

# TOXIZITÄT VON MISCHUNGEN

## AKTUELLE, PRAXISORIENTIERTE ANSÄTZE FÜR DIE BEURTEILUNG VON GEWÄSSERPROBEN

In den letzten Jahren wurden verschiedene praxisorientierte Ansätze zur Berücksichtigung von Mischungstoxizität in der Risikobewertung entwickelt. Die Bedeutung dieser neuen Ansätze wie auch ihre Anwendbarkeit für die Beurteilung der Gewässerqualität werden hier anhand von Beispielen aus der Praxis vorgestellt.

Marion Junghans; Petra Kunz; Inge Werner,  
Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL

### RÉSUMÉ

#### TOXICITÉ DES MÉLANGES – APPROCHES ACTUELLES ORIENTÉES VERS LA PRATIQUE POUR L'ÉVALUATION DES ÉCHANTILLONS D'EAU

Dans le cadre d'un atelier ayant pour objet «Les conséquences des mélanges chimiques sur l'environnement et l'homme et leur évaluation» mené en 2010, les participants des domaines scientifiques, officiels et industriels ont demandé aux experts de développer des recommandations applicables en pratique pour l'évaluation de la toxicité des mélanges. Au cours des dernières années, nombre de ces recommandations ont été réalisées. Diverses organisations et des scientifiques individuels ont développé plusieurs approches généralistes permettant la prise en compte de la toxicité des mélanges selon différentes réglementations lors de l'évaluation des risques. Des méthodes ont également été publiées taillées sur mesure sur les réglementations choisies. Seules quelques approches seront présentées ici concernant l'intégration de la toxicité des mélanges dans l'évaluation de la qualité des eaux de surface. À cet usage, une approche généraliste est simplifiée et complétée pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Une partie essentielle de ce complément réside dans la prise en compte des résultats d'essais in vitro. Puis, un échantillon réel d'eaux usées permet d'illustrer une telle évaluation de la toxicité des mélanges. Elle tendrait à prouver que la prise en compte commune des analyses chimiques et biologiques permettrait d'obtenir une meilleure évaluation des risques concernant les mélanges.

### AUSGANGSLAGE

Im November 2010 führte das Schweizerische Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL (Ökotoxzentrum) in Zusammenarbeit mit dem Schweizerischen Zentrum für angewandte Humantoxikologie (SCAHT) einen Workshop zum Thema «Auswirkungen von Chemikalienmischungen auf Umwelt und Mensch und ihre Beurteilung» durch [1]. Das Interesse war gross, und die Veranstaltung sprach Fachleute aus Behörden, Industrie und Forschung gleichermaßen an. Viele Teilnehmer beschäftigte die Frage, wie relevant eine Risikobewertung ist, die alleine die Toxizität von Einzelstoffen beurteilt. Experten aus dem In- und Ausland berichteten über den Stand des Wissens zu Mischungseffekten und deren (mögliche) Berücksichtigung in der Regulatorik. Während des gesamten Workshops wurde deutlich, dass für die Untersuchung und Beurteilung von Substanzmischungen bereits ein breites, wissenschaftlich fundiertes Wissen vorhanden ist, dessen Umsetzung sich in der Praxis aber schwierig gestaltet. Eine umfassende, bedürfnisorientierte Anleitung für Fachleute aus der Praxis existierte 2010 nicht. Eine solche Anleitung forderte jedoch die überwiegende Mehrheit der Workshop-Teilnehmer. Es wurde als besonders wichtig erachtet, praxistaugliche Lösungsvorschläge und Hilfestellungen für folgende Bereiche zu entwickeln [1]:

\*Kontakt: Marion.Junghans@oekotoxzentrum.ch

- Richtlinien und Wegleitungen für die Risikobewertung und Regulatorik
- Anwendung, Umsetzbarkeit und Validierung von mischungsrelevanten Biotests

Der vorliegende Artikel soll anhand einiger Projekte aufzeigen, welche Fortschritte in den letzten Jahren gemacht wurden. Dabei liegt der Fokus auf der Beurteilung von Risiken für aquatische Ökosysteme. Zunächst werden aktuelle Ansätze zu den oben genannten Bereichen vorgestellt und anschliessend anhand eines realen Fallbeispiels illustriert. Am Ende werden Schlussfolgerungen gezogen und Empfehlungen für weitere Verbesserungen gegeben.

## AKTUELLE ANSÄTZE

### RICHTLINIEN UND PRAXISTAUGLICHE WEGLEITUNGEN

Zur Vorhersage der Mischungstoxizität haben sich in den letzten Jahrzehnten zwei Konzepte bewährt: einerseits das der Konzentrationsadditivität (*concentration addition*, CA) für ähnlich wirkende Substanzen und andererseits das der Unabhängigen Wirkung (*independent action*, IA) für Mischungen aus Substanzen, die über unterschiedliche Wirkmechanismen denselben Effekt hervorrufen (z. B. Tod oder Wachstumshemmung eines Testorganismus) [1]. Die beste Vorhersagequalität hatten die beiden Konzepte jeweils für Mischungen ausschliesslich ähnlich wirkender (CA) bzw. unähnlich wirkender (IA) Substanzen (Studien in [2] zitiert). In vielen realistischen Mischungen sind jedoch sowohl ähnlich wirkende Substanzen als auch unähnlich wirkende Substanzen enthalten, sodass eine exakte Vorhersage der Mischungstoxizität meist nicht möglich ist. Darüber hinaus sind für die überwiegende Anzahl der Umweltchemikalien Informationen über deren Wirkmechanismus lückenhaft oder gar nicht vorhanden. Im Workshop wurde daher bemängelt, dass die damals zur Verfügung stehenden Bewertungsmethoden zur Beurteilung der Umwelttoxizität von in Gewässerproben nachgewiesenen chemischen Substanzen für die regulatorische Anwendung zu komplex seien. Dies mache deren routinemässige Anwendung wegen des hohen Zeitaufwands und der daraus resultierenden Kosten in vielen Fällen unmöglich. Wissenschaftlich fundierte und praxistaugliche Lösungen wurden gewünscht.

Dieser Bedarf wurde international in der Regulatorik und der regulatorischen Forschung erkannt. In den vergangenen Jahren wurden daher eine Reihe von pragmatischen und gestuften Methoden zur Beurteilung der Mischungstoxizität entwickelt, die (ganz oder zumindest in den ersten Stufen) sich allein auf die Daten stützen, die unter den jeweiligen Gesetzen und Verordnungen bereits für die Einzelstoffe erhoben werden. Den Anfang dieser pragmatischen Ansätze machte ein Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2009 (Zitat in [3]). Der Bericht ist das Ergebnis eines internationalen Workshops, der im Rahmen des internationalen Programms zur Chemikaliensicherheit (IPCS) der WHO veranstaltet wurde. Zwei Jahre später wurde von drei wissenschaftlichen Kommissionen der EU ein Entscheidungsbaum zur Beurteilung der Toxizität von chemischen Mischungen veröffentlicht (Zitat in [3]). Zu dieser Zeit begann eine Expertengruppe unter dem Europäischen Rat des Verbandes der chemischen Industrie (*Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique*, Cefic) ebenfalls mit der Entwicklung eines Entscheidungsbaums. Dieser im Jahr 2012 veröffentlichte Entscheidungsbaum vereinigte schliesslich die Ansätze der WHO/IPCS und der wissenschaftlichen Kommissionen der EU [3] und zielt darauf ab, mit recht wenig Aufwand jene Gewässerproben zu identifizieren, bei denen die Einzelstoffbeurteilung zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Risikos führen könnte. So können die zur Verfügung stehenden Ressourcen auf die detailliertere Analyse der potenziell kritischen Proben fokussiert werden. Alle drei Ansätze sind sehr allgemein gehalten und gelten sowohl für die Human- als auch für die Ökotoxikologie. Inzwischen sind zusätzlich auch Methoden vorgeschlagen worden, die auf spezielle Regulationen zugeschnitten sind (z. B. REACH [4] und die Zulassung von Bioziden [5]).

Alle diese Ansätze und Methoden basieren (zunächst) auf der Verwendung von CA als Standardkonzept. Dies entspricht dem Vorsorgeprinzip: Wenn die Wirkmechanismen der Substanzen entweder nicht bekannt oder nicht komplett unähnlich sind, führt CA in der Regel zu einer Überschätzung der Toxizität, während IA die Toxizität meist unterschätzt [2]. Die mögliche Überschätzung der Toxizität ist maximal, wenn alle Substanzen in Kon-

zentrationen vorliegen, die dieselbe Effektkraft auslösen (z. B. 50% Mortalität) [2]. Solche «equitoxischen» Mischungen sind allerdings unrealistisch. Bei umweltrelevanten Mischungen dominiert meist die Toxizität einiger weniger Substanzen, sodass das Ausmass der möglichen Überschätzung erheblich kleiner ist. So ergab eine Literaturanalyse für 18 realistische Mischungen in Oberflächengewässerproben mit jeweils drei bis neun Komponenten nur eine mittlere mögliche Überschätzung um den Faktor 1,5 (Minimum 1,01; Maximum 2,48) [2], wenn das CA-Modell ohne Berücksichtigung der Wirkmechanismen angewendet wird. Dies lässt die Verwendung von CA als generellen Ansatz in der Bewertung von Umweltproben sinnvoll erscheinen.

### Entscheidungsbaum zur Risikobewertung von Mischungen in Oberflächengewässern

Das Ökotoxizentrum nahm 2012 an einer Studie teil, in welcher der Entscheidungsbaum der Cefic auf reale Fälle angewendet wurde [6]. Der Entscheidungsbaum ist recht komplex, da er alle regulatorischen Felder berücksichtigt. Daher wurde er in *Figur 1* auf die wesentlichen Stufen zur Beurteilung der Ökotoxizität von Gewässerproben reduziert.

Für Gewässerproben, die in die Kategorie I fallen, besteht bereits mit einer Einzelstoffbewertung ein Risiko: Die Konzentration mindestens einer Substanz überschreitet ihre ökotoxikologischen Qualitätskriterium (QK, Konzentration, bei der keine toxischen Effekte im Gewässer erwartet werden, auch *Environmental Quality Standard* oder EQS genannt). In der EU, wo unter der Wasserrahmenrichtlinie (Richtlinie 2000/60/EG) der chemische Zustand der Gewässer nur mit «gut» oder «nicht gut» beurteilt wird (je nachdem, ob die Qualitätskriterien eingehalten werden oder nicht), würde eine Risikobeurteilung für die Mischung daher keine Änderung der Einstufung bewirken. In der Schweiz (*Tab. 1*) wird jedoch häufig zwischen «sehr gut» und «gut» auf der einen Seite und «mässig», «unbefriedigend» und «schlecht» auf der anderen Seite unterschieden [7]. Daher kann die Beurteilung der Mischung zu einer anderen Klasseneinstufung führen. In jedem Fall sollte man sich bei QK-Überschreitungen einzelner Substanzen zunächst auf Risikoreduktionsmassnahmen dieser Substanzen beschränken.

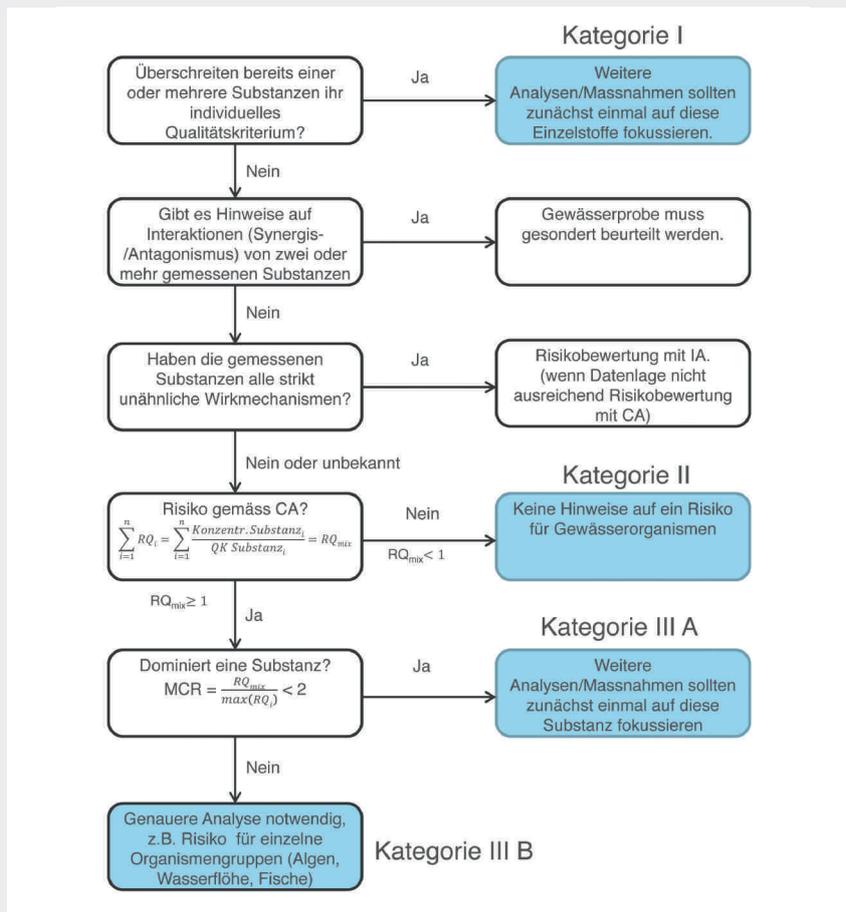


Fig. 1 Entscheidungsbaum zur Beurteilung der Mischungstoxizität in Gewässerproben. Vereinfacht nach [3]. CA = Konzept der Konzentrationsadditivität, IA = Konzept der Unabhängigen Wirkung, QK = Qualitätskriterium, RQ = Risikoquotient (Quotient aus gemessener Konzentration und QK), MCR = Maximum Cumulative Ratio (nach Price und Han 2011, zitiert und erläutert in [3])

Arborescence de décision pour l'évaluation de la toxicité d'un mélange dans des échantillons d'eau. Simplifié selon [3]. CA = concept de l'additivité des concentrations, IA = concept de l'effet indépendant, QK = critère de qualité, RQ = quotient de risque (quotient entre concentration mesurée et QK), MCR = Maximum Cumulative Ratio (selon Price et Han 2011, cité et expliqué dans [3])

Beurteilung	Bedingung/Beschreibung		Einhaltung Qualitätskriterium (CQK)
sehr gut	Die Umweltkonzentration ist 100 mal kleiner als das Qualitätskriterium	$RQ < 0,01$	CQK eingehalten
	Die Umweltkonzentration ist 10 mal kleiner als das Qualitätskriterium	$0,01 \leq RQ < 0,1$	
gut	Die Umweltkonzentration ist kleiner als das Qualitätskriterium	$0,1 \leq RQ < 1$	CQK überschritten (nicht eingehalten)
mässig	Die Umweltkonzentration ist kleiner als das doppelte Qualitätskriterium	$1 \leq RQ < 2$	
unbefriedigend	Die Umweltkonzentration ist kleiner als das zehnfache Qualitätskriterium	$2 \leq RQ < 10$	
schlecht	Die Umweltkonzentration ist gleich oder grösser als das zehnfache Qualitätskriterium	$RQ \geq 10$	

Tab. 1 Wirkungsbasierte Beurteilung der chemischen Wasserqualität für Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser nach Götz und Mitarbeitern [7].

$RQ = \text{Umweltkonzentration} / \text{chronisches Qualitätskriterium (CQK)}$

Évaluation basée sur l'effet de la qualité chimique de l'eau pour les micropolluants issus des déversements communaux selon Götz et collaborateurs [7].

$RQ = \text{concentration environnementale} / \text{critère de qualité chronique (CQK)}$

Gewässerproben der Kategorie II stellen gemäss des Kenntnisstands, aufgrund dessen sie beurteilt werden, kein Risiko dar: Weder die einzelnen Risikoquotienten RQ ( $RQ = \text{Umweltkonzentration} / \text{QK}$ ) noch die Summe aller Risikoquotienten zeigen ein Risiko an. Eine weitere Beurteilung der Mischungstoxizität ist höchstens zur Unterscheidung der Güteklassen «sehr gut» und «gut» notwendig.

In Kategorie III fallen alle Gewässerproben, für die alleine die Risikobeurteilung der Mischung ein Risiko anzeigt. Dabei wird weiter unterschieden, ob eine Substanz die Mischungstoxizität dominiert oder ob mehrere Substanzen ähnlich stark zur vorhergesagten Toxizität beitragen. Im ersteren Fall (Kategorie III A) könnte man weitere Analysen oder Massnahmen im Rahmen eines Risikomanagements auf diese eine Substanz fokussieren. Kategorie III B ist schliesslich die Kategorie, für die eine genauere Analyse der Mischungstoxizität sinnvoll ist. So könnte in solch einem Fall z.B. das Risiko für jede Organismengruppe getrennt bestimmt werden (für QK sind dies meist Algen, Krebstiere und Fische). Ein Vorschlag dafür wird weiter unten vorgestellt.

Anwendung des Entscheidungsbaums

Bei der Anwendung des Entscheidungsbaums auf 559 analysierte Kläranlagenauslauf- und Gewässerproben aus sieben Datensätzen fielen nur 6% der Proben in die Kategorie III B [6]. Das heisst, dass die Beurteilung der Mischungstoxizität für 94% der Proben in maximal fünf Schritten durchgeführt werden konnte, und zwar ausschliesslich aufgrund der gemessenen Konzentration und des bekannten QKs. Der Entscheidungsbaum hat sich damit als ein pragmatischer Ansatz zur ökotoxikologischen Beurteilung von Gewässerproben bezüglich ihrer Mischungstoxizität bewährt. Genauso wie für die Einzelstoffbeurteilung gilt auch hier, dass nur das Risiko von den Substanzen berücksichtigt werden kann, deren Konzentrationen gemessen wurden und für die es QK gibt. Für die sieben untersuchten Datensätze [6] wurden nur für 83% der Analyten QK gefunden (95% Konfidenzintervall: 73% bis 94%). Darüber hinaus waren diese QK nicht alle gleich robust. So wurde z.B. für viele Abbauprodukte dasselbe QK wie für die Ausgangssubstanz angenommen, da für Abbauprodukte in der Regel keine QK vorliegen. Es

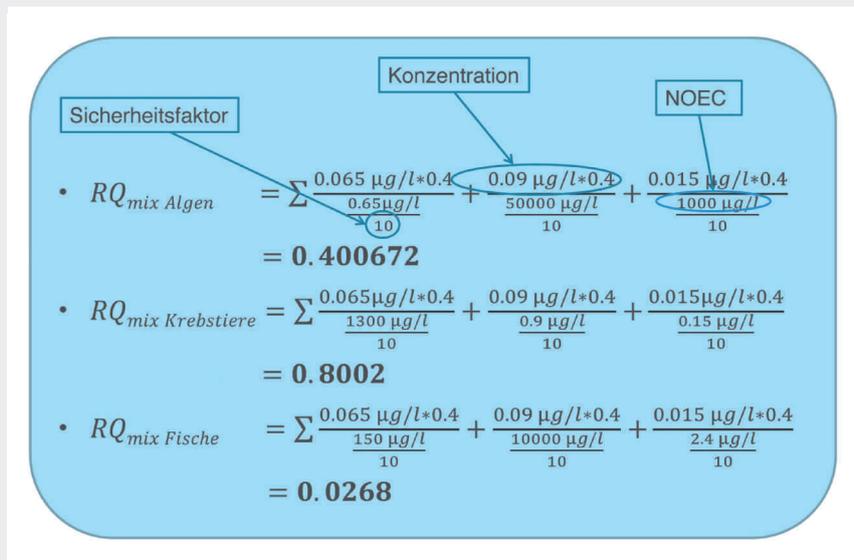
muss also davon ausgegangen werden, dass mit der Risikobewertung basierend auf chemischen Messdaten nicht das Risiko aller in der Gewässerprobe tatsächlich enthaltenen Substanzen erfasst werden kann. Daher ist es auch sinnvoll, ergänzende Biotests durchzuführen.

**Verfeinerung des Risikos:**

besonders betroffene Organismengruppen  
 Zur Veranschaulichung, wie das Wissen um besonders betroffene Organismengruppen helfen kann, den  $RQ_{mix}$  zu verfeinern, sind in *Tabelle 2* chronische CQK (CQK) für drei ausgewählte Substanzen angegeben: Das Herbizid Terbutryn und die Insektizide Pirimicarb und Diazinon. Die CQK wurden mit der Sicherheitsfaktormethode bestimmt. Bei dieser Methode wird der tiefste in der Literatur gefundene chronische Toxizitätswert (*Tab. 2*) durch einen Sicherheitsfaktor geteilt. Wenn für alle drei Organismengruppen (Algen oder Wasserpflanzen, Krebstiere und Fische) jeweils mindestens ein Wert vorliegt, beträgt dieser Faktor in der Regel 10 (die Ableitung von CQK wurde in einer früheren Ausgabe von *Aqua & Gas* bereits beschrieben [8]). In *Tabelle 2* sind daher noch die jeweils tiefsten Toxizitätswerte für die drei Organismengruppen angegeben.

Folgendes lässt sich an dem Beispiel erkennen:

- Für eine Mischung, in der alle drei Pflanzenschutzmittel in der Konzentration vorliegen, die 40% ihres jeweiligen CQK (*Tab. 2*) entspricht, beträgt der RQ also für jede Substanz 0,4 ( $RQ_i = CQK_i \cdot$



Gl. 1 Getrennte Berechnung der Risikoquotienten (RQ) für die drei Organismengruppen Algen, Krebstiere und Fische. Die summierten Risikoquotienten sind jeweils von links nach rechts für Terbutryn, Pirimicarb und Diazinon (siehe Tab. 2)

Calcul séparé des quotients de risque (RQ) pour les trois groupes d'organismes algues, crustacés et poissons. Les quotients de risques ajoutés sont respectivement de gauche à droite pour le terbutryne, pirimicarbe et diazinone (cf. tab. 2)

0,4 /CQK). Keine der drei Substanzen überschreitet als Einzelsubstanz ihr CQK, aber zusammen haben sie gemäss CA-Konzept einen  $RQ_{mix}$  von 1,2 ( $RQ_{mix} = \sum RQ_i$ ), wobei aber keine Substanz dominiert. Nach dem Entscheidungsbaum (*Fig. 1*) handelt es sich daher um eine Kategorie-III-B-Mischung.

- Wenn sich die RQ auf dieselbe Art oder zumindest auf dieselbe Organismengruppe beziehen, kann man davon ausgehen, dass die Anwendung von CA auch für Substanzen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus eine realistische Bestimmung des Risikos der

Mischung ermöglicht [2]. Ist dies nicht der Fall (siehe Beispiel in *Tab. 2*), muss das tatsächliche Risiko für das Gewässer kleiner sein als vorhergesagt. Um dieses zu berücksichtigen, kann man die Risikoquotienten für alle drei Organismengruppen getrennt berechnen (*Gl. 1*).

- Der  $RQ_{mix}$  für Krebstiere (0,8) bestimmt folglich das Risiko für das Gewässer. Mit dieser Verfeinerung des  $RQ_{mix}$  konnte gezeigt werden, dass von der fiktiven Beispielmischung tatsächlich kein Risiko für längerfristige Toxizität im Gewässer ausgeht, auch nicht unter Berücksichtigung der Mischungstoxizität. Interessant ist, dass man zu demselben Ergebnis gekommen wäre, hätte man für jede Organismengruppe nur die RQ addiert, die auf der Toxizität für die jeweilige Organismengruppe beruhen, also für die Algen nur den RQ für Terbutryn ( $RQ_{mix\ Algen} = 0,4$ ) und für Krebstiere die RQ für Pirimicarb und Diazinon ( $RQ_{mix\ Krebstiere} = 0,8$ ).

- In der Praxis sind meist nur die CQK selbst, nicht aber die tiefsten Toxizitätswerte für die jeweiligen Organismengruppen verfügbar. Eine verfeinerte Analyse des  $RQ_{mix}$  ist daher in den allermeisten Fällen gar nicht möglich, jedenfalls nicht ohne Zugriff auf die den CQK zugrundeliegenden Substanzdossiers. Um dennoch eine Verfeinerung zu ermöglichen, wurde vorgeschlagen,

	Terbutryn (Herbizid)	Pirimicarb (Insektizid)	Diazinon (Insektizid)
<b>Organismengruppe</b>	<b>NOEC (µg/l)</b>	<b>NOEC (µg/l)</b>	<b>NOEC (µg/l)</b>
Algen/Wasserpflanzen	0,65	50000	1000
Krebstiere	1300	0,9	0,15
Fische	150	10000	2,4
<b>CQK (µg/l) (tiefster Wert/ Sicherheitsfaktor 10)</b>	<b>0,065</b>	<b>0,09</b>	<b>0,015</b>

Tab. 2 Chronische Qualitätskriterien (CQK) für drei Pflanzenschutzmittel. NOEC: No Observed Effect Concentration, höchste Konzentration, bei der in einem chronischen Test kein signifikanter Effekt beobachtet wurde. Bei den CQK handelt es sich um Vorschläge des Ökotoxizitätszentrums (<http://www.oekotoxizitaetszentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege>)

Critères de qualité chroniques (CQK) pour trois produits phytosanitaires. NOEC: No Observed Effect Concentration, concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet significatif n'a été observé dans un test chronique. Concernant les CQK, il s'agit de propositions de Centre Écotox ([http://www.oekotoxizitaetszentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege/index\\_FR](http://www.oekotoxizitaetszentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege/index_FR))

die QK mit den Organismengruppen zu versehen, für die der jeweilige QK bei einer verfeinerten Mischungsanalyse berücksichtigt werden soll [9]. Wenn der tiefste NOEC für eine Organismengruppe mehr als 10-mal höher ist als der insgesamt tiefste NOEC im Datensatz, wird das QK für den  $RQ_{mix}$  dieser Organismengruppe als vernachlässigbar angesehen und muss nicht addiert werden. Wenn alle Organismengruppen ähnlich empfindlich auf die Substanz reagieren, wird das QK auch für alle Organismengruppen mit berücksichtigt. Gemäss Vorsorgeprinzip gilt dies auch für Organismengruppen, für die kein Toxizitätswert vorliegt. Im Falle von QK, die auf Spezies-Sensitivitäts-Verteilungen (SSD) beruhen [8], gilt dies für alle Organismengruppen, die in der SSD vertreten sind. Der höchste so berechnete Risikoquotient für die Mischung wird  $RQ_{EOS\ taxa}$  genannt [9].

In *Tabelle 3* wurde diese Methode auf reale Gewässerproben [9] angewendet. Bei den drei Proben der Kategorien III A oder

B (Proben 3, 6, 14) sowie bei der Probe der Kategorie II (Probe 4) führte diese Verfeinerung des  $RQ_{mix}$  über den  $RQ_{EOS\ taxa}$  dazu, dass sich die Einstufung der Gewässerqualität (*Tab. 1*) verbesserte.

Zusätzlich sind die Risikoquotienten für die Mischungstoxizität angegeben, die nach der Methode von *Chèvre et al.* [10] berechnet wurden. Diese Methode wurde von einigen kantonalen Behörden in den letzten Jahren zur Bestimmung der Gewässerqualität verwendet.

Für die 14 untersuchten Proben führten beide Methoden zur gleichen Klassierung der Gewässerqualität. Die  $RQ_{EOS\ taxa}$  sind aber in der Regel leicht höher als die  $RQ_{mix}$  nach der Methode von *Chèvre et al.* Der Grund dafür ist, dass bei *Chèvre et al.* nur die RQ für Substanzen mit demselben Wirkmechanismus addiert werden. Diese Methode hält sich also strenger an das CA-Konzept und liefert damit exaktere Vorhersagen des Risikos für Substanzgruppen mit demselben Wirkmechanismus. Der hier beschriebene Entscheidungsbaum und die Berechnung der  $RQ_{EOS\ taxa}$  integriert jedoch über alle Sub-

stanzen, für die Messwerte und QK vorhanden sind – die Kenntnis der Wirkmechanismen ist nicht mehr entscheidend.

#### MISCHUNGSRELEVANTE BIOTESTS: ANWENDUNG, UMSETZBARKEIT, VALIDIERUNG

Zum Testen realer Mischungen, wie z.B. Proben aus Oberflächengewässern unterhalb von Kläranlagen, erwiesen sich *In-vitro*-Biotests als sehr vielversprechend. Diese zeigen die Test-(und damit Endpunkt-) spezifische Gesamt-Toxizität der komplexen Mischung an, die in Toxizitäts-Äquivalenz-Konzentrationen (TEQ) ausgedrückt werden kann. Im Gegensatz zum chemisch-analytischen Ansatz berücksichtigen Biotests sowohl Interaktionen zwischen den Einzelsubstanzen (z.B. Synergismen und Antagonismen) als auch die Toxizität von analytisch nicht erfassten Substanzen. Dies gilt auch für Substanzen, die bereits unterhalb der chemisch-analytischen Nachweisgrenze Effekte in der Umwelt bewirken können, wie z.B. natürliche und synthetische Östrogene. Die vorgeschlagenen QK für besonders aktive Stoffe, wie natürliches 17 $\beta$ -Estradiol (E2) und synthetisches 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2), sind 0,4 ng/l und 0,03 ng/l ([www.oekotox-zentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege](http://www.oekotox-zentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/vorschlaege)). Solche Konzentrationen sind derzeit auch mit aufwendiger chemischer Spurenanalytik kaum oder gar nicht nachweisbar [7].

Methoden zur Risikobewertung von Substanzmischungen, die sich auf chemisch-analytische Daten stützen, sind deswegen für Umweltproben nur bedingt aussagekräftig. *In-vitro*-Biotests bieten die Möglichkeit, diese Bewertungslücke zu schliessen. In einem ergänzenden *In-vitro*-Test kann der Gesamteffekt einer Probe als jene Konzentration einer Referenzsubstanz dargestellt werden, die den gleichen Effekt haben würde wie die Umweltprobe (z.B. [11]). Die Wirkung einer Mischung aus Substanzen mit östrogenem Rezeptorbindungspotenzial kann so als E2-Äquivalenzkonzentration (EEQ) ausgedrückt und anstelle der gemessenen Umweltkonzentration der Einzelsubstanz (*mean environmental concentration*, MEC) mit dem EQS für E2 verglichen werden (*Gl. 2*), um den Risikoquotienten (RQ) für die Mischung zu bestimmen [12].

Verschiedene *In-vitro*-Biotests zum Nachweis östrogen-aktiver Substanzen in Umweltproben wurden international schon vielfach vorgeschlagen (z.B. [13,

Probe	Kategorie	Sume aller RQ	RQ <sub>mix</sub> Organismengruppe			RQ <sub>EOS taxa</sub>	RQ <sub>mix</sub> nach Chèvre et al. 2006
			Algen	Krebstiere	Fische		
1	II	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	0,1
2	II	2,1	1,8	0,4	0,0	1,8	1,7
3	III B	1,9	0,3	0,9	0,8	0,9	0,8
4	II	0,7	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
5	I	3,5	0,3	3,2	0,0	3,2	3,2
6	III A	1,3	0,4	0,8	0,0	0,8	0,8
7	I	9,9	1,3	3,2	5,6	5,6	5,4
8	I	12,9	2,0	6,7	4,8	6,7	6,0
9	I	7,9	2,5	2,5	3,0	3,0	2,9
10	I	8,9	2,6	5,5	1,0	5,5	5,4
11	I	13,8	12,2	1,3	0,3	12,2	10,8
12	I	8,6	6,4	2,3	0,6	6,4	3,9
13	I	3,3	0,8	2,5	0,2	2,5	2,5
14	III B	1,9	0,9	0,8	0,2	0,9	0,8

Tab. 3 Anwendung der  $RQ_{EOS\ taxa}$ -Methode auf reale Messdaten [9]. Zum Vergleich ist der von einigen Kantonen zur Beurteilung der Gewässerqualität berechnete  $RQ_{mix}$  nach *Chèvre et al.* [10] angegeben. Die Kategorien beziehen sich auf *Fig. 1* und die farbliche Klassierung wurde gemäss *Tab. 1* vorgenommen: blau = sehr gut, grün = gut, gelb = mässig, orange = unbefriedigend.

RQ: Risikoquotient,  $RQ_{EOS\ taxa}$  = höchster  $RQ_{mix}$  für die einzelnen Organismengruppen

Utilisation de la méthode  $RQ_{EOS\ taxa}$  sur des données de mesure réelles [9]. En comparaison, le  $RQ_{mix}$  calculé selon *Chèvre et al.* [10] (comme utilisé par quelques cantons pour l'évaluation de la qualité des eaux) est indiqué. Les catégories se rapportent à la *fig. 1* et la classification en couleurs a été réalisée selon le *tab. 1*: bleu = très bon, vert = bon, jaune = moyen, orange = médiocre.

RQ: quotient de risques,  $RQ_{EOS\ taxa}$  =  $RQ_{mix}$  maximal pour les différents groupes d'organismes

14]), angewendet (z.B. [15, 16]) und untereinander verglichen (z.B. [17–19]). Allerdings steht eine Standardisierung solcher Biotests durch die Internationale Organisation für Normung (ISO) oder entsprechende nationale Organisationen (z.B. das Deutsche Institut für Normung, DIN) noch immer aus. Im Rahmen des DIN-Arbeitskreises «Hormonelle Wirkungen/Xenohormone» (Federführung: Bundesanstalt für Gewässerkunde [BFG] in Koblenz, Deutschland) beteiligt sich das Ökotoxzentrum an Ringversuchen und der Ausarbeitung des Norm-Entwurfs. Ziel des Arbeitskreises ist die Evaluation verschiedener Biotests zur Routineüberwachung hormoneller Wirkungen in gereinigtem Abwasser. Die geeigneten Biotests werden dann bei der ISO zur Standardisierung vorgeschlagen. Stimmt eine Mehrheit der nationalen Normungsinstitutionen dem Vorschlag zu und verpflichtet sich eine ausreichende Anzahl der Mitglieder zur aktiven Mitarbeit, so wird der Vorschlag ins Arbeitsprogramm der ISO aufgenommen und innerhalb von vier Jahren die internationale Normierung durchgeführt (siehe dazu auch [20]). Für das Monitoring östrogen-aktiver Substanzen in Küsten- und Oberflächengewässern im Rahmen der EU-Wasserrahmenrichtlinie ist ein ähnliches Vorgehen geplant [12].

Das Ökotoxzentrum nimmt auch im Rahmen des Projektes «Modul-Stufen-Konzept» des BAFU aktiv an diesen Aktivitäten teil und erarbeitet für das Modul «Ökotoxikologie» ein belastbares Konzept zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests, das Probenahme, Probenaufbereitung, Biotests und die Beurteilung der Effekte umfasst ([www.oekotoxzentrum.ch/projekte/MSK2/index](http://www.oekotoxzentrum.ch/projekte/MSK2/index)).

## ANWENDUNG AUF EIN REALES BEISPIEL

Zur Veranschaulichung der oben beschriebenen Ansätze soll hier gezeigt werden, wie diese in der Praxis angewendet werden können. Dies geschieht anhand einer Probe, die im Rahmen der Studie *Traitement des micropolluants dans les eaux usées* [21] untersucht wurde. Die Analysenergebnisse der Probe sind im Bericht der Studie zum Kläranlagenausbau an der Kläranlage Vidy in Lausanne zu finden. Es handelt sich um eine Abwasserprobe, die bei der Probenahme im März 2010 am Auslauf der biologischen Stufe genommen worden ist (*sortie lit fluidisée*, letzte Reinigungsstufe von zweistufigen Kläranlagen). Sie wurde ausgewählt, da sowohl relativ viele Substanzen analytisch nachgewiesen wurden als auch Biotestergebnisse zur östrogenen Aktivität (ng EEQ/l) vorlagen. Von 56 nachgewiesenen Substanzen lagen sieben in Konzentrationen unterhalb ihrer Quantifizierungsgrenze vor. Für drei Substanzen lagen die ermittelten Konzentrationen oberhalb des Messbereichs, sodass ihre Messwerte nur indikativ sind. Substanzen mit östrogenen Aktivität wurden nicht mittels chemischer Analytik bestimmt, sondern alleine über den Biotest. Für das Oberflächengewässer wird eine Verdünnung um den Faktor 10 angenommen. Dies ist eine Standardannahme in vielen Beurteilungen [6]. Im Fall der Kläranlage Vidy ist das eine sehr konservative Annahme, da die Kläranlage direkt in den Genfersee einleitet, wo die tatsächliche Verdünnung erheblich höher ist. Für die Analyse wurden QK herangezogen, die bereits von *Price et al.* verwendet wurden [6]. Für 22 der 56 Substanzen lagen allerdings keine QK vor, sodass ledig-

lich 60% der gemessenen Substanzen für die Risikoanalyse berücksichtigt werden konnten. Von den gemessenen Substanzen überschritt keine das jeweilige QK. In *Figur 2* sind die Substanzen mit den fünf höchsten RQ dargestellt. Das Verhältnis zwischen dem höchsten RQ und der Summe aller RQ ist 1,9. Das heisst, die Probe fällt gemäss Entscheidungsbaum (*Fig. 1*) in Kategorie III A, wobei Diclofenac das für die Mischung bestimmte Risiko dominiert. Berechnet als Summe aller Einzel-RQ wird die Wasserqualität der Probe gemäss *Tabelle 1* als «mässig» eingestuft, da der  $RQ_{mix}$  zwischen 1 und 2 liegt.

Neben den chemisch-analytischen Messungen wurde die Abwasserprobe mit dem *In-vitro*-Biotest *Yeast Estrogen Screen* (YES, [22]) untersucht. Die in diesem Test gemessenen EEQ-Werte zeigen die Bindung an den Östrogenrezeptor und dessen Aktivierung an, hervorgerufen durch eine Mischung östrogenaktiver Substanzen. Es wurde eine EEQ-Konzentration von 8,34 ng/l gemessen. Unter der Annahme einer Verdünnung um den Faktor 10 ergibt sich eine EEQ-Konzentration von 0,834 ng/l im Oberflächengewässer. Dies bedeutet, dass der  $CQK_{Ez}$  von 0,4 ng/l um den Faktor 2,09 überschritten ist. Die Östradioläquivalente stellen somit bereits an sich ein Risiko dar. Dabei ist zu beachten, dass die Östradioläquivalente mehrere Substanzen beinhalten können, es sich dabei also nicht um eine Einzelsubstanz im eigentlichen Sinne handelt. Wenn es für weitergehende Massnahmen wichtig ist, zwischen den verschiedenen östrogenwirksamen Substanzen zu unterscheiden, können in einem nächsten Schritt mit einer Kombination von sensitiven analytischen Methoden, Fraktionierung und *In-vitro*-Tests die verantwortlichen Substanzen ermittelt werden [23]. Für den vorliegenden Fall wird der EEQ jedoch als Einzelsubstanz behandelt.

Wird der RQ der EEQ (2,09) aus dem *In-vitro*-Biotest im Entscheidungsbaum mitberücksichtigt (*Fig. 3*), verändert sich die Klassierung von Kategorie III A zur Kategorie I. Die Wasserqualität müsste gemäss *Tabelle 1* als unbefriedigend eingestuft werden.

Eine genauere Analyse bezogen auf die empfindlichen taxonomischen Gruppen ist nicht notwendig, da es sich um eine Mischung der Kategorie I handelt. Aus den *Figuren 2* und *3* kann herausgelesen werden, dass eine Reduktion von Diclofenac und den östrogen wirkenden Subs-

$$\text{Risikoquotient (RQ)} = \frac{\text{MEC oder EEQ}}{\text{EQS}}$$

< 1      tolerierbares Risiko  
> 1      nicht tolerierbares Risiko

Gl. 2 Berechnung des Risikoquotienten (RQ).

MEC = Gemessene Umweltkonzentration oder EEQ; QK = Qualitätskriterium

Calcul du quotient de risques (RQ).

MEC = concentration environnementale mesurée ou EEQ; QK = critère de qualité

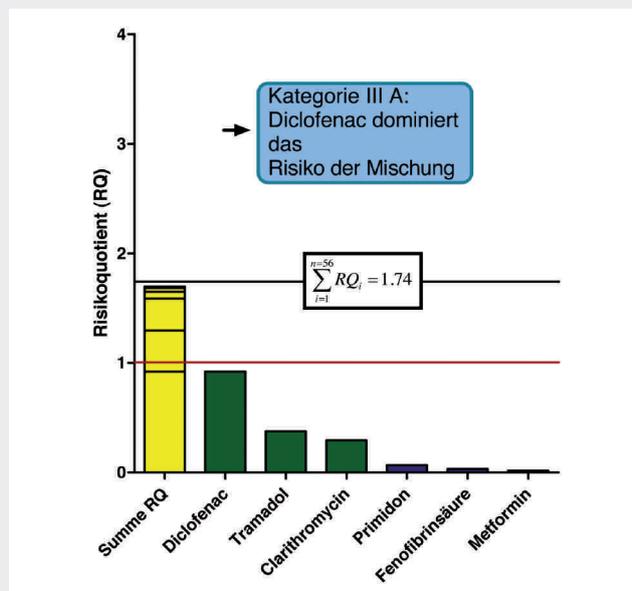


Fig. 2 Höchste, mittels chemischer Analytik bestimmte Risikoquotienten (RQ). Die Summe der dargestellten RQ macht > 96% der Summe aller RQ aus. Die farbliche Klassierung wurde gemäss Tab. 1 vorgenommen: blau = sehr gut, grün = gut, gelb = mässig

Quotients de risques les plus élevés déterminés par voie analytique (RQ). La somme des RQ représentés est > 96% de la somme de tous les RQ. La classification en couleurs a été réalisée selon le tab. 1: bleu = très bon, vert = bon, jaune = moyen

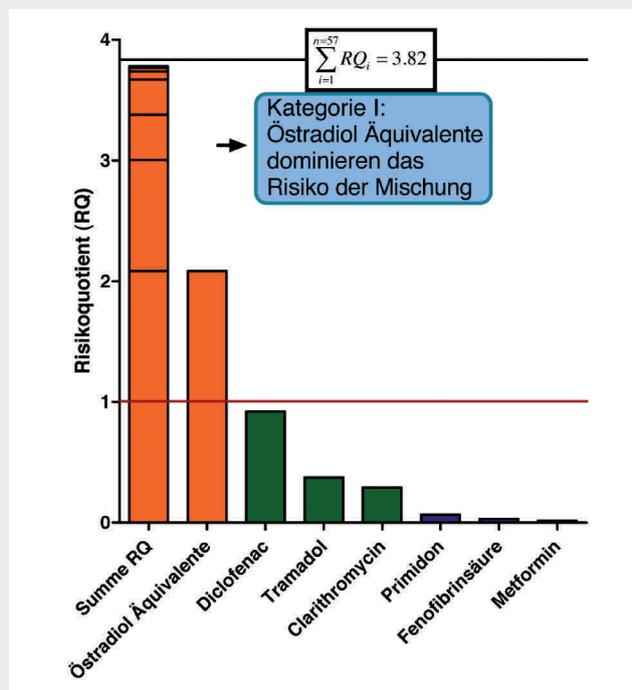


Fig. 3 Höchste, mittels chemischer und biologischer Analytik bestimmte Risikoquotienten (RQ). Die Summe der dargestellten RQ macht > 96% der Summe aller RQ aus. Die farbliche Klassierung wurde gemäss Tab. 1 vorgenommen: blau = sehr gut, grün = gut, orange = unbefriedigend

Quotients de risques les plus élevés déterminés par voie analytique et biologique (RQ). La somme des RQ représentés est > 96% de la somme de tous les RQ. La classification en couleurs a été réalisée selon le tab. 1: bleu = très bon, vert = bon, orange = médiocre

tanzen das Mischungstoxizitätsrisiko der Probe effektiv senken würde. Durch eine zusätzliche Ozonung konnte dies tatsächlich erreicht werden [21]: Der RQ für Diclofenac konnte von 0,92 auf < 0,02 und der für EEQ von 2,09 auf 0,16 reduziert.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN UND EMPFEHLUNGEN

Anders als zum Zeitpunkt des Workshops gibt es jetzt pragmatische und praxisorientierte Ansätze zur Bestimmung der Mischungstoxizität für Gewässerproben. Pragmatisch insofern, weil sie auf wenigen Daten beruhen und daher nicht exakt sein können, aber das Risiko der Mischungstoxizität eher (leicht) über- als unterschätzen. Allerdings kann nur das Risiko analytisch erfasster Substanzen berücksichtigt werden. Auch Substanzen, die erfasst werden, aber für die keine Ökotoxizitätswerte vorliegen, können nicht in die Risikobewertung einfließen. Dies sind vor allem Arzneimittel und Transformationsprodukte [24]. Hier besteht Handlungsbedarf. In diesen Punkten ist die Methode lediglich eine Erweiterung der auf Einzelsubstanz-Toxizität basierenden Beurteilung der Gewässerqualität. Die Ergänzung des chemisch-analytischen Ansatzes um einen biologischen Ansatz, wie sie hier für EEQ gezeigt wurde, ist eine Möglichkeit, die Unsicherheit zu verringern.

Neben den natürlichen und synthetischen Östrogenen gibt es weitere Substanzgruppen, die so tiefe QK haben, dass sie mit einer chemischen Analytik nur schwer erfasst werden können. Dazu gehören zum Beispiel die Pyrethroid-Insektizide. Cypermethrin, ein Vertreter dieser Substanzgruppe, der gerade in die Liste der prioritären Substanzen unter der EU-Wasserrahmenrichtlinie aufgenommen wurde, hat einen CQK von nur 80 pg/l. Dies ist eine Konzentration, die mit gängigen Analysemethoden nicht quantifiziert werden kann. Leider gibt es zur Zeit noch keinen *In-vitro*-Biotest, der diese Sensitivitätslücke schliessen könnte. Im Fall von Gewässern, für die der Verdacht gehegt wird, dass solche Substanzen in ökotoxikologisch wirksamen, aber nicht analytisch nachweisbaren Konzentrationen vorkommen, sollte daher auch die Anwendung von ökotoxikologischen Tests mit ganzen Organismen erwogen werden, z. B. mit den Arten, auf denen das jeweilige QK basiert. Im Fall von Cypermethrin wäre daher ein Test mit dem Bachflohkrebs *Gammarus pulex* zu empfehlen.

Anhand des vorgängig beschriebenen Fallbeispiels wird deutlich, dass die klassische Einzelstoffbeurteilung bei gewissen Gewässerproben zu einer Unterschätzung des tatsächlichen

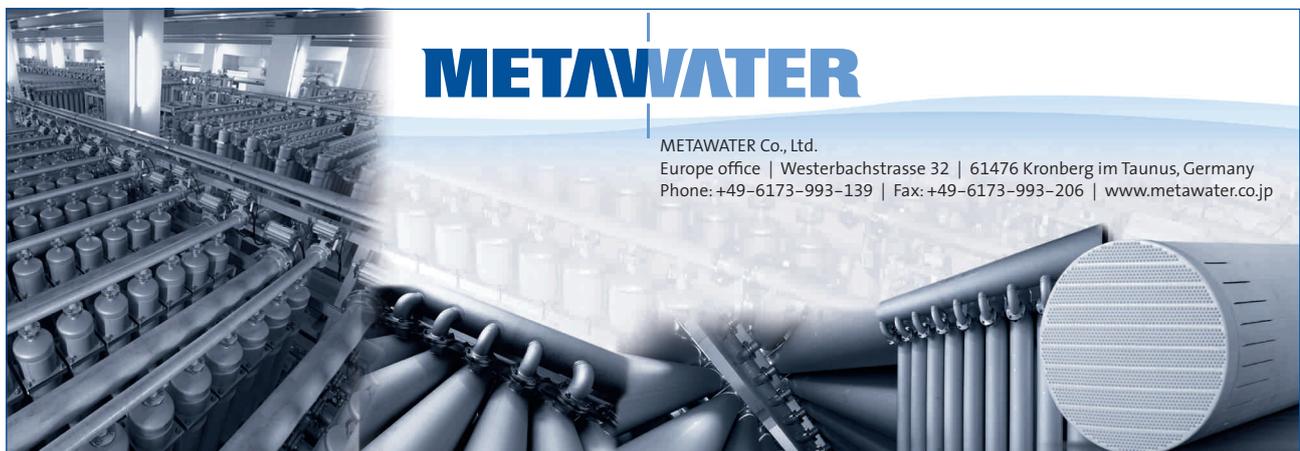
## DANKSAGUNG

Wir möchten allen Mitautoren der vorgestellten Methoden danken. Vor allem gilt dieser Dank *Paul Price*, der bereitwillig immer neue Änderungsvorschläge in den Entscheidungsbaum eingearbeitet hat. Auch den Personen, die die in den Beispielen verwendeten Messdaten erhoben haben, gebührt unser Dank. Dies sind vor allem *Heinz Singer* und seine Kollegen von der Abteilung UCHEM der Eawag, *Ueli Ochsenbein* vom AWA Bern und *Cornelia Kienle* und ihre Kollegen aus dem Labor des Ökotoxizitätszentrums. *Sarah von Arb*, *Roger Gauch* und *Cornelia Kienle* möchten wir für wertvolle Kommentare zu früheren Versionen des Artikels danken.

Risikos führt. Mithilfe des Entscheidungsbaumes können solche Proben mit relativ wenig Aufwand identifiziert und anschliessend die besonders betroffenen taxonomischen Gruppen bestimmt werden. Risikominderungsmassnahmen können schliesslich gezielt auf die Substanzen zugeschnitten werden, die hauptsächlich für die Mischungstoxizität der Probe verantwortlich sind. So trägt der Entscheidungsbaum dazu bei, die zur Verfügung stehenden Ressourcen möglichst fokussiert einzusetzen.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Kunz, P. et al. (2011): Mischungstoxizität: Bedürfnisse der Praxis: Workshop über Auswirkungen von Chemikalienmischungen und ihre Beurteilung. *gwa* 3/2011: 167–75
- [2] Junghans, M. et al. (2006): Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquatic Toxicol.* 76: 93–110
- [3] Price, P. et al. (2012): A decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances. *Environmental Sciences Europe* 24: 26 ([www.enveurope.com/content/24/1/26](http://www.enveurope.com/content/24/1/26))
- [4] Backhaus, T.; Faust, M. (2012): Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* 46: 2564–73
- [5] Backhaus, T. et al. (2013): Proposal for environmental mixture risk assessment in the context of the biocidal product authorization in the EU. *Environmental Sciences Europe* 25:4 ([www.enveurope.com/content/25/1/4](http://www.enveurope.com/content/25/1/4))
- [6] Price, P. et al. (2012): An application of a decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances to the assessment of human and ecological effects from combined exposures to chemicals observed in surface waters and waste water effluents. *Environmental Sciences Europe* 24:34 ([www.enveurope.com/content/24/1/34](http://www.enveurope.com/content/24/1/34))
- [7] Götz, C. et al. (2010): Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser – Kombination von Expositions- und ökotoxikologischen Effektdaten. *gwa* 7/10: 575–585
- [8] Junghans, M. et al. (2012): Qualitätskriterien für Pflanzenschutzmittel: Methode zur Herleitung von Qualitätskriterien für PSM in Schweizer Oberflächengewässern. *Aqua & Gas* 11/12: 16–22
- [9] Junghans, M. et al. (2012): A proposal for considering mixture toxicity with EQS compliance checking. Poster an der SETAC World Berlin. TU 214
- [10] Chèvre, N. et al. (2006): Pestizide in Schweizer Oberflächengewässern: Wirkungsbasierte Qualitätskriterien. *gwa* 4/06: 297–307
- [11] Escher, B. et al. (2008): Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micro-pollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. *Journal of Environmental Monitoring* 10: 622–31
- [12] Kase, R. et al. (2012): Contribution on bioanalytical assays for steroidal estrogens. In: EU JRC report by Loos, R. (2012): Analytical methods relevant to the European Commission's 2012 proposal on Priority Substances under the Water Framework Directive. ISBN 978-92-79-26642-3. Publications Office of the European Union
- [13] Hecker, M.; Hollert, H. (2011): Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environmental Sciences Europe* 23:15 ([www.enveurope.com/content/23/1/15](http://www.enveurope.com/content/23/1/15))
- [14] Brader, S. M. (2013): Thinking Outside the Box: Assessing Endocrine Disruption in Aquatic Life. In: Ahuja, S. editor. *Monitoring Water Quality*. 1<sup>st</sup> Edition ed: Elsevier; p. 103–29
- [15] Bogers, R. et al. (2007): An in vitro/in vivo screening assay as a sensitive tool to assess endocrine disruptive activity in surface water. *Environment International* 33: 292–301
- [16] Maletz, S. et al. (2013): In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents. *Water Research* 47: 1545–57
- [17] Murk, A. J. et al. (2002): Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21: 16–23
- [18] Leusch, F. (2008): Tools to Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters. *Global Water Research Coalition* 2008
- [19] Kase, R. et al. (2009): Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* 21: 339–78
- [20] OZ News (2011): Wichtige Standardisierung von Biotests. *Oekotoxzentrum News*, Nov. 2011: 6–8
- [21] Margot, J. et al. (2011): Traitement des micropolluants dans les eaux usées – Rapport final sur les essais pilotes à la STEP de Vidy (Lausanne). *Tableau auf Seite IV des Anhangs*. Ed Villes de Lausanne
- [22] Routledge, E.J.; Sumpter J.P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology & Chemistry* 15: 241–8
- [23] Brack, W. (2003): Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377: 397–407
- [24] Ochsenbein, U. et al. (2012): Mikroverunreinigungen in Aaretalgewässern: Ein Risiko? *Aqua & Gas* 11/12: 68–79



**METAWATER**

METAWATER Co., Ltd.  
 Europe office | Westerbachstrasse 32 | 61476 Kronberg im Taunus, Germany  
 Phone: +49-6173-993-139 | Fax: +49-6173-993-206 | [www.metawater.co.jp](http://www.metawater.co.jp)