. AG
Pipette boy (Brandaccu-Jet)	Pipettierhelfer accu-jet® pro	643.00	Faust Laborbedarf AG
Sum general lab instrumentation		ca. 14'700 CHF	



Anhang 2: Beschreibung des Vorgehens für die Messkampagne

Im Folgenden werden die Methoden für die einzelnen Elemente der Erhebungs- und Beurteilungsmethode vorgestellt, die aus den in Kapitel 3 vorgestellten Möglichkeiten für die durchgeführte Messkampagne ausgewählt wurden.

a) Auswahl der Probestellen

Im Rahmen der Messkampagne wurden 14 schweizerische Abwasserreinigungsanlagen (ARA) aus 5 verschiedenen biogeografischen Regionen (Mittelland, Alpennordflanke, Alpensüdflanke, West-Mittelland und Nordostschweiz) untersucht, wobei auf eine repräsentative Auswahl und gute Verteilung über die Schweiz geachtet wurde. Es wurden ARA mit sowohl geringen als auch hohen Abwasseranteilen im Fließgewässer miteinbezogen und insgesamt 20 Abwasserproben (6 ARA-Zuläufe, 14 ARA Abläufe) und 18 Gewässerproben (6 Oberflächengewässer vor ARA und 12 Oberflächengewässer nach ARA) untersucht. Da zur Elimination von Substanzen in kommunalen ARA bereits viele Daten vorliegen (z.B. Götz et al., 2011; Ort et al., 2007; Vermeirssen et al., 2008) wurde die Zahl der beprobten Zuläufe auf 6 beschränkt. Bei den Oberflächengewässern wurden nur dort vor und nach dem Zulauf des ARA-Wassers Proben genommen, wo ein hoher Abwasseranteil zu erwarten war.

b) Probenahme und Probentransport

Für die Messkampagne Östrogene wurde, wie in Kapitel 3.2 beschrieben eine Beprobung mit Stichproben in Oberflächengewässern und 24 h-Mischproben von Kläranlagen-Zu- und Abläufen durchgeführt.

Die Probenahme für die Messkampagne wurde von der BMG Engineering AG zwischen dem 02. und 16.02.2010 an 14 Kläranlagen und angrenzenden Oberflächengewässern durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Probengefäße wurden alle Flaschen nacheinander mit Aceton, Ethanol und Wasser ausgespült und mit der Öffnung nach unten aufgestellt und stehen gelassen.

Die Beprobungen aus den Oberflächengewässern erfolgten als Schöpfproben. Die Gewässer wurden vom Ufer aus beprobt; nach Möglichkeit immer im fließenden Teil des Gewässers. Die Probenflaschen wurden 2-3-mal mit dem Probewasser gespült. Anschliessend wurden die Behälter randvoll gefüllt. Der Transport erfolgte in Kühlboxen mit Kühlelementen. Die Proben wurden bis zur Filtration (in der Regel am nächsten Tag) bei 4°C aufbewahrt.

Bei der Probenahme wurden die Feldparameter: pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Temperatur und Sauerstoffgehalt bestimmt.

Zur Beprobung der ARA-Zu- und Abläufe wurden die benötigten Probenflaschen den beteiligten Anlagen vorgängig per Post zugestellt. Die Entnahmen der 24 h-Mischproben erfolgten durch das Anlagenpersonal mittels automatischer Probennehmer. Die Proben wurden (bis auf eine Probe) noch am Tag der Beendigung der 24 h Sammelperiode von BMG Engineering abgeholt und zusammen mit den Proben der entsprechenden Fließgewässer ins Labor transportiert (Tab. 14).



Tab. 14: Wasserprobenahme und Probenlagerung für *in vitro* Biotests und chemische Analytik zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen.

Probentyp	24 h Mischprobe oder Stichprobe
Probenvolumina	1000 ml Flusswasser 500 ml Abwasserablauf 200 ml Abwasserzulauf
Field Blank	1000 ml Reinstwasser
Probenahmegefäße	Nur Glasflaschen, 3x Aceton (p.a.) gereinigt
Filtration	Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm)
Aufbewahrung	bei -20°C im Dunkeln, in gereinigten Glasflaschen

Im Labor wurden die Proben baldmöglichst filtriert, die Filtration erfolgte im Lauf der nächsten 24 h nach der Probenahme. Es wurde eine Vakuum-Filtrationseinheit von Milipore AG mit Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm) verwendet. Das Filtrat wurde in 2L-Duranflaschen abgefüllt. Die 2L-Flaschen wurden nur zu ca. 50% gefüllt. Bis zum Transport der Proben zur Eawag wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt. Der Transport erfolgte, wie oben beschrieben, in Kühlboxen mit Kühlelementen.

Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt.

c) Probenvorbereitung und Aufkonzentrierung für Analytik und Biotests

Im Labor wurden die Wasserproben filtriert und mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert. Die ausgewählte Methode mit LiChrolut EN RP-18-Kartuschen wurde bereits in früheren Arbeiten mit weiteren Extraktionsmethoden verglichen und hat sich als geeignet erwiesen, um ein möglichst breites Spektrum von verschiedenen Substanzen mit einer hohen Wiederfindungsrate aus dem Wasser zu extrahieren (z.B. Escher et al., 2008b). Eine alternative Methoden hierzu ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion, die teilweise für Östrogen aktive Substanzen angewendet wird (z.B. Van der Linden et al., 2008).

Die Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion für Analytik und Biotests wurde wie in Tab. 9 beschrieben durchgeführt. Für alle Biotests wurden jeweils die gleichen Extrakte verwendet.

d) Anwendung der Biotests

YES

Der YES mit *Saccharomyces cerevisiae* wurde nach der Methode von Routledge und Sumpter (1996) mit Hefezellen von John Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK) am Oekotoxzentrum (Dübendorf, CH) durchgeführt.

Hierfür wurden 1:2 Verdünnungsreihen des Standards (von $1.25 \cdot 10^{-9}$ bis $9.77 \cdot 10^{-12}$ M 17β-Estradiol (E2), 8 Konzentrationen, 3 Replikate), Verdünnungsreihen der Probenextrakte (8 Konzentrationen, 3 Replikate), ein Lösungsmittel- und Hefe-Blanks (je 8 Replikate) auf 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert.

Die Hefe wurde vor dem Test über 24 h bei 30°C vorkultiviert, danach mit Testmedium auf eine Dichte von $1.45 \cdot 10^7$ Zellen/ml verdünnt und anschliessend mit dem Farbstoff CPRG versetzt.

Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels in der Mikrotiterplatte wurden je 200 µL dieser Hefesuspension jedem Well zugegeben. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden,



wurde die Platte anschliessend mit einem „Plate sealer“ luftdicht verschlossen und zum Rücklösen der Proben für 2 min bei 120 rpm auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Anschliessend wurde die Platte für 3 d bei 30°C inkubiert und jeweils nach 24 h und 71 h geschüttelt. Nach 72 h wurde die Absorption der Hefezellen bei 540 nm (zur Messung der Färbung) und bei 620 nm (zur Messung des Hefewachstums) bestimmt.

Für die Berechnung der 17 β -Estradiol Äquivalenzkonzentration (EEQ) wird die korrigierte Absorption $\Delta OD = OD_{540nm} - OD_{620nm}$ verwendet, um mögliche Unterschiede im Wachstum der Hefezellen in den einzelnen Wells zu berücksichtigen. Da die Daten der Proben-Verdünnungsreihe eine andere Steigung aufwiesen als die Daten für den Estradiolstandard, wurden für die Berechnung der EEQs nur jeweils die Verdünnungsstufen der Proben verwendet, bei denen eine annähernd gleiche Steigung (im linearen Bereich) im Vergleich zur Standardkurve gegeben war (Vermeirssen et al., 2005).

ER-CALUX®

Der ER-CALUX® wurde durch ein Auftragslabor (Bio Detection Systems, BDS, Amsterdam) mit der menschlichen Zelllinie U2OS-ER α (Osteosarcom-Zelllinie) durchgeführt (Van der Linden et al., 2008). Zur Gewährleistung der Qualitätssicherheit und -kontrolle führt BDS den ER-CALUX® gemäss der EC/70/2002 Richtlinie durch. Dabei wurden 96-Well-Platten mit U2OS-ER α Zellen und DF Medium (ohne Phenolrot und ergänzt mit E2-freiem Serum) besiedelt.

Nach 24-stündiger Inkubation (37°C, 7.5% CO₂) wurde das Medium durch Probe-Medium mit den Wasserextrakten (0.1% DMSO) ersetzt, um sie auf östrogene Aktivität zu untersuchen (in Triplikaten).

Die ER-CALUX® Aktivität der Wasserproben-Extrakte wurde in folgenden Verdünnungen untersucht: 1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000. Zur Qualitätskontrolle wurden zusätzlich auf jeder Platte E2 als Standard (0; 0,1; 0,3; 0,6; 1; 2; 3; 10; 30; 100 pM, 8 Konzentrationen) sowie ein Blindwert (≤ 1 pM EEQ, sonst Wiederholung der Analyse) mituntersucht (in Triplikaten).

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das Probe-Medium entfernt und die Zellen in 30 μ L Triton-Lyse-Puffer lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde mittels eines Luminometers quantifiziert (Lucy 2, Anthos, Österreich). Auf allen Platten wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Referenzsubstanz (E2) miteinbezogen, um die Reaktion zu quantifizieren und die detektierte Luciferase-Aktivität der getesteten Proben in EEQ darzustellen. Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich in Van der Linden et al. (2008).

H295R

Der H295R Steroidgenese Assay wurde durch ein Auftragslabor (Institut für Umweltforschung, RWTH Aachen, Aachen, D) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß des Standardprotokolls „Culturing of the H295R human adrenocortical carcinoma cell line (ATCC CLR-2128)“ des Aquatic Toxicology Laboratory, University Research Containment Facility, Michigan State University, USA (Version 3; May 30, 2007) (Hecker et al., 2007a). Die Exposition der Zellen, Hormonextraktion und -messung, sowie MTT-Zytoxizitätstest (Vitalitätstest) wurden gemäß des Standardprotokolls „(ATCC CLR-2128) (Version 2; April 23, 2007; Hecker et al., 2007c)“ des Aquatic Toxicology Laboratory, University Research Containment Facility der Michigan State University, USA durchgeführt.



Jede Probe wurde in jeweils 5 Verdünnungsstufen im Test eingesetzt (ARA: 10x, 5x, 2.5x, 1.25x, 0.625x; Oberflächengewässer OG: 20x, 10x, 5x, 2.5x, 1.25x). Höhere bzw. niedrigere Verdünnungsstufen als die angegebenen wurden aufgrund toxischer Effekte und zu hohem Verdünnungsfaktor als ungeeignet betrachtet. Durch Vortests wurden die höchsten Konzentrationen im MTT Vitalitätstest auf ihr cytotoxisches Potential hin untersucht, um untaugliche Höchstkonzentrationen auszuschließen.

Die Zellen wurden pro Probe im Triplikate exponiert. Jedes dieser 3 Replikate wurde nachfolgend im Duplikat im ELISA auf seine 17 β -Estradiol- und Testosteronkonzentrationen hin getestet. Die Exposition und die nachfolgende Hormonquantifizierung für E2 und Testosteron wurden noch einmal unabhängig vom ersten Durchlauf wiederholt. Daraus ergeben sich 2 biologische Replikate mit jeweils 6 technischen Replikaten.

Der MTT Vitalitätstest wurde in einfacher Ausführung vorgenommen um cytotoxische Effekte der Proben zu erfassen. Jedes der exponierten Triplikate wurde einzeln auf die Zellvitalität hin getestet. Damit ergibt sich 1 biologisches Replikate mit jeweils 3 technischen Replikaten.

In Tab. 10 und Tab. 15 ist die Durchführung der Biotests ausführlicher beschrieben.

e) Datenauswertung

YES

Die EEQ-Werte der gemessenen Wasserproben wurden im YES mit Hilfe der E2-Standardkurve bestimmt. Hierzu wurde die Standardkurve zunächst mittels nichtlinearer Regression (4-Parameter Hill Funktion, GraphPad Prism) gefittet, um die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) zu erhalten. Das Detektionslimit (LOD) wurde als obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls des EC₀₅ definiert (Escher et al., 2008b) bzw. aus dem Mittelwert der Negativkontrolle mit 3facher Standardabweichung berechnet (siehe unten). Die Messwerte der Proben waren quantifizierbar, wenn sie im linearen Bereich zwischen dem EC₀₅ und dem EC₈₀ lagen. Verdünnungen der Proben, die in diesem Bereich lagen, wurden quantifiziert. Die so im YES ermittelten EEQ-Werte wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in ng EEQ/L Wasser umgerechnet. Nur Verdünnungen, die keine Zytotoxizität besaßen, wurden zur Quantifizierung der östrogenen Aktivitäten verwendet.

ER-CALUX®

Die EEQ-Werte der gemessenen Proben wurden im ER-CALUX® mit Hilfe der E2-Standardkurve wie folgt bestimmt. Zunächst wurde die Standardkurve mittels nichtlinearer Regression (4-Parameter Hill Funktion, GraphPad Prism) gefittet, um die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀), Nachweisgrenze (LOD = Mittelwert_{Untergrundsignal} + 3 * Standardabweichung_{Untergrundsignal}) und Bestimmungsgrenze (LOQ = 3.3 * LOD) in Pikomol E2 zu bestimmen. Die Messwerte der Proben sind quantifizierbar, wenn sie im linearen Bereich der E2-Standardkurve zwischen der LOQ und dem EC₅₀ liegen. Verdünnungen der Proben, die in diesem Bereich liegen, wurden quantifiziert. Nur Verdünnungen die keine Zytotoxizität besaßen, wurden zur Quantifizierung der östrogenen Aktivitäten benutzt. Die so bestimmten ER-CALUX® EEQ-Werte im Well (pM) wurden dann wie folgt in pg EEQ/L Wasser umgerechnet.

$$\text{EEQ}_{\text{Probe}} (\text{pg EEQ/L Wasser}) = \text{EEQ}_{\text{Well}} (\text{pM}) * 10^{-12} (\text{ergibt mol/L}) * 1000 (\text{Verdünnungsfaktor der Probe im Assay}) * 40 \times 10^{-6} \text{ L} (\text{DMSO-Volumen des Extrakts}) * 272 \text{ g/Mol} (\text{Molekulargewicht E2}) / \text{Probevolumen für Extraktion} (250-1000 \text{ mL})$$



H295R

Im H295R Steroidogenesis Assay wurden die relativen Induktionen (fold inductions) der 17 β -Estradiolproduktion nach dem folgenden Verfahren ermittelt.

Berechnung der Hormonkonzentrationen (E2 und Testosteron) in jeder Probe (pg/ml Medium) durch Fitten der Standardkurve (logarithmierte Konzentrationen versus gemessene optische Dichte) mittels eines Polynoms 3. Grades (Excel 2007, Microsoft). Anhand der Standardkurven-Funktion

$$y = 10^{((a*x^3)+(b*x^2)+(c*x)+d)}$$

und der Verdünnungsfaktoren wurden die delogarithmierten Hormonkonzentrationen (pg/ml Medium) der Proben berechnet (n=6, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Um die relativen Induktionen zu erhalten, wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung in Bezug zur jeweiligen Negativkontrolle (= 1) gesetzt. Die relative Induktion pro Probe ist der Mittelwert (und Standardfehler) der insgesamt 2 biologischen Replikate (mit je 6 technischen Replikaten). Um signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Proben (Kläranlagenablauf und dem entsprechenden Oberflächengewässer) sowie zwischen den getesteten Verdünnungen derselben Probe festzustellen, wurde eine One Way ANOVA mit Holm-Sidak Post-hoc Test, Signifikanzniveau $p \leq 0.05$ (SigmaStat 3.5, Systat Software, Inc.) durchgeführt.

Für Ermittlung der Zellvitalität (% lebende Zellen) wurde in einem biologischen Replikate aus den 3 technischen Replikaten der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variabilitätskoeffizient berechnet und auf den Mittelwert der Negativkontrolle (100% lebende Zellen) bezogen um die relative Zellvitalität zu erhalten.

Weitere Informationen zur Datenauswertung der Biotests finden sich in Tab. 15.



Tab. 15: Datenauswertung der angewendeten *in vitro* Biotests zum Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen

	YES	ER-CALUX®	H295R
Auswertung und Dateninterpretation			
Auswerteparameter	Berechnung der 17β-Estradiol-Äquivalenz-Konzentrationen (EEQs) $\Delta OD = OD_{540nm} - OD_{620nm}$ (um mögliche Unterschiede im Wachstum der Hefezellen zu berücksichtigen)	Berechnung der 17β-Estradiol-Äquivalenz-Konzentrationen (EEQs) Quantifizierung der Lumineszenz	Berechnung der x-fachen Induktion der Umweltproben relativ zur Kontrolle
Auswertung	Bestimmung der EEQ-Werte mit Hilfe der E2-Standardkurve: Fitten der Standardkurve mit nichtlinearer Regression (GraphPad Prism) Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (EC ₅₀)	Bestimmung der EEQ-Werte mit Hilfe der E2-Standardkurve: Fitten der Standardkurve mit nichtlinearer Regression (GraphPad Prism) Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (EC ₅₀)	Bestimmung der Hormonkonzentrationen (pg/ml Medium) der Proben Berechnung der relativen Induktionen durch Vergleich mit der jeweiligen Negativkontrolle (= 1 gesetzt).
Nachweisgrenze (LOD)	Mittelwert _{Untergrundsignal} + 3*Standardabweichung _{Untergrundsignal}	Mittelwert _{Untergrundsignal} + 3*Standardabweichung _{Untergrundsignal}	Mittelwert _{Untergrundsignal} + 3*Standardabweichung _{Untergrundsignal}
Bestimmungsgrenze (LOQ)	3.3 * LOD	3.3 * LOD	3.3 * LOD
Quantifizierbarkeit der Proben	wenn im linearen Bereich zw. LOQ und EC ₅₀ liegend → Verdünnungen der Proben in diesem Bereich quantifiziert nur Verdünnungen ohne Zytotoxizität zur Quantifizierung verwendet.	wenn im linearen Bereich zw. LOQ und EC ₅₀ liegend → Verdünnungen der Proben in diesem Bereich quantifiziert nur Verdünnungen ohne Zytotoxizität zur Quantifizierung verwendet.	bei ≥2-facher Induktion relativ zur Lösungsmittelkontrolle Es werden nur Verdünnungen ohne Zytotoxizität zur Quantifizierung verwendet.
Berechnung	ermittelte EEQ-Werte wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in ng EEQ/L Wasser umgerechnet	ermittelte EEQ-Werte wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in ng EEQ/L Wasser umgerechnet	x-fache Induktion relativ zur Kontrolle



f) Chemische Analytik von Östrogenen

Begleitend wurde eine umfangreiche chemische Analytik der wichtigsten Östrogene (Estron (E1), E2, EE2, Bisphenol A (BPA) und Nonylphenol (NP)) durchgeführt, wobei zusätzlich zehn Wasserproben in einem Screening auf das Vorkommen von 123 Spurenstoffen untersucht wurden. Die Auswahl der Östrogene erfolgte u.a. aufgrund der Ergebnisse der Glatstudie, die E1, E2, EE2, Alkylphenole (z.B. NP) und BPA als die relevantesten Östrogene identifiziert hat (Gälli et al., 2009). Die chemische Analytik wurde wie in Tab. 16 beschrieben durchgeführt.

Tab. 16: Spezifikationen zur chemischen Analytik von Östrogen aktiven Substanzen

LC-MS/MS Analyse	
LC-MS/MS Gerät	API 4000 LC-MS/MS
HPLC Trennung	Gradientenelution Eluent A = Wasser/Acetonitril (90:10, v/v) Eluent B = Acetonitril/Wasser (90:10, v/v)
HPLC Säule	MS C18 HPLC Säule (2.1 mm x 100 mm, Partikelgrösse 3.5 µm)
Ionisierung	Negative Elektrospray-Ionisierung (ESI ⁻)
Kalibration	0 - 200 ng/ml E1, E2 und EE2 Mischstandards 0 - 2500 ng/ml NP+BPA Standards
Replikate	2
LOQ	E1 0.6 ng/L; E2 1.1 ng/L; EE2 3.0 ng/L; BPA 4.9 ng/L; NP 22.9 ng/L

Um einen Vergleich der Ergebnisse der Östrogenanalytik mit den Ergebnissen der Biotests zu ermöglichen, wurden EEQs wie folgt berechnet:

$$EEQ \text{ (ng / L)} = \sum_i EEF_i \cdot c_i \text{ (ng/L)}, \quad EEF_i = \frac{EC50_{E2}}{EC50_i}$$

In dieser Gleichung ist EEF_i der 17β-Estradiol-Äquivalenzfaktor. Äquivalenzfaktoren für E1, E2, EE2, BPA und NP für den YES sind in Tab. 17 aufgelistet. Lagen die Konzentrationen einzelner Östrogen aktiver Substanzen unterhalb der Quantifizierungslimite, so wurden sie nicht in die EEQ-Berechnung miteinbezogen.

Tab. 17: 17β-Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) für E1, E2, EE2, BPA und NP

Substanz	Log K _{ow} ¹	EEF für YES ²	EEF für ER-CALUX® ^{3,4}
Estron (E1)	3.1	0.4	0.02
17β-Estradiol (E2)	4.0	1.0	1.0
17α-Ethinylestradiol (EE2)	4.2	1.2	1.2
Nonylphenol (NP)	5.8	2.5 x 10 ⁻⁵	5.9 x 10 ⁻⁴
Bisphenol A (BPA)	3.3	1.1 x 10 ⁻⁴	2.7 x 10 ⁻⁵

¹(Arditsoglou und Voutsas, 2008), ²(Rutishauser et al., 2004), ³(Houtman et al., 2009), ⁴(Sonneveld et al., 2005)



Anhang 3: Weitere Ergebnisse der Messkampagne

Ergebnisse des H295R Steroidgenese Assays und Vergleich mit YES, ER-CALUX® und Analytik

Der H295R zeigte in allen der 6 untersuchten Oberflächengewässerproben nach ARA eine signifikante 17 β -Estradiolproduktion bei 10 bis 20-facher Aufkonzentration (Details dazu in Abb. 13, Abb. 14 und Abb. 15).

Diese Proben wurden auch in YES und ER-CALUX®, sowie bei der chemischen Analytik positiv getestet (siehe Tab. 18). Die dazugehörigen ARA-Ablaufproben konnten wegen Zytotoxizität gegenüber den H295R Zellen nicht untersucht werden, so dass für diese Proben kein Vergleich mit YES, ER-CALUX® und Analytik möglich ist. Vergleichbare Studien haben aber gezeigt, dass auch dort östrogene Aktivität zu erwarten ist (Gracia et al., 2006; Gracia et al., 2008; Grund et al., 2011).

Interessanterweise zeigte ein Teil der im H295R untersuchten Proben auch eine tendenziell verringerte Testosteronbildung, was auf das Vorhandensein von Testosteronsyntheseinhibitoren hinweist (Abb. 15). Hierzu gehören beispielsweise die nicht-rezeptorvermittelte Hemmung des Enzymes 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) bei der Umwandlung des Hormons Androstenedion in Testosteron. In Kombination mit den erhöhten Östrogen-Gehalten dieser Proben kann dies auch ein Hinweis auf eine erhöhte Aromataseaktivität (CYP19, Abb. 12) sein (Grund et al., 2011). Auch BPA führt bei niedrigen Konzentrationen zur Stimulierung der Aromatase-Aktivität (Nativelle-Serpentini et al., 2003). Da bei den rezeptorvermittelten Tests keine (anti-)androgenen Aktivitäten untersucht wurden (z.B. mit YAS oder AR-CALUX®), können die im H295R gefundenen Effekte nicht mit diesen verglichen werden.

Es gibt wenige andere Studien, die diesen Test auf Umweltproben anwenden (Gracia et al., 2008; Grund et al., 2011), aber sie zeigen ein ähnliches Bild. Vergleichbar mit den Resultaten dieser Studie zeigten Sedimentextrakte der oberen Donau (Deutschland) in den H295R Zellen signifikant erhöhte E2-Konzentrationen, sowie eine leichte Hemmung der Testosteron-Synthese (Grund et al., 2011).

Zudem zeigte der H295R endokrine Aktivität in Sedimenten an, die im YES nicht detektiert werden konnten. Gracia et al. (2008) analysierten ebenfalls Umweltproben im H295R (Wasserproben aus Küstengewässern in Hongkong ebenso wie aus ARA-Zuläufen und Abläufen). Sie konnten in den Zulaufproben der ARA eine Induktion von E2 detektieren, in den jeweiligen ARA-Abläufen wie auch den Oberflächengewässern war diese Induktion verschwunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der H295R als Ergänzung zum Nachweis nicht-rezeptorvermittelter endokriner Wirkungen zusammen mit rezeptor-aktivierenden Biotests, wie dem YES oder dem ER-CALUX®, sinnvoll eingesetzt werden könnte, um Wirkungen auf die Steroidgenese nicht zu verpassen.



Tab. 18: Vergleich der angewendeten *in vitro* Biotests und der chemischen Analytik zum Nachweis Östrogen aktiver Substanzen. ARA: Abwasserreinigungsanlage, OG-N: OG nach ARA, E2: 17 β -Estradiol, T: Testosteron

		ARA ID											
		A		B		M		N		H		I	
		ARA	OG-N	ARA	OG-N	ARA	OG-N	ARA	OG-N	ARA	OG-N	ARA	OG-N
H295R	E2 Induktion	ZT	↑*	ZT	↑*	↑*	↑*	↑	↑*	↑	↑*	ZT	↑*
	E2 Hemmung		(↓)		(↓)		(↓)		(↓)		(↓)		
H295R	T Induktion												
	T Hemmung			↓*			↓*		↓*	↓*	↓*		↓*
ER-CALUX®	Östrogenität	++	+	++	++	+++	+	++	+	++	+	++	+
YES	Östrogenität	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+++	+
Analytik	EDCs	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
↑* Signifikante Induktion von 17 β -Estradiol ↑ Induktion von 17 β -Estradiol (↓) Hemmung von 17 β -Estradiol bei niedriger Aufkonzentrierung ↓* Signifikante Hemmung von Testosteron (T) + bis 5 ng/L 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ) ++ 6-10 ng/L EEQ +++ 11-20 ng/L EEQ ZT zelltoxisch													



Ergebnisse der chemischen Analytik - Umweltrelevanz

Chemische Analytik: Vergleich mit Studien im In- und Ausland. Die Konzentrationen der ausgewählten östrogenaktiven Substanzen, die in diesem Projekt analytisch gemessen wurden, sind mit früheren Messungen aus der Schweiz und mit Konzentrationen, die in anderen Ländern ermittelt wurden, vergleichbar (Jonkers et al., 2009; Lai et al., 2002; Voutsa et al., 2006; Ying et al., 2002). Aufgrund der hohen Nachweisgrenzen von >3 ng/L konnte jedoch das synthetische Hormon 17 α -Ethinylestradiol (EE2), die potenteste der analytisch gemessenen östrogenen Substanzen, in keiner der Proben nachgewiesen werden, obwohl EE2 schon weit unter dieser Nachweisgrenze östrogene Aktivität gegenüber Organismen besitzt. Dies macht auch das vorgeschlagene EU Umweltqualitätskriterium (EQS) von 35 pg/L deutlich (Tab. 3), das sich mittels chemischer Analytik nicht prüfen lässt.

Das etwas weniger potente natürliche Hormon 17 β -Estradiol (E2) wurde in 3 von 16 Ablaufproben in Konzentrationen bis maximal 2.6 ng/L nachgewiesen und ist so vergleichbar mit Werten aus anderen Ländern wie Italien (bis 3.3 ng/L), Deutschland (bis 5.2 ng/L) und den Niederlanden (bis 5.0 ng/L). In Grossbritannien und Kanada wurde im Gegensatz dazu Maximalwerte bis zu 64 ng/L gemessen (Lai et al., 2002; Ying et al., 2002). Die E2 Konzentrationen in Schweizer Oberflächengewässern lagen bei allen Proben unter der Nachweisgrenze von 1.1 ng/L. Auch im Falle von E2 ist der vorgeschlagene EQS von 400 pg/L mittels chemischer Analytik nicht zu kontrollieren. In Deutschland, Italien und den Niederlanden wurden Konzentrationen von <0.3 bis 5.5 ng/L gemessen (Lai et al., 2002; Ying et al., 2002).

Estron (E1), das von der östrogenen Potenz ein wenig schwächer als E2 und dessen Abbauprodukt ist, wurde im Ablauf in Konzentrationen von 1.7 bis 21 ng/L nachgewiesen. Diese Werte sind vergleichbar mit Messungen aus Deutschland (<0.1 bis 18 ng/L), und in begrenztem Masse auch mit Werten aus Italien, den Niederlanden, Grossbritannien und Kanada. Dort wurden jedoch weit höhere Maximalwerte von 47 bis zu 82 ng/L E1 in Ablaufproben gemessen (Lai et al., 2002; Ying et al., 2002). Die E1 Konzentrationen von <0.6 bis 4.4 ng/L in Schweizer Fliessgewässer (hier gemessene Konzentrationen) sind vergleichbar mit Werten aus Deutschland (bis 4.1 ng/L) und den Niederlanden (bis 3.4 ng/L) (Lai et al., 2002; Ying et al., 2002).

Die deutlich weniger potenten Xenoöstrogene BPA und NP wurden in diesem Projekt in Oberflächengewässern nach den ARA im Bereich von 26 bis 320 ng/L (BPA) und 25 bis 395 ng/L (NP) detektiert. Im Fluss Glatt wurden zwischen 2004 und 2006 bereits vergleichbare Konzentrationen gemessen (Jonkers et al., 2009; Voutsa et al., 2006).

**Tabellen und/oder Abbildungen mit den Ergebnissen der Biotests****ER-CALUX®**

Tab. 19: Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) (ng/L) im ER-CALUX®. MW, n = 3.

ARA	Parameter	Zulauf (ng/L)	Ablauf (ng/L)	Vor (ng/L)	Nach (ng/L)	Abwasseranteil (%) (modelliert)
A	MW	15	8	0.69	2.6	68
B	MW		6.3	1.4	8.8	51
C	MW		20		0.39	13
D	MW		14			
E	MW		16			4
F	MW		7.5			60
G	MW	36	14		1.4	5
H	MW	12	9.4	0.8	0.84	40
I	MW	24	5.5	0.11	2.5	100
K	MW		13		20	100
L	MW		19		5.7	7
M	MW	25	17	0.042	4.5	73
N	MW	69	5.7	0.7	1.2	100
O	MW		29			8

YESTab. 20: Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) (ng/L) im Yeast Estrogen Screen. MW $\pm$ SD, n = 3.

ARA	Parameter	Zulauf (ng/L)	Ablauf (ng/L)	Vor (ng/L)	Nach (ng/L)	Abwasseranteil (%) (modelliert)
A	MW	32.07	1.51	0.16	0.35	68
	SD	0.89	0.19	0.01	0.05	
B	MW		0.56	0.21	2.79	51
	SD		0.10	0.02	0.41	
C	MW		48.15		0.11	13
	SD		2.54		0.02	
D	MW		4.81			
	SD		0.62			
E	MW		8.78			4
	SD		0.41			
F	MW		1.79			60
	SD		0.26			
G	MW	21.84	1.33		0.13	5
	SD	1.72	0.30		0.02	
H	MW	25.60	7.57	1.80	1.29	40
	SD	2.19	0.87	0.25	0.19	
I	MW	23.70	10.68	0.12	5.52	100
	SD	2.12	0.44	0.02	0.63	
K	MW		4.00		4.36	100
	SD		0.94		0.55	
L	MW		8.89		0.32	7
	SD		0.70		0.07	
M	MW	40.06	2.55	0.05	1.51	73
	SD	5.93	0.36	0.02	0.15	
N	MW	26.87	1.50	0.15	0.35	100
	SD	2.98	0.20	0.02	0.06	
O	MW		2.70			8
	SD		0.59			



H295R - Zytotoxizität

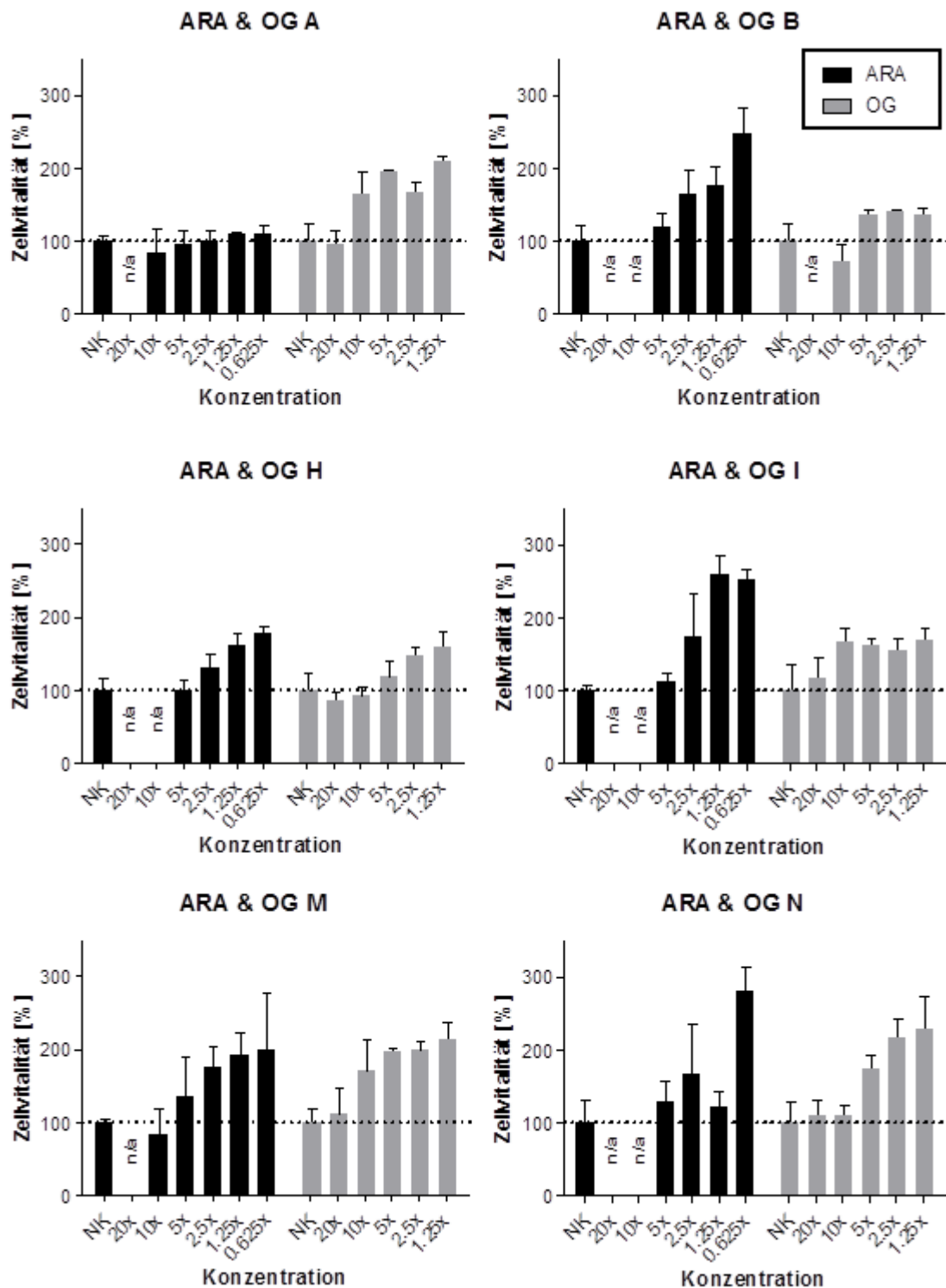


Abb. 13: Zellvitalität der H295R Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (ein biologisches Replikat); NK = Negativkontrolle = 100%; n/a = nicht getestet (aus Floehr et al., 2011).



H295R – Induktion/Hemmung der Bildung von Estradiol

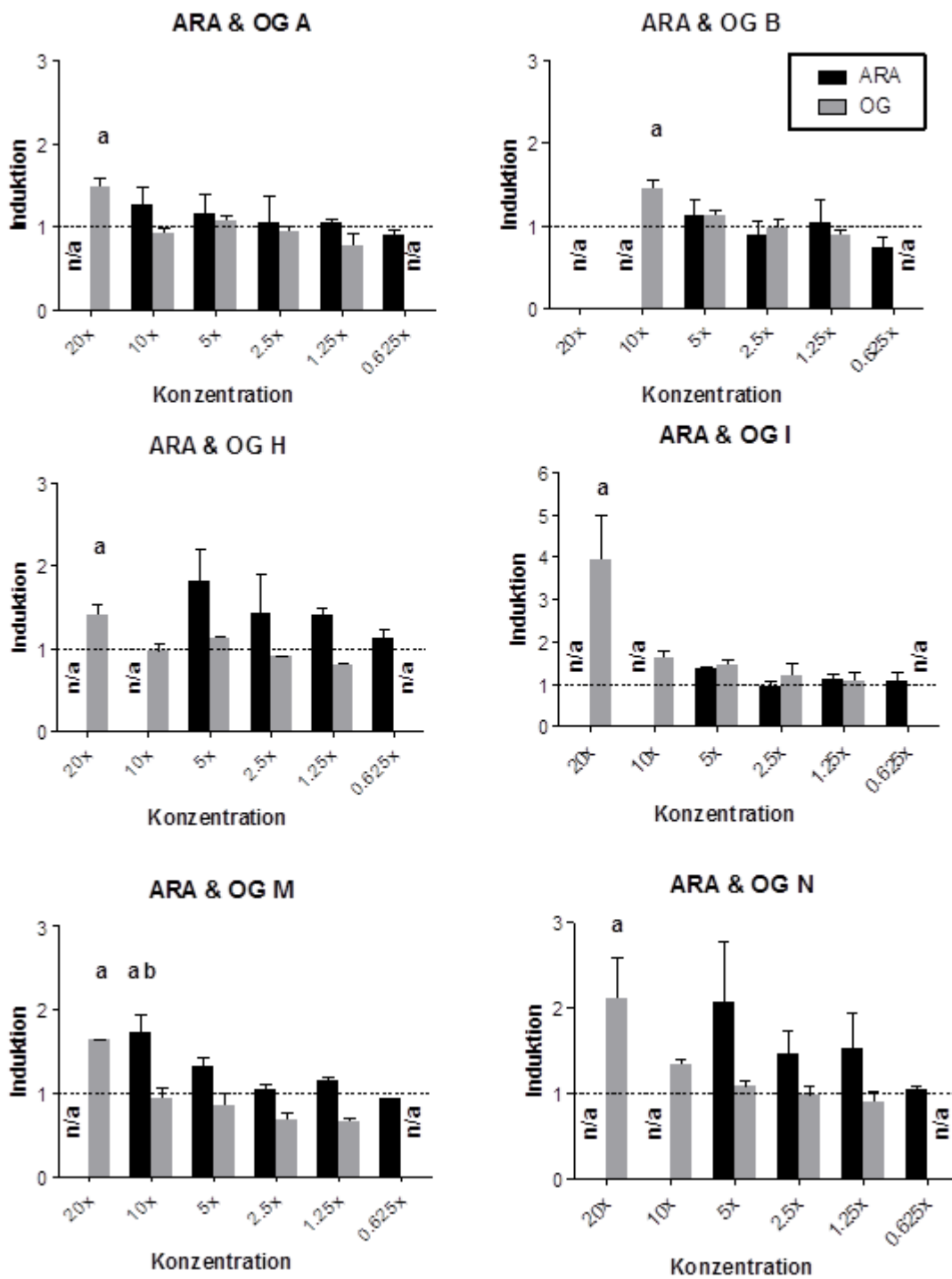


Abb. 14: Relative Induktion der Produktion von Estradiol in H295R-Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten + SEM (sechs technische Replikate); Negativkontrolle = 1; n/a = nicht getestet; Statistische Analyse: One Way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc Test, a = Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle, b = Signifikanter Unterschied zwischen ARA und OG; $p \leq 0.05$ (aus Floehr et al., 2011).



H295R – Induktion/Hemmung der Bildung von Testosteron

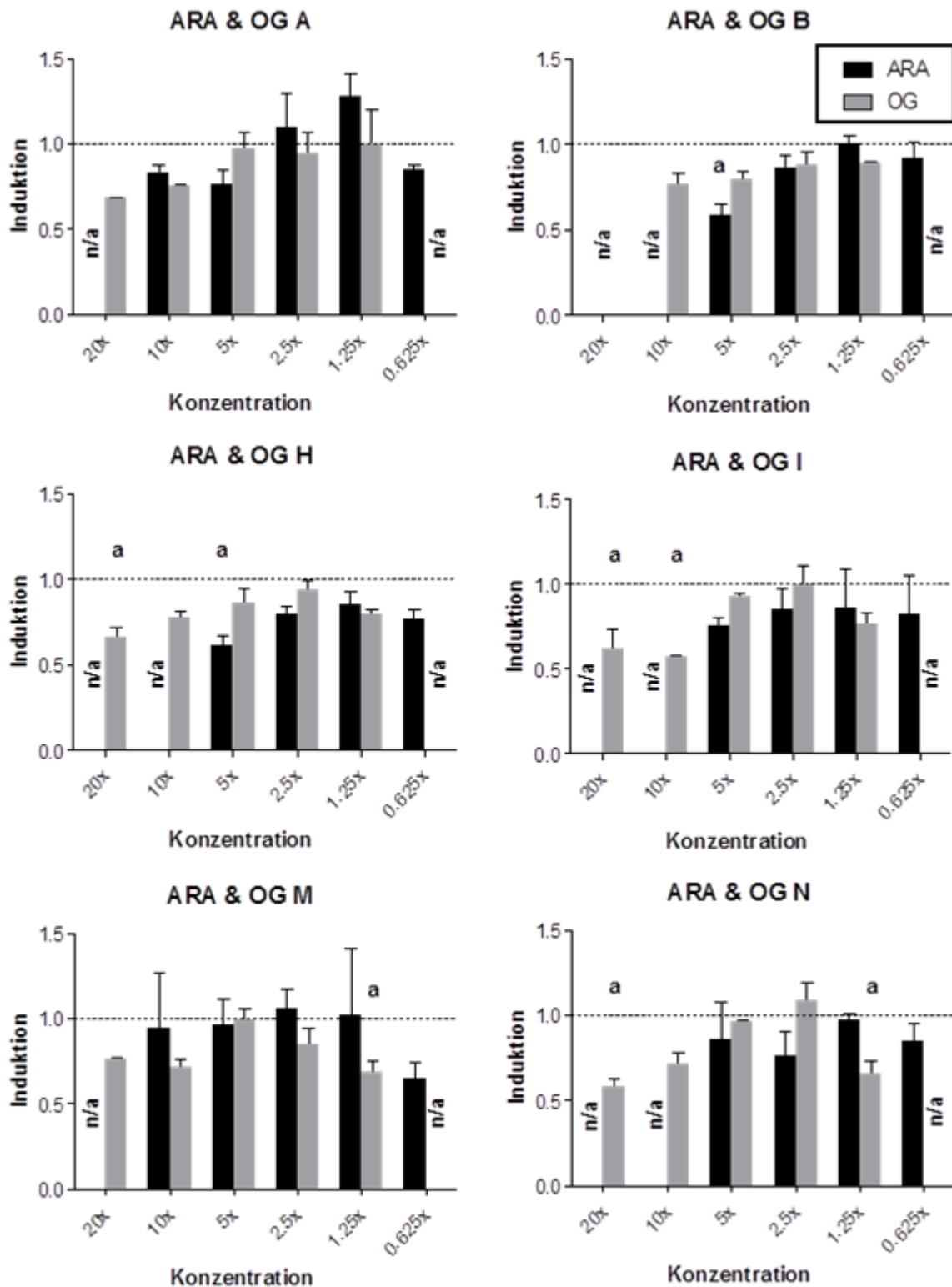


Abb. 15: Relative Induktion der Produktion von Testosteron in H295R-Zellen nach Exposition mit aufkonzentrierten Proben aus ARA-Abläufen und angrenzenden Oberflächengewässern (OG); Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten + SEM (sechs technische Replikate); Negativkontrolle = 1; n/a = nicht getestet; Statistische Analyse: One Way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc Test, a = Signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle, b = Signifikanter Unterschied zwischen ARA und OG; $p \leq 0.05$ (aus Floehr et al., 2011).



Tabellen mit den Ergebnissen der Östrogenanalytik

Tab. 21: Wiederfindungsraten für die in der chemischen Analytik (mit LC-MS/MS) gemessenen Östrogene.

	E1	E2	EE2	BPA
Zugespikte Konzentration, ng/L	10	10	10	50
Wiedergefundene Konzentration, ng/L	9.6	10.4	9.5	49.4
Wiederfindungsrate in %	96.0	104.0	95.0	98.8

Tab. 22: Konzentrationen verschiedener Östrogene (ng/L). Die Substanzen wurden mit LC-MS/MS gemessen. MW $\pm$ SD, n = 2.

Substanz		Nonylphenol (NP) (ng/L)	Bisphenol-A (BPA) (ng/L)	Estron (E1) (ng/L)	Estradiol (E2) (ng/L)	Ethinylestradiol (EE2) (ng/L)	EEQ f. YES (ng/L)	EEQ f. ER-CALUX® (ng/L)
ARA	LOQ, ng/L	22.9	4.9	0.6	1.1	6.1		
ARA-Zuläufe								
A	MW	558.9	879.0	33.4	18.8	<6.1	32.24	20.66
	SD	62.0	56.9	0.9	9.2	-		
G	MW	464.6	902.3	38.8	11.4	<6.1	27.00	13.55
	SD	95.8	10.8	1.4	1.0	-		
H	MW	824.2	759.2	44.0	10.3	<6.1	28.00	12.78
	SD	260.5	28.7	1.2	1.8	-		
I	MW	566.1	552.5	42.7	8.2	<6.1	25.36	10.63
	SD	33.2	26.2	1.0	0.4	-		
M	MW	698.1	415.7	72.7	<2.8	<6.1	29.14	4.09
	SD	135.4	5.1	4.3	-	-		
N	MW	376.5	>500	38.5	9.1	<6.1	24.55	11.26
	SD	61.2	-	0.9	0.9	-		
ARA-Abläufe								
A	MW	353.5	>500	2.4	<1.1	<3.2	1.03	0.15
	SD	46.3	-	0.1	-	-		
B	MW	288.5	132.7	1.7	<1.1	<3.2	0.69	0.10
	SD	44.7	10.0	0.2	-	-		
C	MW	555.7	236.0	20.5	<1.1	<3.2	8.23	1.16
	SD	39.5	8.7	0.3	-	-		
D	MW	410.9	140.6	5.7	<1.1	<3.2	2.32	0.33
	SD	18.9	11.6	0.3	-	-		
E	MW	264.3	280.6	16.3	2.4	<3.2	8.90	0.92
	SD	146.0	132.1	0.4	0.6	-		
F	MW	438.6	81.9	4.9	<1.1	<3.2	1.97	0.28
	SD	98.7	2.4	0.2	-	-		
G	MW	222.3	229.3	2.5	<1.1	<3.2	1.01	0.14
	SD	10.5	12.1	0.3	-	-		
H	MW	>500	292.7	15.8	2.6	<3.2	8.93	3.45
	SD	-	30.2	0.5	0.9	-		
I	MW	176.1	271.5	5.9	1.7	<3.2	4.12	2.05
	SD	36.3	19.5	0.5	0.3	-		
K	MW	556.3	102.6	7.3	<1.1	<3.2	2.95	0.42
	SD	42.5	4.4	0.3	-	-		
L	MW	179.4	861.2	16.4	<1.1	<3.2	6.67	0.93



	SD	5.9	88.9	0.2	-	-		
M	MW	>500	55.6	3.9	<1.1	<3.2	1.57	0.23
	SD	-	2.5	0.2	-	-		
N	MW	155.3	585.8	3.8	<1.1	<3.2	1.61	0.22
	SD	46.8	34.6	0.2	-	-		
O	MW	381.0	407.0	3.6	<1.1	<3.2	1.51	0.22
	SD	53.7	3.6	0.1	-	-		
Oberflächengewässer vor ARA								
A	MW	52.1	129.8	0.7	<1.1	<3.0	0.29	0.04
	SD	-	108.3	0.0	-	-		
B	MW	117.6	70.6	<0.6	<1.1	<3.0	0.01	0.00
	SD	26.2	44.8	-	-	-		
H	MW	<22.9	5.7	<0.6	<1.1	<3.0	0.00	0.00
	SD	-	0.5	-	-	-		
H	MW	<22.9	106.8	<0.6	<1.1	<3.0	0.01	0.00
	SD	-	2.1	-	-	-		
H	MW	<22.9	28.8	4.4	<1.1	<3.0	1.74	0.24
	SD	-	9.1	0.2	-	-		
I	MW	<22.9	38.3	<0.6	<1.1	<3.0	0.00	0.00
	SD	-	7.3	-	-	-		
M	MW	46.2	16.8	<0.6	<1.1	<3.0	0.00	0.00
	SD	-	-	-	-	-		
N	MW	32.1	19.1	0.8	<1.1	<3.0	0.31	0.04
	SD	13.0	4.1	0.2	-	-		
Oberflächengewässer nach ARA								
A	MW	203.7	232.0	0.9	<1.1	<3.0	0.40	0.06
	SD	124.1	3.5	0.1	-	-		
B	MW	395.1	131.1	2.3	<1.1	<3.0	0.95	0.14
	SD	148.3	2.8	0.2	-	-		
C	MW	25.2	26.2	<0.6	<1.1	<3.0	0.00	0.00
	SD	-	3.5	-	-	-		
H	MW	<22.9	103.7	3.2	<1.1	<3.0	1.28	0.18
	SD	-	10.6	0.2	-	-		
I	MW	92.8	165.5	2.7	<1.1	<3.0	1.08	0.15
	SD	54.3	2.6	0.2	-	-		
K	MW	<22.9	53.2	4.2	1.6	<3.0	3.29	1.84
	SD	-	2.6	0.2	0.0	-		
L	MW	<22.9	41.6	1.0	<1.1	<3.0	0.41	0.06
	SD	-	1.5	0.1	-	-		
M	MW	293.9	25.9	1.8	<1.1	<3.0	0.74	0.11
	SD	53.4	4.6	0.1	-	-		
N	MW	<22.9	70.3	1.3	<1.1	<3.0	0.51	0.07
	SD	-	5.8	0.2	-	-		



Tabellen mit Ergebnissen des Screenings auf 80 Mikroverunreinigungen im Rahmen des Projektes Strategie Micropoll

Tab. 23: Positivbefunde der analysierten Substanzen in den untersuchten Kläranlagenproben (aus Götz et al., 2010b).

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Ordnung BG (ng/L)	ARA-Abläufe; Konzentration (ng/L)										Anzahl Befunde je Wirkstoff	Höchste Konzentration je Wirkstoff
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
Pharmazeutika	Atenolol*	5,0	570	710	1500	670	1500	800	900	1700	860	970	10	1700
	Azithromycin*	5,0	(82)	(210)	(150)	(150)	(240)	(140)	(260)	(260)	(45)	(180)	10	(260)
	Bezafibrat*	5,0	49	59	160	53	320	470	270	1500	190	33	10	1500
	Carbamazepin*	10	340	500	360	400	640	360	200	380	350	460	10	640
	Cetirizin	10	34	64	77	40	72	37	52	90	57	30	10	90
	Clarithromycin*	15	390	360	310	150	470	250	580	1200	360	410	10	1200
	Clindamycin	35	(150)	(160)	(150)	(160)	(98)	(110)	(140)	(130)		(140)	9	(160)
	Codein	25	33	58	250	58	350	110	160	370	160	140	10	370
	Diazepam*	15						20					1	20
	Diclofenac*	5,0	1000	1300	1200	790	2100	830	380	810	1500	1000	10	2100
	Eprosartan*	15	19		460	100	570	150	300	750	770		8	770
	Furosemid	90	(180)	(100)	(260)	(170)	(140)	(220)	(110)	(130)	(360)		9	(360)
	Gabapentin*	1000	1800	1900	2500	1100	2400	2400	2300	1500		1300	9	2500
	Hydrochlorothiazid*	70	1100	1900	1400	1000	2300	1000	1000	1300	1200	1200	10	2300
	Ibuprofen*	1600						(2200)					1	(2200)
	Indomethacin*	10	120	66	93	52	140	95	90	120	46	43	10	140
	Iohexol*	500		(3000)									3	>4000
	Iomeprol ^{1,2} + Iopamidol ²	3000					>8000	>8000	>8000	>8000			4	>8000
	Iopromid	250	>4000	>4000	>4000			>4000	3600	>4000		(1400)	7	>4000
	Irbesartan ¹	1000	(1400)* ¹						(2600)* ¹	(2700)* ¹	(2400)* ¹		4	(2700)* ¹
	Ketoprofen	50	110	56	240	110	250	150	160	200	140	79	10	250
	Lamotrigin	10	410	760	390	170	450	120	280	140	400	630	10	760
	Levetiracetam*	100	210	150	540	160	190	350	600	1200	980	120	10	1200
	Lidocain*	10	290	310	290	94	250	230	170	120	110	220	10	310
	Losartan	600							(750)		(850)		2	(850)
	Mefenaminsäure*	10	42	96	260	210	400	330	660	1400	1200	85	10	1400
	Metformin*	10	>4000	3400	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	1900	10	>4000
	Metoclopramid	50					74						1	74
	Metoprolol*	20	240	510	390	110	810	300	300	370	860	330	10	860
	Metronidazol	50		110	200	100	110	160	310	110	150	54	9	310
	Moclobemid	10		18	34		27	13				26	5	34
	Morphin	30		41	760	91	120	200	210	110	58	(31)	9	760
	Naproxen	100	290	170	500	200	320	110	280	300	900		9	900
	Oxazepam	10	360	250	470	180	180	270	380	430	190	120	10	470
	Paracetamol*	450								1800			1	1800
	Phenazon (Antipyrin)*	10	20	35	23	39	160				24		6	160
	Primidon*	150					340			200			2	340
	Propranolol*	10	90	130	97	69	230	59	93	150	65	61	10	230
	Ranitidin*	5,0	72	110	220	78	150	170	190	80	50	79	10	220
	Ritonavir*	30	(35)	(35)	95		(31)	40	47				6	95
	Roxithromycin	5,0						1100	(21)				2	1100
	Sotalol*	5,0	140	480	300	140	640	410	330	330	550	210	10	640
	Sulfadiazin*	10			(12)			(12)					2	(12)
	Sulfamethoxazol*	10	180	300	560	110	250	240	380	77	190	390	10	560
	Sulfapyridin*	20	160	120	170	61	140	75	130	50	70	200	10	200
	Tramadol ^{1,2} + O-Desvenlafaxin ^{1,2}	10	990	1700	1300	720	1500	780	1200	1000	850	940	10	1700
	Trimethoprim	5,0	240	110	240	50	240	69	120	58	150	160	10	240
	Valsartan*	500			2200	620	1700	2100	1600	2900	1600		7	2900
	Venlafaxin*	5,0	280	500	370	150	350	200	290	260	210	240	10	500
	Verapamil*	15	16	24	19		28	200	23		47		7	200
Pharmazeutika-Metabolite	4-Acetamidoantipyrin (=N-Acetyl-4-Aminoantipyrin)	10	1900	2400	2900	1600	>4000	670	290	270	920	1300	10	>4000
	4-Aminopyrin (=4-Aminoantipyrine)	1400	(2000)	(3400)	(2500)	(1400)	(>4000)						5	(>4000)
	4-Formyl-aminoantipyrin	10	870	820	1200	690	1900	270	180	190	310	610	10	1900
	Atenololsäure (Metoprololsäure)	20	1200	450	2000	660	2300	510	1900	2500	3400	810	10	3400
	Carbamazepin-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy	25	1100	1200	1000	1100	1300	790	610	870	1200	1300	10	1300
	Carbamazepin-10,11-epoxid*	45	79	100	94	72	130	77	46	85	110	89	10	130
	Clofibrinsäure*	10					35	1500					3	1500
	D617	5,0	36	110	66	58	150	89	51	73	160	47	10	160
	Fenofibrinsäure	5,0	17	31	98	38	77	190	240	330	34	9.1	10	330
	N,O-Didesvenlafaxin*	150	230	290	230		230	150	180			150	7	290
	N4-Acetyl-Sulfamethoxazol*	8	400	44	(22)	(24)		(14)	29	(17)	46		8	400
	N-Desvenlafaxin*	25	58	92	58		51	35	39	46		33	8	92
	Ranitidin-N-oxid	5,0	10	21	6.1	12		17	26				6	26
	Ranitidin-S-oxid	25		(68)	(46)		(42)	140	(67)		(30)		6	140
Biozide	Valsartansäure*	80	340	950	130	87	950	140	87			1000	8	1000
	Carbendazim*	15	35	38	41	33	50	34	22	36	35	49	10	50
	Diuron*	10			(13)	52	(26)					33	4	52
	N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET)*	10	63	110	290	>4000	88	48	140	110	250	100	10	>4000
	Terbutryn*	5,0	14					29				19	3	29
Sonstige	Triclosan*	30	(37)	(45)	(190)	(110)	(160)	(47)	(150)	(82)	(230)	(38)	10	(230)
	2,7-Naphthalindisulfonsäure	400	520			2900	1100	400				680	5	2900
	2-Naphthalinsulfonsäure	50	110		89	370	86	72	230	160	100	100	9	370
	5-Methyl-Benzotriazol ¹ + ¹	500	(>4000)	n.q.* ¹	(>4000)	(>4000)	n.q.* ¹	n.q.* ¹	(>4000)	(>4000)	(>4000)	n.q.* ¹	6	(>4000)
	Benzotriazol ¹ + ¹	1000	(>4000)	(>4000)	n.q.* ¹	(>4000)	n.q.* ¹	n.q.* ¹	(>4000)	(>4000)	(>4000)	n.q.* ¹	6	(>4000)
	Acesulfam*	50	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	10	>4000
	Sucralose*	50	2800	3500	3300	3100	>4000	2400	2600	3500	1800	2800	10	>4000
	Benzophenon 3 (=2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon)	50								140	230	100	3	230
	Climbazol	150	230						160		240		3	240
Sonstige	Galaxolidon	500	770	790	600	550	930	1500	990	840	610	1000	10	1500
	Coffein*	250						250		>4000	750		3	>4000

BG = Bestimmungsgrenze; 0 = Befunde mit 5.5 IP; (0) = Befunde mit 2 IP; * = eigener isotonenmarkierter Standard vorhanden; *1 = exakte Quantifizierung durch Probenmatrix behindert; *2= Substanzen können nur als Summe quantifiziert werden; n.b. = nicht bestimmbar; n.q.= nicht quantifizierbar



Tab. 24: Auflistung aller analysierten Substanzen in den untersuchten Kläranlagenproben (inkl. Substanzen, die nicht gefunden wurden) (aus Götz et al., 2010b).

Pharmazeutika			ARA-Abläufe / Konzentrationen (ng/L)										
Wirkstoff	CAS-Nr	Wirkstoff-Untergruppe	Orbitrap BG ng/L	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4-Dimethylaminoantipyrin	58-15-1	Analgetikum	60										
Atenolol*	29122-68-7	Betablocker	5.0	570	710	1500	670	1500	800	900	1700	860	970
Azithromycin*	83905-01-5	Antibiotikum	5.0	(82)	(210)	(150)	(150)	(240)	(140)	(260)	(260)	(45)	(180)
Bezafibrat*	41859-67-0	Lipidsenker	5.0	49	59	160	53	320	470	270	1500	190	33
Carbamazepin*	298-46-4	Antiepileptikum	10	340	500	360	400	640	360	200	380	350	460
Cetirizin	83881-52-1	Antihistaminikum	10	34	64	77	40	72	37	52	90	57	30
Clarithromycin*	81103-11-9	Antibiotikum	15	390	360	310	150	470	250	580	1200	360	410
Clindamycin	18323-44-9	Antibiotikum	35	(150)	(160)	(150)	(160)	(98)	(110)	(140)	(130)		(140)
Codein	76-57-3	Antitussivum, Opiat	25	33	58	250	58	350	110	160	370	160	140
Cyclophosphamid*	50-18-0	Zytostatikum	10										
Cytarabin	147-94-4	Zytostatikum	75										
Dexamethason*	50-02-2	Glucocorticoid	10										
Diazepam*	439-14-5	Antikonvulsivum	15						20				
Diclofenac*	15307-86-5	Analgetikum	5.0	1000	1300	1200	790	2100	830	380	810	1500	1000
Eprosartan*	133040-01-4	Antihypertensivum	15	19		460	100	570	150	300	750	770	
Ethambutol	1070-11-7	Antibiotikum	1000										
Exemestan	107868-30-4	Aromatasehemmer	20										
Fenofibrat	49562-28-9	Lipidsenker	100										
Fluconazol*	86386-73-4	Antifungal	50										
Fluoxetin*	54910-89-3	Antidepressivum	20										
Furosemid	54-31-9	Schleifendiuretikum	90	(180)	(100)	(260)	(170)	(140)	(220)	(110)	(130)	(360)	
Gabapentin*	60142-96-3	Antiepileptikum	1000	1800	1900	2500	1100	2400	2400	2300	1500		1300
Gemcitabin*	95058-81-4	Zytostatikum	50										
Gentamicin	1403-66-3	Antibiotikum	1600										
Hydrochlorothiazid*	58-93-5	Schleifendiuretikum	70	1100	1900	1400	1000	2300	1000	1000	1300	1200	1200
Ibuprofen*	15687-27-1	Analgetikum	1600						(2200)				
Ifosfamid	3778-73-2	Zytostatikum	10										
Indomethacin*	53-86-1	Analgetikum	10	120	66	93	52	140	95			46	43
Iohexol*	66108-95-0	Kontrastmittel	500		(3000)					>4000	(940)		
Iomeprol ² + Iopamidol ²	78649-41-9 / 62883-00-5	Kontrastmittel	3000					>8000	>8000	>8000	>8000		
Iopromid	73334-07-3	Kontrastmittel	250	>4000	>4000	>4000			>4000	3600	>4000		(1400)
Irbesartan ¹	138402-11-6	Antihypertensivum	1000	(1400)* ¹						(2600)* ¹	(2700)* ¹	(2400)* ¹	
Ketoprofen	22071-15-4	Analgetikum	50	110	56	240	110	250	150	160	200	140	79
Lamotrigin	84057-84-1	Antiepileptikum	10	410	760	390	170	450	120	280	140	400	630
Levetiracetam*	102767-28-2	Antiepileptikum	100	210	150	540	160	190	350	600	1200	980	120
Lidocain*	137-58-6	Lokalanästhetikum	10	290	310	290	94	250	230	170	120	110	220
Losartan	114798-26-4	Antihypertensivum	600							(750)		(850)	
Mefenaminsäure*	61-68-7	Analgetikum	10	42	96	260	210	400	330	660	1400	1200	85
Metformin*	657-24-9	Antidiabetikum	10	>4000	3400	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	1900
Methylprednisolon	83-43-2	Glucocorticoid	25										
Metoclopramid	7232-21-5	Antiemetikum	50					74					
Metoprolol*	37350-58-6	Betablocker	20	240	510	390	110	810	300	300	370	860	330
Metronidazol	443-48-1	Antibiotikum	50		110	200	100	110	160	310	110	150	54
Moclobemid	71320-77-9	Antidepressivum	10		18	34		27	13				26
Morphin	57-27-2	Narkotikum	30		41	760	91	120	200	210	110	58	(31)
Naproxen	22204-53-1	Analgetikum	100	290	170	500	200	320	110	280	300	900	
Oseltamivir	196618-13-0	Antiviral	10										
Oxazepam	604-75-1	Sedativum	10	360	250	470	180	180	270	380	430	190	120
Paracetamol*	103-90-2	Analgetikum	450								1800		
Phenazon (Antipyrin)*	60-80-0	Analgetikum	10	20	35	23	39	160				24	
Prednisolon	50-24-8	Glucocorticoid	5.0										
Primidon*	125-33-7	Antiepileptikum	150					340			200		
Propranolol*	525-66-6	Betablocker	10	90	130	97	69	230	59	93	150	65	61
Ranitidin*	66357-35-5	Ulkustrapeutika	5.0	72	110	220	78	150	170	190	80	50	79
Ritonavir*	155213-67-5	Antiviral	30	(35)	(35)	95		(31)	40	47			
Roxithromycin	80214-83-1	Antibiotikum	5.0						1100	(21)			
Sotalol*	3930-20-9	Betablocker	5.0	140	480	300	140	640	410	330	330	550	210
Sulfadiazin*	68-35-9	Antibiotikum	10			(12)			(12)				
Sulfadimethoxin*	122-11-2	Antibiotikum	10										
Sulfamethazin*	57-68-1	Antibiotikum	20										
Sulfamethoxazol*	723-46-6	Antibiotikum	10	180	300	560	110	250	240	380	77	190	390
Sulfapyridin*	144-83-2	Antibiotikum	20	160	120	170	61	140	75	130	50	70	200
Sulfathiazol*	72-14-0	Antibiotikum	5.0										
Thiopental	76-75-5	Antikonvulsivum	500										
Tramadol ^{1,2} (+ O-Desvenlafaxin ^{1,2})	27203-92-5	Analgetikum	10	990	1700	1300	720	1500	780	1200	1000	850	940
Trimethoprim	738-70-5	Analgetikum	5.0	240	110	240	50	240	69	120	58	150	160
Tylosin	1401-69-0	Analgetikum	30										
Valsartan*	137862-53-4	Analgetikum	500			2200	620	1700	2100	1600	2900	1600	
Venlafaxin*	93413-69-5	Antidepressivum	5.0	280	500	370	150	350	200	290	260	210	240
Verapamil*	152-11-4	Calciumantagonist	15	16	24	19		28	200	23		47	