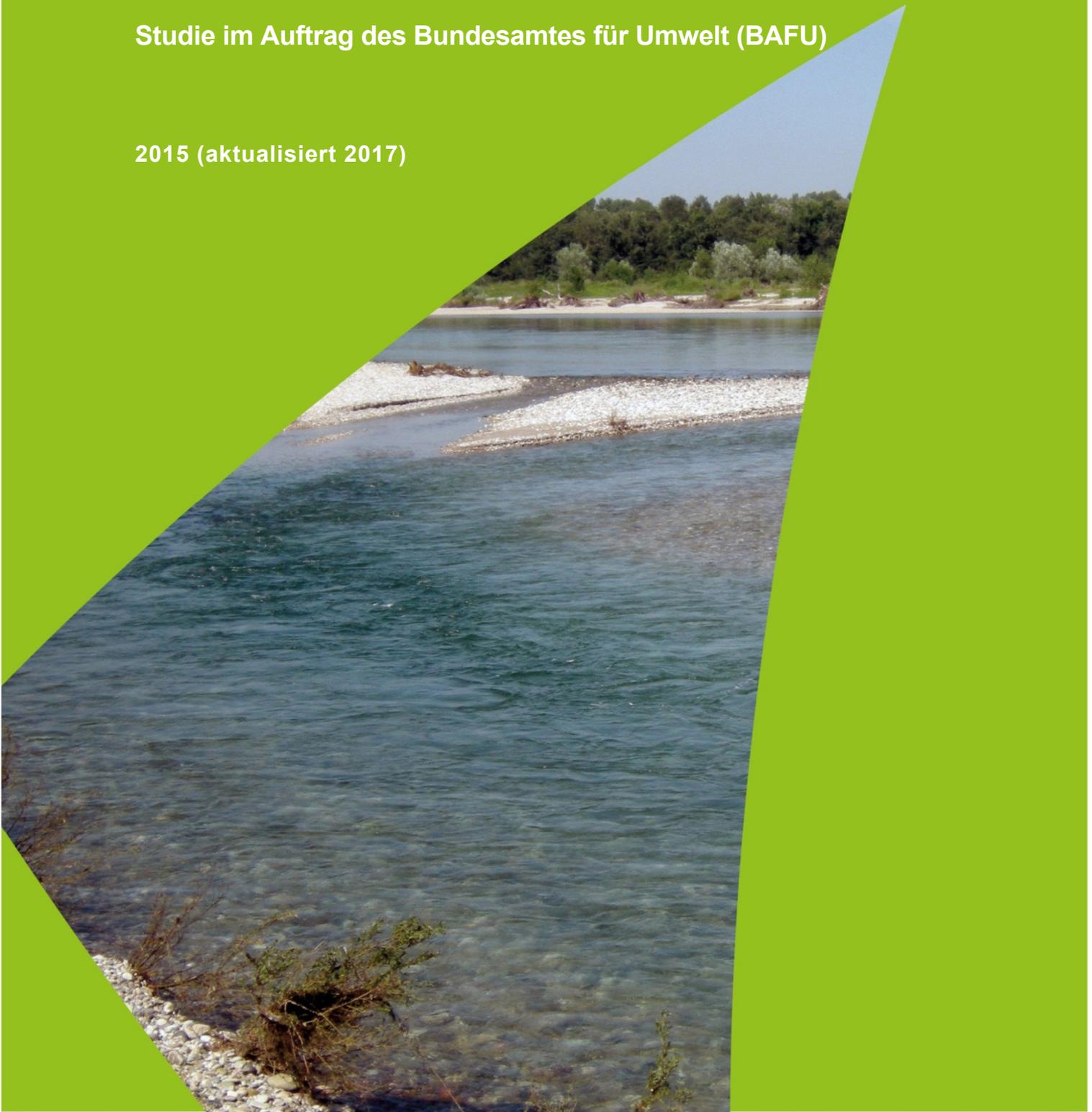




Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasser- belasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests

Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

2015 (aktualisiert 2017)



Impressum

Herausgeber

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

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

Cornelia Kienle, Etienne Vermeirssen, Petra Kunz und Inge Werner
Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL

Fachliche Begleitung

Christian Götz
Andreas Häner
Michael Schärer
Envilab AG
BMG Engineering AG
Bundesamt für Umwelt

Danksagung

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

Begleitgruppe des Moduls Ökotoxikologie im Modulstufenkonzept	Michael Schärer/Yael Schindler (Vorsitz), Arielle Cordonier (Service cantonal de l'écologie de l'eau, Kt. Genf), Andreas Häner (BMG Engineering AG), Barbara Känel (AWEL, Kt. Zürich), Margie Koster (Amt für Umwelt, Kt. Thurgau), Frank Lang (Interkantoniales Labor, Kt. Schaffhausen), Sergio Santiago (Soluval Santiago), Kristin Schirmer (Eawag)
Eawag	Christian Michel, Nele Schuwirth, Heinz Singer, Christian Stamm, Barbara Spycher
Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen	Michael Eugster, Sergio Rezzonico
RWTH Aachen	Henner Hollert, Sibylle Maletz, Christine Schönlau
Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL	Daniela Baumberger, Barbara Ganser, Nadzeya Homazava, Beatrice Läuppi, Daniel Olbrich, Anke Schäfer, Andrea Schifferli, Christina Thiemann

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. Bei der Aktualisierung wurde der gültige EQS für Diuron (70 ng/L statt bisher 20 ng/L) einbezogen, ebenso wie die Bezeichnung der Äquivalenzkonzentrationen und der Algenart angepasst. Zudem wurden die Bestimmungsgrenzen im Algentest und Links auf Webseiten aktualisiert.

Kontakt

Cornelia Kienle: cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch

Zitiervorschlag

Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I. 2015. Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU (aktualisiert 2017). Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.

Titelfoto: Andri Bryner, Eawag

Oekotoxzentrum | Eawag | Überlandstrasse 133 | Postfach 611 | 8600 Dübendorf | Schweiz
T +41 (0)58 765 55 62 | F +41 (0)58 765 58 63 | info@oekotoxzentrum.ch | www.oekotoxzentrum.ch

Centre Ecotox | EPFL-ENAC-IIE-GE | Station 2 | CH-1015 Lausanne | Suisse
T +41 (0)21 693 62 58 | F +41 (0)21 693 80 35 | info@centreecotox.ch | www.centreecotox.ch



Zusammenfassung

Einleitung: In der Schweiz werden im Rahmen des Projektes Modul-Stufen-Konzept (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 der Arbeiten im Rahmen eines *Moduls Ökotoxikologie* innerhalb des MSK ist die Entwicklung eines Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests, bestehend aus Probenahme, Probenaufbereitung, Durchführung der Biotests und Beurteilung der Effekte. Die Biotests sollen sensitiv, wirkungsbasiert, einfach durchführbar, kostengünstig und gut interpretierbar sein. Im vorliegenden Bericht wird nun ein Konzept zur Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern mit ökotoxikologischen Biotests vorgestellt.

Probenahme und Probenaufbereitung: Zur Probenahme werden Sammelproben über mindestens 24 Stunden oder (falls ersteres nicht möglich) Stichproben empfohlen. Diese müssen bei 0-5°C transportiert und aufbewahrt werden. Die Probenaufbereitung erfolgt in der Regel mit einer Festphasenextraktion.

Testverfahren für die Untersuchung der Wasserqualität: Für die Grobbeurteilung wurden zwei ökotoxikologisch relevante Stoffgruppen ausgewählt: Photosystem II (PSII)-hemmende und östrogen-aktive Stoffe. Die biologische Wirkung dieser beiden Stoffgruppen kann mit ökotoxikologischen Biotests bestimmt werden. Die Bestimmung der Wasserqualität in Bezug auf PSII-hemmende Stoffe kann mit Hilfe des kombinierten Algentests mit einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) erfolgen. Das Photosystem II spielt eine zentrale Rolle in der Photosynthese der Algen; wird es gehemmt können die Algen nicht mehr wachsen. Der kombinierte Algentest ist einfach und kostengünstig durchführbar und hat in zahlreichen bisherigen Studien gute und robuste Ergebnisse geliefert. Zur Ermittlung der Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen im Abwasser ist der Yeast Estrogen Screen (YES), ein Biotest mit genetisch veränderten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), aufgrund seiner Robustheit gut geeignet. Für diesen Test gibt es mehrere Varianten, für die ISO-Protokoll-Entwürfe zur Zertifizierung durch die *International Organization for Standardization* (ISO) eingereicht sind. Eine definitive Testempfehlung für beide Biotests ist aufgrund der ausstehenden ISO-Zertifizierungen derzeit noch nicht möglich. Es werden daher erprobte Varianten dieser Tests beschrieben, die für eine Grobbeurteilung eingesetzt werden können. Der kombinierte Algentest kann sowohl mit nativen als auch mit Hilfe einer Festphasenextraktion aufkonzentrierten Proben durchgeführt werden. Dahingegen müssen die Proben für den YES in der Regel aufkonzentriert werden, da die Konzentrationen an östrogen-aktiven Stoffen im Abwasser meist nicht hoch genug sind um native Proben messen zu können.

Beurteilung der Wasserqualität: Die Beurteilung der Messwerte erfolgt, in Anlehnung an die Methoden des MSK, mit Hilfe eines klassenbasierten Zustandsbeurteilungssystems. Hierfür werden verfügbare Vorschläge für chronische Umweltqualitätskriterien von östrogen-aktiven und PSII-hemmenden Stoffen einbezogen.

Schlussfolgerungen: Die vorgestellte Methode ist für die Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern konzipiert und stellt einen ersten Schritt in Richtung integrative Beurteilung der Wasserqualität dar. Die vorgeschlagenen Biotests sind als Ergänzung zur üblichen Einzelstoffbeurteilung gedacht und ermöglichen es, eine breite Palette organischer Spurenstoffe integrativ zu erfassen.



Summary

Introduction: Within the framework of the “Modular Stepwise Procedure” (MSP), standardized methods are being developed to evaluate and assess the status of rivers in Switzerland. It encompasses various aspects that influence habitat quality, including riverine structure, hydrology, biology, water chemistry and ecotoxicology. The MSP provides information which will form the basis for potential management measures to reduce impairments.

The goal of the *Ecotoxicology module* is to develop a robust approach for routine assessment of water quality based on ecotoxicological bioassays. The concept includes sampling, sample processing, bioassays, and interpretation of results. The selected bioassays should be sensitive, effect-specific, easy to perform, cost-effective and easily interpretable. The present report describes an approach for a first tier evaluation (“Grobbeurteilung”) of water quality in wastewater-impacted rivers based on ecotoxicological bioassays.

Sampling and sample processing: It is recommended to collect composite samples over a minimum of 24 h or (if former is not possible) grab samples. These must be transported and stored at 0-5°C. Samples are generally processed using solid phase extraction (SPE).

Bioassays for measuring water quality: This first tier evaluation is focused on two relevant substance groups: photosystem II (PSII) inhibiting and estrogenic substances. The biological effects of these two substance groups can be assessed using bioassays. An evaluation of water quality regarding PSII-inhibiting substances can be done using the combined algae assay with single-celled green algae (*Raphidocelis subcapitata*). The photosystem II plays a central role in algae photosynthesis. If it is inhibited, the algae cannot grow. This assay is easy to perform and cost-effective, and it has provided accurate and robust results in numerous previous studies. Due to its robustness, the Yeast Estrogen Screen (YES), a bioassay using genetically modified yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), is well suited to assess estrogenicity in wastewater. For this assay, there are several versions, for which protocol drafts are submitted for standardisation by the *International Organization for Standardization* (ISO). At this time, for both assays, a definitive recommendation for a specific test cannot be given due to the pending ISO certification. We therefore describe versions of these tests, which have been validated and can be applied for a first tier evaluation. The combined algae assay can be conducted with native as well as SPE concentrated samples. Samples to be tested by YES usually have to be SPE concentrated, as the concentrations of estrogenic substances in wastewater are often too low to be detectable in native samples.

Water quality assessment: An evaluation of the measured values is performed by applying a class based evaluation system based on the MSP methods. For this purpose, available suggestions for chronic environmental quality standards of estrogenic and PSII-inhibiting substances are used.

Conclusions: The approach presented here is intended for the evaluation of wastewater impacted surface waters and represents a first step towards an integrated water quality assessment. The suggested bioassays complement the generally used methods, which are based on single substance assessment, and make it possible to assess a broad spectrum of organic trace substances in an integrative way.



Resumé

Introduction : La Suisse travaille depuis plusieurs années à l'élaboration d'un outil d'évaluation appelé système modulaire gradué (SMG) qui se compose de méthodes standardisées permettant d'apprécier l'état des cours d'eau, et plus récemment des lacs, selon des critères morphologiques, hydrologiques, biologiques, chimiques et écotoxicologiques afin de pouvoir prendre des mesures adéquates pour réduire les atteintes qu'ils subissent.

Au sein du SMG, le *module Ecotoxicologie* souhaite proposer un système d'appréciation de routine de la qualité de l'eau à partir de bioessais écotoxicologiques en détaillant les étapes du prélèvement, de la préparation des échantillons, de la réalisation des essais et de l'appréciation de la qualité à partir des effets observés. Les bioessais utilisés doivent être sensibles, spécifiques, pratiques, bon marché et faciles à interpréter. Le présent rapport expose un système d'évaluation sommaire de la qualité de l'eau à partir de bioessais écotoxicologiques adapté aux cours d'eau subissant des rejets d'eaux usées traitées.

Prélèvement et préparation des échantillons : Pour l'échantillonnage, il est recommandé de collecter des échantillons composites sur au moins 24 h ou, faute de mieux, d'effectuer des prélèvements ponctuels. Les échantillons doivent être transportés et conservés à une température de 0 à 5°C. En général, ils sont ensuite préparés par extraction sur phase solide.

Bioessais recommandés : Pour l'appréciation sommaire de la qualité de l'eau, deux familles de substances potentiellement écotoxiques ont été ciblées : les inhibiteurs du photosystème II (PSII) et substances à activité œstrogénique. Leur activité biologique peut être mesurée à l'aide de bioessais. Le test recommandé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence d'inhibiteurs du PSII est le test algues combiné avec une algue verte unicellulaire, *Raphidocelis subcapitata*. Le photosystème II est un élément central de l'appareil photosynthétique des algues et son inhibition entraîne un arrêt de la croissance algale. A la fois simple et bon marché, le test algues combiné a livré des résultats robustes et fiables dans de nombreuses études. La contamination des eaux par les œstrogènes et substances apparentées peut être évaluée à l'aide du test YES (Yeast Estrogen Screen), un bioessai particulièrement robuste mettant en œuvre des levures génétiquement modifiées (*Saccharomyces cerevisiae*). Il existe plusieurs variantes de ce test dont des projets de normes ISO ont été déposés auprès de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) pour certification. Cette procédure n'étant pas achevée, il n'est pas encore possible d'émettre de recommandations méthodologiques définitives pour ces deux bioessais. Le rapport présente ainsi variantes éprouvées qui peuvent être utilisées pour l'évaluation sommaire de la qualité de l'eau. Le test algues combiné peut être utilisé aussi bien avec des échantillons natifs qu'avec des échantillons concentrés par extraction sur phase solide alors que cette pré-concentration est généralement indispensable à la mise en œuvre du test YES parce que les concentrations de substances à activité œstrogénique dans les eaux usées traitées sont souvent trop faible pour être détectable dans les échantillons natifs.

Appréciation de la qualité de l'eau : L'interprétation des résultats des bioessais en termes de qualité de l'eau s'effectue, comme dans toutes les méthodes du SMG, selon un système de classes d'état. La classe de qualité est déterminée en se référant, notamment, aux valeurs déjà proposées pour les critères de qualité environnementale relatifs à une exposition chronique aux œstrogènes et aux inhibiteurs du photosystème II.

Conclusions : La méthode proposée est conçue pour évaluer l'état des cours d'eau contaminés par des rejets d'eaux usées traitées et constitue un premier pas vers une appréciation intégrée de la qualité de l'eau. Les bioessais proposés interviennent en complément de l'évaluation usuelle des substances individuelles et permettent d'appréhender une grande variété de composés traces organiques de façon globale et intégrée.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Resumé	iii
Abkürzungen	vii
1 Einleitung	1
1.1 Ausgangslage	1
1.2 Rechtliche Grundlagen	2
1.3 Das Modul-Stufen-Konzept und das Modul Ökotoxikologie	2
1.4 Zielsetzung	2
1.5 Überblick über das Vorgehen zur Grobbeurteilung belasteter Gewässer	2
2 Probenahme und Probenaufbereitung	4
2.1 Überblick über das Vorgehen	4
2.2 Probenahme	4
2.2.1 Auswahl geeigneter Gewässerabschnitte	5
2.2.2 Probenahme im Abwasser	5
2.3 Proben transport und Lagerung	5
2.4 Probenaufbereitung	6
3 Testverfahren für die Untersuchung der Wasserqualität auf eine Belastung mit östrogen- aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen	7
3.1 Kombiniertes Algentest zur Erfassung von PSII-hemmenden Stoffen	10
3.1.1 Überblick: Test-Durchführung und Datenauswertung	11
3.1.2 Informationen zur Validierung des Testes	12
3.2 Yeast Estrogen Screen (YES) zur Erfassung von östrogen-aktiven Stoffen in Abwasser	13
3.2.1 Überblick: Test-Durchführung und Datenauswertung	14
3.2.2 Informationen zur Validierung des Testes	15
4 Möglichkeiten zur Beurteilung der Wasserqualität anhand der ausgewählten Biotests	17
4.1 Ermittlung von Risikoquotienten	17
4.2 Möglichkeiten für Beurteilungssysteme	18
4.2.1 Bewertung der Wasserqualität in drei Zustandsklassen	18
4.2.2 Bewertung der Wasserqualität in fünf Zustandsklassen	19
4.2.3 Wertfunktionen zur Beurteilung der Wasserqualität	20
5 Schlussfolgerungen und Ausblick	21
5.1 Möglichkeiten der Beurteilungsmethode	21
5.2 Weiteres Vorgehen	21
6 Referenzen	22
7 Verzeichnisse	26
7.1 Abbildungsverzeichnis	26



7.2 Tabellenverzeichnis	27
Anhang 1 <i>Standard Operating Procedures</i> (SOPs) für Probenahme und Probenaufbereitung	29
Probenahme	29
Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion	30
Anhang 2 Informationen zu SOPs für die Biotests	31
Kombinierter Algentest	31
Yeast Estrogen Screen	31
Anhang 3 Validierung des Kombinierten Algentests	32
Einleitung	32
Material und Methoden	33
Ergebnisse und Diskussion	37
Zusammenfassung und Ausblick	40
Anhang 4 Validierung des Yeast Estrogen Screen	41
Einleitung	41
Material und Methoden	42
Ergebnisse und Diskussion	46
Zusammenfassung	49
Anhang 5 Fallstudien zur Anwendung des Beurteilungs-konzepts	50
Fallstudie 1: Beurteilung der östrogenen Aktivität in Kläranlagenabläufen und Fließgewässern des Kantons St. Gallen	50
Fallstudie 2: Messkampagne an 12 Abwasserreinigungsanlagen und angrenzenden Fließgewässern im Rahmen des Projektes EcoImpact	54
Anhang 6 Wertfunktionen zur Beurteilung der Wasserqualität	58
Vorschläge für Wertfunktionen und die Aggregation der Daten	58
Umgang mit Unsicherheit	61



Abkürzungen

ARA	Abwasserreinigungsanlage
BEQ	Bioanalytische Äquivalenzkonzentration (<i>bioanalytical equivalent concentration</i>)
BPA	Bisphenol A
CQK	Chronisches Qualitätskriterium (auch <i>Annual Average Environmental Quality Standard</i> , AA-EQS, genannt)
DEQ	Diuron-Äquivalenzkonzentration (<i>diuron equivalent concentration</i>)
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	17 β -Estradiol-Äquivalenzfaktor
EEQ	17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (<i>17β-estradiol equivalent concentration</i>)
EQS	Umweltqualitätskriterium (<i>environmental quality standard</i>)
ER α	Östrogenrezeptor α
GSchV	Gewässerschutzverordnung
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
LOD	Detektionslimite oder Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Quantifizierungslimite oder Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantification</i>)
MEC	Gemessene Umweltkonzentration (<i>measured environmental concentration</i>)
MSK	Modul-Stufen-Konzept
OD	Optische Dichte
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.)
PSII	Photosystem II
SOP	Standardarbeitsanweisung (<i>standard operating procedure</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
TEQ	Toxizitäts-Äquivalenzkonzentration (<i>toxic equivalent concentration</i>)
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i> (Hefezellöstrogentest)



1 Einleitung

1.1 Ausgangslage

Die Beurteilung der Wasserqualität basiert üblicherweise auf chemischen Analysen und der Effektbeurteilung von Einzelstoffen durch den Vergleich mit Qualitätskriterien (Götz et al., 2011). Diese Methode ist jedoch limitiert auf bekannte Stoffe, für welche eine genügend gute Datenbasis verfügbar ist. Um die Wasserqualität über solche Einzelstoffe hinaus beurteilen zu können, sind integrative Methoden notwendig, wie beispielsweise ökotoxikologische Biotests. Diese geben Auskunft über die allgemeine Toxizität des Abwassers oder über spezifische Wirkungen von bestimmten Stoffgruppen (Abb. 1). Dadurch ist eine Beurteilung der Mischungstoxizität von Chemikalien möglich, im Wasser vorhandene Einzelstoffe können jedoch meist nicht identifiziert werden. Biotests sind besonders wichtig, um die Effekte/Auswirkungen von Stoffgruppen mit sehr tiefen wirkungsbasierten chronischen Qualitätskriterien (CQK) zu erfassen, die nicht oder nur schwer mit chemischer Analytik bestimmt werden können, wie beispielsweise die östrogen-aktiven Stoffe.

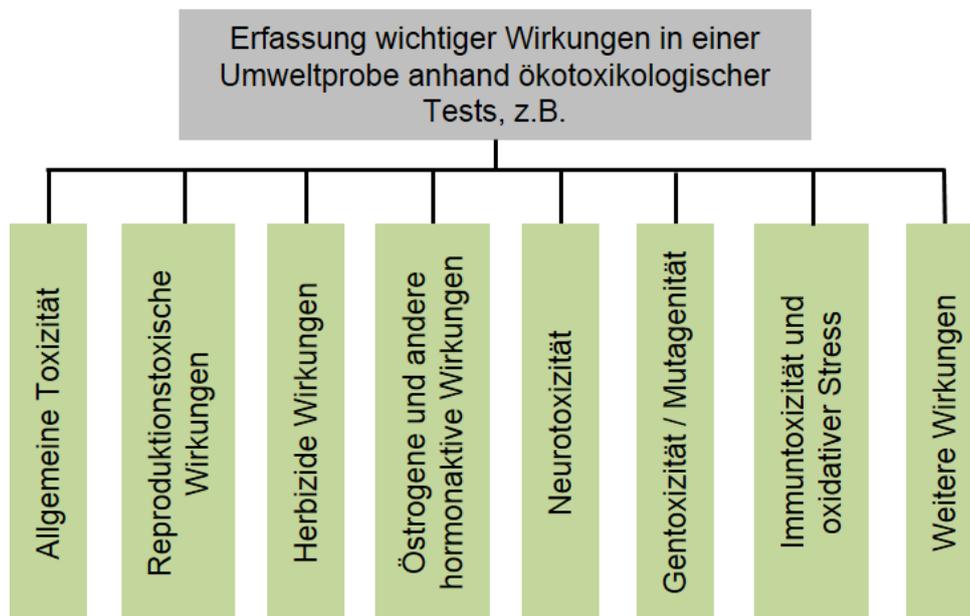


Abb. 1: Überblick über wichtige Wirkungen, die mit Biotests erfasst werden können.

Je nach zu erfassender Wirkung gibt es einen oder mehrere Biotests, welche zur Anwendung kommen können. Viele dieser Tests sind aber noch nicht standardisiert bzw. im Forschungsstadium und daher für eine Umsetzung im Vollzug noch nicht geeignet (Kienle et al., 2015). Verschiedene Biotests wurden im Rahmen der Arbeiten für ein Modul Ökotoxikologie des Projektes Modul-Stufen-Konzept (MSK) des BAFU begutachtet, durchgeführt oder entwickelt (Escher und Chèvre, 2004; Kienle et al., 2012; Schweigert et al., 2001). Solche Testverfahren müssen vergleichsweise einfach und kostengünstig anzuwenden sein und robuste, wiederholbare und interpretierbare Ergebnisse liefern. Es hat sich gezeigt, dass für eine Anwendung in der Praxis in erster Linie gewisse *in vitro*-Testverfahren in Frage kommen. Diese Biotests werden vor allem auf molekularer und zellulärer Ebene durchgeführt und dienen zur Erfassung spezifischer Wirkungen. Darüber hinaus ist eine Vielzahl weiterer Biotests verfügbar, die Effekte auf Organismen oder Lebensgemeinschaften erfassen. Einen Überblick über verfügbare Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität mit einer Empfehlung für derzeit geeignete Biotests gibt Kienle et al. (2015).



1.2 Rechtliche Grundlagen

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

1.3 Das Modul-Stufen-Konzept und das Modul Ökotoxikologie

Im Rahmen des Projektes *Modul-Stufen-Konzept* 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 der einzelnen Module ist die Einteilung der Gewässer in verschiedene Zustandsklassen (<http://www.modul-stufen-konzept.ch>). Zudem soll ein Gesamtkonzept entwickelt werden, in dem die Daten aus den einzelnen Modulen integriert werden und eine Gesamtbewertung des Gewässerzustandes vorgenommen wird (Bundi et al., 2008).

1.4 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeiten zum Modul Ökotoxikologie innerhalb des Modul-Stufen-Konzepts ist die Entwicklung eines belastbaren Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Erarbeitete Konzepte sollen dabei ergänzend zu anderen Methoden eine Beurteilung möglicher Einwirkungen von anthropogenen Stoffen auf die Lebensgemeinschaften von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen erlauben. Die Arbeiten zur Entwicklung eines Moduls Ökotoxikologie erfolgen unter Federführung des BAFU am Ökotoxizentrum und werden durch eine Arbeitsgruppe mit Experten aus privaten Labors, kantonalen Gewässerschutzfachstellen und der Forschung gesteuert und begleitet.

1.5 Überblick über das Vorgehen zur Grobbeurteilung belasteter Gewässer

Der vorliegende Bericht beschreibt eine Methode zur Grobbeurteilung der Wasserqualität abwasserbelasteter Gewässer anhand von Biotests. Das Konzept und die ausgewählten Tests wurden auf eine zukünftige Verwendung im Vollzug durch kantonale Gewässerschutzfachstellen, private Labors und weitere Experten aus der Praxis des Gewässerschutzes ausgerichtet. Es wurde dabei viel Wert auf eine einfache und kostengünstige Durchführung und klare Interpretierbarkeit der Resultate gelegt.

Im folgenden Kapitel wird das Vorgehen zur Beurteilung der Wasserqualität anhand der Biotestergebnisse beschrieben. 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 bisheriger Studien werden folgende Schritte vorgeschlagen (Abb. 2).



Abb. 2: Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept für die Belastung von abwasserbelasteten Oberflächengewässern mit östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen (Grafik: Eawag).

In einem ersten Schritt wird die Belastung durch kommunales Abwasser abgeschätzt (siehe Kapitel 2.2.1). Übersteigt der Abwasseranteil eine bestimmte Schwelle (10%), sollte eine Untersuchung des Abwassers mit Biotests erfolgen. Hierfür wird aufgrund der Ergebnisse bisheriger Studien ein pragmatisches Vorgehen vorgeschlagen: Für eine Grobbeurteilung kann im Abwasser die östrogene Wirkung z.B. mittels eines Hefezellöstrogentests (Yeast Estrogen Screen, YES) und die PSII-hemmende Wirkung mittels eines kombinierten Algentests ermittelt werden. Eine Abschätzung der Belastung im Fließgewässer erfolgt anschliessend über die Verdünnung des Abwassers im Gewässer (siehe Kapitel 2.2.2).

Die detaillierte Beschreibung der Durchführung ist wie folgt gegliedert:

- Probenahme: Probenahme, Transport, Lagerung und Aufbereitung der Proben (Kapitel 2),
- Testverfahren für die Untersuchung der Wasserqualität: Auswahlkriterien, Testdurchführung, Auswertung der Daten (Kapitel 3),
- Möglichkeiten zur Beurteilung der Wasserqualität anhand der ausgewählten Biotests (Kapitel 4),
- Ausblick und Handlungsbedarf (Kapitel 5).



2 Probenahme und Probenaufbereitung

2.1 Überblick über das Vorgehen

In Abb. 3 ist das Vorgehen von der Probenahme, -lagerung und -aufbereitung bis zur Analyse als Übersicht abgebildet.

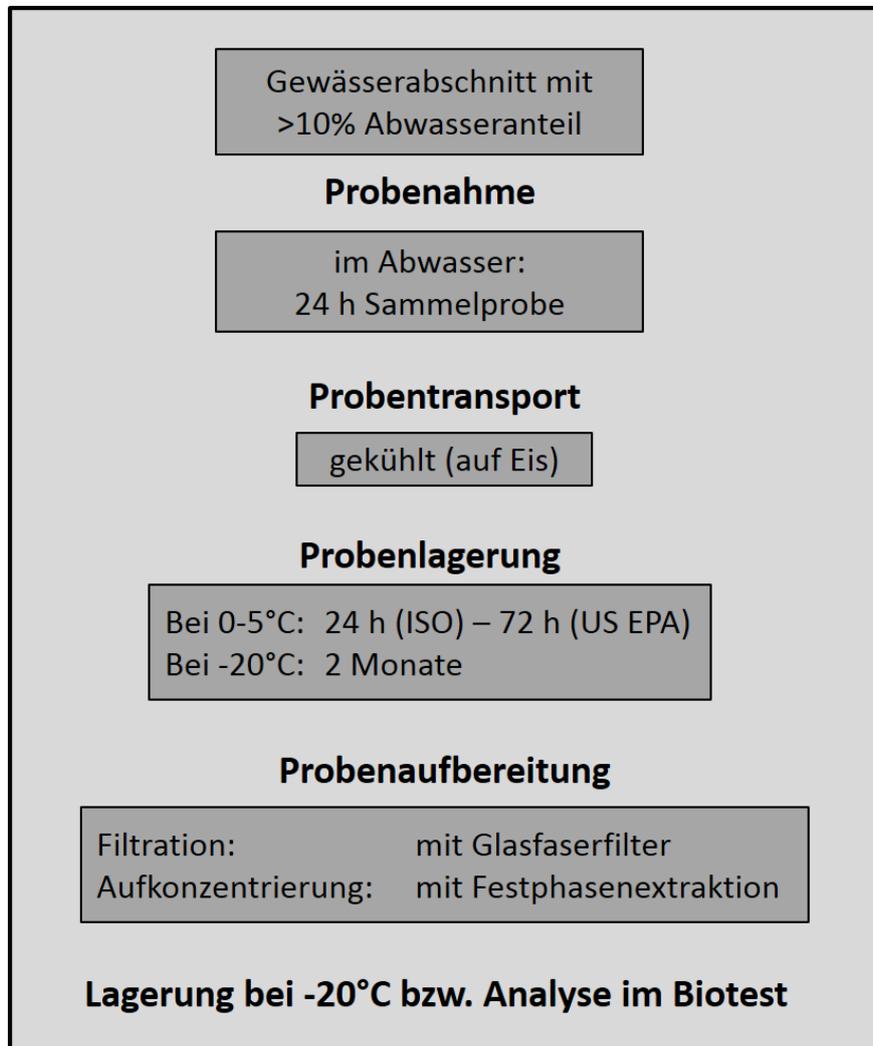


Abb. 3: Überblick über das Vorgehen zur Probenahme und Probenaufbereitung

2.2 Probenahme

Das Ziel einer Probenahme ist, einen repräsentativen Teil des zu untersuchenden Wasserkörpers 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). Ansätze zur Probenahme unterscheiden sich je nach zu beprobender Matrix. Für die Beurteilung abwasserbelasteter Gewässer im vorliegenden Grobbeurteilungskonzept ist vor allem Abwasser relevant. Der zugehörige Ansatz wird im Folgenden kurz erläutert. Detaillierte Ausführungen hierzu finden sich in Götz et al. (2011) und in der ISO-Richtlinie 5667-10 (International Organization for Standardization, 1992).



2.2.1 Auswahl geeigneter Gewässerabschnitte

Für die Auswahl geeigneter Gewässerabschnitte zur Probenahme kann analog zu Götz et al. (2011) vorgegangen werden. Hierfür ist die Ermittlung des Abwasseranteils eines Gewässers bei Niedrigwasserabfluss (Q_{347}) zentral. Gemäss bisherigen, auf Einzelstoffanalysen basierenden, Untersuchungen ist ein Abwasseranteil bei Q_{347} von $>10\%$ kritisch.

2.2.2 Probenahme im Abwasser

Erfolgt die Beprobung direkt im Abwasser, so kann analog zum Beurteilungskonzept für Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser nach Götz et al. (2011) über den Abwasseranteil auf die Belastung im Gewässer extrapoliert werden. Hierfür muss die Wasserbilanz bekannt sein, d.h. der Tagesabfluss der ARA und im Bach muss mit erfasst werden. Alternativ ist, v.a. bei Entnahme von Stichproben, auch eine grobe Abschätzung der Verdünnung über die Messung der Leitfähigkeit im Abwasser und im Fließgewässer vor und nach ARA-Ablauf möglich.

Bei der Probenahme im Abwasser sind Sammelproben zu empfehlen. Auf den Kläranlagen sind in der Regel fest installierte Probenehmer im ARA-Auslauf vorhanden. Für Eigenkontrollen und behördliche Überprüfungen werden täglich 24 h-Sammelproben genommen und rückgestellt. Diese Sammelproben können auch für Biotests verwendet werden.

Bei der Probenahme ist auf die Beschaffenheit der Probenahmebehälter zu achten. Für das Sammeln von durch organische Stoffe dominierten Umweltproben (u.a. östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe) sind Behälter aus Glas (falls möglich Braunglas) oder Teflon (Polytetrafluorethylen, PTFE) geeignet (International Organization for Standardization, 1998; US EPA, 2005). Die Behälter sollten mehrmals mit Aceton und anschliessend mit Probenwasser vorgespült werden (siehe auch Van der Linden et al. (2008) und Anhang 1). Damit während Probenahme und Transport keine Kontamination mit östrogen-aktiven Stoffen aus Plastik auftritt, sind spezielle Vorsichtsmassnahmen zu ergreifen (für Details siehe *Standard Operating Procedure* (SOP) Probenahme YES im Anhang 1). Detaillierte Informationen finden sich in Kienle et al. (2012).

2.3 Probentransport und Lagerung

Geeignete Methoden und Hinweise für den Transport und die Lagerung von Proben sind in der ISO-Richtlinie 5667-3 (International Organization for Standardization, 2003) und in Götz et al. (2011) detailliert beschrieben.

Die Proben sollten sofort nach der Probenahme (auf Eis) gekühlt werden und so baldmöglichst ins Labor transportiert werden.

Möglichst direkt nach Ankunft im Labor sollten die Proben weiter verarbeitet bzw. analysiert werden. Ist das nicht möglich, können sie bis zu 24 h im Dunkeln bei $0-5^{\circ}\text{C}$ gelagert werden (International Organization for Standardization, 1998). Die maximale Lagerungszeit ist im Allgemeinen abhängig von den zu analysierenden Stoffen (International Organization for Standardization, 1992). Östrogene werden beispielsweise bereits sehr rasch ab- bzw. umgebaut (innerhalb weniger Stunden), wohingegen PSII-Hemmstoffe in der Regel stabiler sind. Die US Environmental Protection Agency (EPA) lässt für Biotests in Ausnahmefällen eine Lagerung bis zu 72 h zu (US EPA, 2002). Die Lagerung bei minus 20°C kann für bis zu zwei Monate erfolgen (International Organization for Standardization, 1998).

Eine Vorfiltration vor der Lagerung ist im Gegensatz zur chemischen Analytik für bestimmte Stoffe (z.B. bei Anionen, Ammonium oder Phosphor) (International Organization for Standardization, 2003) nicht zwingend notwendig. Die Filtration für die Biotests kann auch erst nach dem Auftauen und vor der Extraktion der Proben erfolgen.



2.4 Probenaufbereitung

Zur weiteren Aufbereitung müssen die Wasserproben filtriert werden um evtl. vorhandene feste Partikel zu entfernen. Hierfür sind Glasfaserfilter (z.B. APFD 09050, 1 µm, Millipore) geeignet. (Homazava, 2009). Bei der Auswahl der Filter und weiterer zur Probenaufbereitung benötigter Materialien, die mit der Probe in Kontakt kommen, sollte auf die Verwendung von inerten Materialien geachtet werden, um eine Kontamination der Probe mit östrogen-aktiven Stoffen und eine Sorption von Stoffen zu vermeiden. Im Allgemeinen sind Glasfaserfilter und Hilfsmaterialien aus Teflon, Glas und Edelstahl geeignet. Von einer Verwendung von Kunststoffschläuchen wird abgeraten, da in diesen oft östrogen-aktive Stoffe enthalten sind. Auch bei der Wahl der Lösungsmittel muss darauf geachtet werden, dass sie keine hormonaktiven Stoffe wie beispielsweise UV-Filtersubstanzen beinhalten. Das Oekotoxzentrum steht für Fragen zu geeigneten Materialien gerne zur Verfügung.

Die filtrierte Wasserprobe wird anschliessend mit einer geeigneten Extraktionsmethode aufkonzentriert. Um eine gute quantitative Extraktion der gewünschten Stoffe zu erreichen und eine gute Reproduzierbarkeit mit geringer Variabilität der Methodik bei möglichst geringem Aufwand zu gewährleisten, ist eine Festphasenextraktion (Liška, 2000) oder eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid Liquid Extraction, LLE) (Blumberg, 1988) geeignet. Mit dem kombinierten Algentest können auch native Proben aus dem ARA-Ablauf gemessen werden. Für die Untersuchung von ARA-Ablaufproben mit dem YES ist immer eine Anreicherungsmethode erforderlich.

Für die Messung der Belastung von Abwasser mit östrogen-aktiven und PSII-hemmende Stoffen mittels *in vitro*-Biotests empfehlen wir eine **Festphasenextraktion (SPE)** zur Anreicherung zu verwenden. Dies ist die heutzutage am häufigsten verwendete Methode zur Aufkonzentrierung von organischen Stoffen aus Wasserproben. Hierbei 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 der Salzgehalt 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). Die genaue Durchführung der Festphasenextraktion ist in einer Standardarbeitsanweisung (Ecotox Centre, 2015) (siehe Informationen in Anhang 1) beschrieben.



3 Testverfahren für die Untersuchung der Wasserqualität auf eine Belastung mit östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen

Für die integrative Beurteilung der Wasserqualität kommen verschiedene Biotests in Frage. Im Folgenden sind die Gründe für den Fokus des vorliegenden Grobbeurteilungskonzeptes auf Stoffe mit östrogenen (Box 1) und Photosystem II-hemmender Wirkung (Box 2) erläutert.

Box 1: Warum Östrogene?

Die Gruppe der östrogen-aktiven Stoffe wurde durch die Begleitgruppe des Moduls Ökotoxikologie ausgewählt, da diese Stoffe nachweislich die Reproduktionsfähigkeit von Fischen stören können (Kidd et al., 2007), sie in der Schweiz in schädigenden Konzentrationen vorkommen können (Vermeirssen et al., 2005), aber zum Teil analytisch schwer nachweisbar sind (Götz et al., 2011).

Ökotoxikologisch basierte Qualitätskriterien, die auf der Bewertung von Einzelstoffen anhand analytischer Daten basieren, liegen für besonders aktive Stoffe, wie das synthetische 17 α -Ethinylestradiol (EE2), bei weniger als 1 Nanogramm pro Liter (siehe auch www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/). Darüber hinaus werden unbekannte Wirkungen von Chemikalienmischungen bei dieser Bewertung nicht berücksichtigt (Junghans et al., 2013; Kase et al., 2011). Daher sind Methoden zur Risikobewertung, die allein auf chemisch-analytischen Daten beruhen, nur bedingt auf Umweltproben anwendbar und Qualitätskriterien für östrogen-aktive Stoffe analytisch sehr schwer zu überwachen. Die Messung der östrogenen Aktivität im Biotest stellt darüber hinaus einen Summenparameter für alle Stoffe mit diesem Wirkmechanismus dar.

Wichtige östrogen-aktive Stoffe, die in der Schweiz in umweltrelevanten Konzentrationen gemessen werden sind 17 α -Ethinylestradiol, 17 β -Estradiol, Estron, Bisphenol A und Nonylphenol (z.B. Gälli et al., 2009).

Box 2: Warum Algen und Photosystem II-hemmende Stoffe?

Die Gruppe dieser herbizid-wirksamen Stoffe wurde ausgewählt, da sie eine in der Schweiz wichtige Schadstoffgruppe darstellt, die sehr spezifisch auf Primärproduzenten wirkt. Die zu dieser Gruppe gehörenden Organismen wie Algen und höhere Pflanzen stehen an der Basis der Nahrungskette und übernehmen elementare Funktionen wie die Produktion von Sauerstoff. Sie dienen auch als wichtige Nahrungsquelle für Organismen höherer Ernährungsebenen, z.B. Wasserflöhe, Fische etc. Werden sie durch Photosystem II-hemmende Herbizide geschädigt, kann das weitreichende Folgen auf die Nahrungskette haben (z.B. Ralph et al., 2007). Eine Hemmung der Photosynthese wirkt sich neben den direkten Effekten auch auf das Wachstum und auf die Fähigkeit aus, mit anderen Stressfaktoren zurechtzukommen (Ralph et al., 2007).

Zur Gruppe der Photosystem II-hemmenden Herbizide gehören Stoffe wie Atrazin, Diuron, Isoproturon, Irgarol, Simazin, Terbutryn und Terbutylazin. Diese Stoffe werden in Pflanzenschutzmitteln und als Biozide eingesetzt und gelangen sowohl aus diffusen als auch aus Punktquellen in die Gewässer. Sie werden in konventionellen ARA im Gegensatz zu Östrogenen zu einem deutlich geringeren Anteil entfernt (z.B. Abegglen und Siegrist, 2012; Kienle et al., 2011). Die Messung der Photosyntheseaktivität ist hierbei ein Summenparameter für alle Herbizide mit diesem Wirkmechanismus, wodurch, wie bei der Messung von östrogen-aktiven Stoffen (Box 1), auch Mischungseffekte berücksichtigt werden können. Zudem reagiert der Algentest auch auf Stoffe die nicht primär als Herbizide gelten (z.B. Triclosan, verschiedene Pharmazeutika und Metalle) (Hall et al., 2009; Kühn und Pattard, 1990; Yang et al., 2008).

PSII-hemmende Stoffe werden in Schweizerischen Oberflächengewässern regelmässig in umweltrelevanten Konzentrationen gemessen (z.B. Wittmer et al., 2010; Wittwer und Gubser, 2010).



Die für das Grobbeurteilungskonzept ausgewählten Biotests mussten die folgenden Kriterien erfüllen:

- geeignet für Umweltproben (Abwasser- und Oberflächengewässerproben),
- sensitiv,
- robust,
- relativ weit validiert und standardisiert,
- kostengünstig und einfach routinemässig anwendbar,
- anwendbar in Gewässerschutzlaboren von Behörden / privaten Laboren.

Im Folgenden werden zwei Tests beschrieben, die für eine Beurteilung der Belastung mit östrogen-aktiven und PSII-hemmenden Stoffen herangezogen werden können:

- ein kombinierter Algentest für die Messung von PSII-hemmenden Stoffen,
- ein Test mit genetisch veränderten Hefezellen, wie z.B. der Yeast Estrogen Screen (YES), für die Messung von östrogen-aktiven Stoffen.

Bei beiden Tests wurde ihre gute Eignung für die Messung der oben genannten Effekte im Abwasser bereits in früheren Studien in der Schweiz (z.B. (Escher et al., 2008b; Kienle et al., 2011; Kienle et al., 2012; Vermeirssen et al., 2005) und auch international (Legler et al., 2002; Leusch et al., 2010; Leusch, 2008; Murk et al., 2002; Struijs et al., 2010) gezeigt. Der Test zur Bestimmung östrogen-aktiver Stoffe zeigt darüber hinaus auch eine gute Übereinstimmung mit *in vivo*-Ergebnissen (Erhöhung der Konzentration von Vitellogenin, einem Vorläufer des Eidotterproteins, im Blut von männlichen Fischen bzw. Jungfischen) (z.B. (Kienle et al., 2011; Kunz et al., 2006; Vermeirssen et al., 2005).

Die Tests befinden sich derzeit noch in Vorbereitung zur Zertifizierung bzw. in der Zertifizierungsphase durch die ISO. Für beide Tests gibt es Varianten, die zwar ähnlich aufgebaut sind, sich aber in Details unterscheiden. Welche Variante letztendlich zertifiziert wird, ist derzeit noch nicht bekannt. Die endgültige Testauswahl kann somit erst dann erfolgen, wenn die Zertifizierungsarbeiten abgeschlossen sind. Im Folgenden werden die Testsystemvarianten beschrieben, für die es in der Schweiz schon einige Erfahrungswerte gibt. Die vorgestellten Testsysteme werden beide am Oekotoxzentrum aktuell so durchgeführt und kommen zurzeit in verschiedenen Studien zur Anwendung (z.B. im Testverfahren zur Ozonierung von Abwasser im Labormassstab (Schindler Wildhaber et al., 2015), laufendes VSA-Projekt, oder im Projekt EcoImpact der Eawag zur Beurteilung der Auswirkungen von Kläranlagenabwasser auf Gewässerökosysteme: <http://www.eawag.ch/de/forschung/wasser-fuer-die-oekosysteme/schadstoffe/ecoimpact/>).

Tab. 1 gibt einen ersten Überblick über die Testsysteme. In den Kapiteln 3.1 und 3.2 werden diese genauer beschrieben. Eine Anleitung zur Durchführung der Biotests findet sich in den jeweiligen SOPs (siehe Informationen in Anhang 2). In Anhang 3 und Anhang 4 sind Informationen zur Validierung der beiden Tests zusammengestellt.



Tab. 1: Übersicht über den kombinierten Algentest und den Yeast Estrogen Screen

EC: Effektkonzentration, BEQ: Bioanalytische Äquivalenzkonzentration

Test	Kombinierter Algentest	Yeast Estrogen Screen (YES)
Effekt/Endpunkt	Hemmung der Photosynthese und des Wachstums	Aktivierung des menschlichen Östrogenrezeptors
Anwendung	ARA-Auslauf Belastete Oberflächengewässer	ARA-Auslauf
Allgemeine Informationen		
Testorganismus	einzellige Grünalgen	genetisch veränderte Bäckerhefe
Testprinzip	Auswirkungen von Umweltproben auf die Photosyntheseaktivität und das Wachstum der Algen	Nachweis der Aktivierung des menschlichen Östrogenrezeptors α durch östrogen-aktive Stoffe
Effektparameter	EC _x , BEQ	EC _x , BEQ
Kultivierung und Testdauer		
Lagerung der Organismen/Zellen	als Agarkulturen bei 0-5°C für 6 Monate	Kryokultur bei -20°C für maximal 4 Monate bei -80°C für maximal 1 Jahr
Testformat	96-Well-Platten	96-Well-Platten
Vorkultur ab Langzeitlagerung	5 Tage	mind. 1 Tag (vor jedem Testansatz)
Testdauer (ab Exposition mit Probe)	24 Stunden	72 Stunden
Kosten		
Benötigte Geräte	ca. 80'000 CHF (inkl. allg. Laborausrüstung) (+ ca. 20'000 CHF für Mikrotiterplattenlesegerät und Sterilbank) (nach Oekotoxzentrum-Aufstellung)	ca. 44'000 CHF (inkl. allg. Laborausrüstung) (+ ca. 20'000 CHF für Mikrotiterplattenlesegerät und Sterilbank) (nach Oekotoxzentrum-Aufstellung)
Kosten/Probe (3 technische Replikate in 8 Verdünnungen, ohne Aufkonzentrierung)	ca. 350 / 500 CHF (Oekotoxzentrum)	ca. 350 / 500 CHF (Oekotoxzentrum)



3.1 Kombiniertes Algentest zur Erfassung von PSII-hemmenden Stoffen

Der kombinierte Algentest wird mit einzelligen Grünalgen der Art *Raphidocelis subcapitata* (früherer Name: *Pseudokirchneriella subcapitata*) durchgeführt. Mit dem Test können Auswirkungen auf die Photosynthese der Algen bestimmt werden. Diese spezifische Wirkung von Herbiziden und anderen Stoffen mit dem entsprechenden Wirkmechanismus (Photosystem II-Hemmstoffe) tritt sehr schnell auf (nach wenigen Minuten). Die Messung dieses Parameters erfolgt 2 h nach Testbeginn. Nach 24 h können auch Auswirkungen auf das Wachstum (Erhöhung der Zellzahl) gemessen werden. Für eine Beurteilung der Wasserqualität bzgl. PSII-hemmender Stoffe ist dieser Endpunkt nicht geeignet. Daher wird hierfür nur die Hemmung der Photosynthese verwendet. Da beim Test jedoch immer beide Endpunkte gemessen werden, wird die zugehörige Methodik nachfolgend ebenfalls beschrieben. Abb. 4 zeigt ein Beispiel für eine Testplatte.

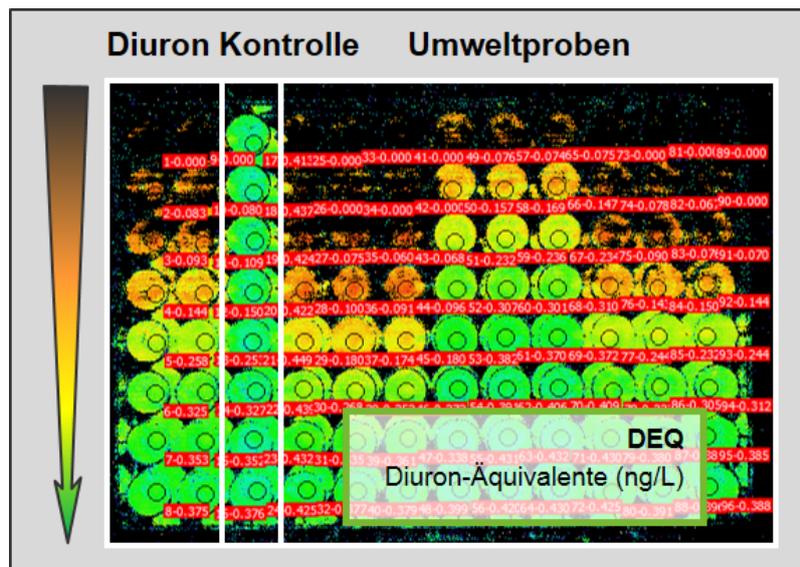


Abb. 4: Kombiniertes Algentest: Testplatte zur Messung der Quantenausbeute der Photosynthese.

In den ersten beiden Spalten findet sich eine 1:2 Verdünnungsreihe mit der Referenzsubstanz Diuron. Die Spalte 3 enthält nur Kontrollmedium. In den Spalten 4-12 wurden Extrakte von Umweltproben in einer 1:2 Verdünnungsreihe in je 3 technischen Replikaten untersucht. Je dunkler die Färbung, desto geringer ist die Quantenausbeute. Eine grüne Färbung bedeutet keine Hemmung der Photosynthese. Effekte in den Umweltproben werden jeweils relativ zur Referenzsubstanz Diuron untersucht und in Diuron-Äquivalenten (DEQ) (ng/L) angegeben.

Der Test ist schnell und einfach durchführbar. Er eignet sich daher für die routinemässige Anwendung in kantonalen und privaten Laboren. Aufgrund seiner Durchführung in 96-Well Mikrotiterplatten und der Dauer von 24 h, ist er im Vergleich zum ISO und OECD-zertifizierten Algenwachstumshemmtest mit 72 h Dauer in Erlenmeyerkolben (International Organization for Standardization, 2012; OECD, 2006) deutlich weniger aufwändig. Es muss jedoch beachtet werden, dass Stoffe, die erst nach einer längeren Expositionszeit als 24 h toxisch wirken, im kombinierten Algentest nicht erfasst werden, ebenso wenig wie eine mögliche Erholung. Der vorgeschlagene Test erlaubt durch die Kombination der Messung von PSII-Hemmung und Wachstum jedoch die Erfassung unterschiedlicher Wirkmechanismen. Daher ist er für das Umweltmonitoring sehr gut geeignet. Zudem hat sich der Endpunkt PSII-Hemmung in bisherigen Studien oft als sensitiver als der Endpunkt Wachstum erwiesen. Obwohl der Test derzeit noch nicht zertifiziert ist, gibt es dafür eine breite Erfahrungsbasis in der Schweiz (Escher et al., 2005; Escher et al., 2008a; Escher et al., 2009; Kienle et al., 2011; Schreiber et al., 2007; Vermeirssen et al., 2010), in England und Australien (Bengtson Nash et al., 2006; Bengtson Nash et al., 2005; Macova et al., 2010; Reungoat et al., 2010) und mit einem



ähnlichen Testsystem in den Niederlanden (Durand et al., 2009; Struijs et al., 2000; Struijs et al., 2010; van der Grinten et al., 2010). Die ISO-Zertifizierung eines miniaturisierten Algentests mit der einzelligen Grünalge *Raphidocelis subcapitata* wird derzeit vorbereitet.

Im Folgenden werden die Durchführung, die Datenauswertung ebenso wie die Validierung des Tests kurz beschrieben.

3.1.1 Überblick: Test-Durchführung und Datenauswertung

Testorganismus

Die Algen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Göttingen, Deutschland). Vor Testbeginn werden die Algenzellen im Wachstumsmedium auf einem Orbitalschüttler bei 25°C für insgesamt 5 Tage vorkultiviert/angezüchtet.

Testdurchführung

Der Test wird in 96-Well Mikrotiterplatten nach der Methode von Schreiber et al. (2007) und Escher et al. (2008a) durchgeführt. Als Referenzsubstanz dient das Herbizid Diuron, das eine spezifische Hemmwirkung auf die Photosynthese aufweist. Als Negativkontrolle wird reines Algentest-Medium und als Lösungsmittelkontrolle Ethanol eingesetzt. Die Referenzsubstanz wird in zweifacher Ausführung (Duplikate) untersucht und die Umweltproben werden in zwei oder dreifacher Ausführung (Triplikate) getestet, jeweils in einer 1:2-Verdünnungsreihe mit einer Anfangskonzentration von Diuron von 3×10^{-7} M in Ethanol (entspricht 69'900 ng/L). Nach vollständigem Abdampfen der Lösungsmittel werden die Stoffe in 150 µL Algenmedium rückgelöst.

Zur Bestimmung der geeigneten Test-Konzentration der Abwasserproben wird aufgrund der variierenden Belastung ein Vortest empfohlen, bei dem verschiedene Proben-Konzentrationen in einfacher Ausführung untersucht werden. Geeignete maximale Anreicherungsfaktoren der Umweltproben reichen je nach Belastung von ca. 80-200fach (Abwasserproben) bis hin zu 400fach (Oberflächengewässerproben). Bei hohen Belastungen können auch direkt native Proben untersucht werden.

Schliesslich werden 150 µL der Algenkultur mit einer optischen Dichte (OD_{685}) von 0.1 zu jedem Well hinzugefügt. Die Photosynthesehemmung wird über die effektive Quantenausbeute (oder Fluoreszenzausbeute) (Y) nach Anregung durch Licht mittels eines Maxi-Imaging-PAM-Gerätes (Walz, Effeltrich, Deutschland) nach 2 und 24 h gemessen (siehe auch Escher et al. (2008b) und Schreiber et al. (2007)). Die Wachstumsrate der Algen kann anhand der Messung der optischen Dichte bei 685 nm (OD_{685}) mittels eines Mikrotiterplatten-Spektrometers (z.B. Synergy 2, Biotek, Winooski, USA) in regelmässigen Zeitabständen (nach 0 und 24 h Exposition und zu zwei dazwischenliegenden Zeitpunkten) bestimmt werden.

Datenauswertung

Zur Quantifizierung der Photosynthesehemmung werden bioanalytische Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) berechnet (je nach Testendpunkt auch Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen (TEQ) genannt). Die BEQ ist definiert als jene Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe (z.B. Escher et al., 2008a; Escher et al., 2015). Die Referenzsubstanzen variieren je nach gemessenem spezifischem Endpunkt. Somit kann die Wirksamkeit einer Mischung als Konzentration einer Referenzsubstanz ausgedrückt werden. Je höher der BEQ-Wert, desto wirksamer ist die untersuchte Probe. Die ermittelten Werte werden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (ng/L DEQ) umgerechnet. Die Datenauswertung erfolgt mit Excel und einem geeigneten Statistikprogramm (z.B. GraphPad Prism 5 Software, La Jolla, California, USA) durch Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve für die Referenzsubstanz und die Umweltproben.



3.1.2 Informationen zur Validierung des Testes

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Der kombinierte Algentest kann durch Festphasenextraktion eine Nachweisgrenze von 1-2 ng/L Diuron bzw. DEQ erreichen, die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 3-6 ng/L Diuron bzw. DEQ. Ohne Aufkonzentrierung lag die mittlere Nachweisgrenze im kombinierten Algentest bei 185 ± 85 ng/L Diuron / DEQ ($n = 91$ Tests im Jahr 2014 am Oekotoxzentrum). Die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 632 ± 277 ng/L Diuron / DEQ (siehe Zusammenfassung in Tab. 2). Die Effektkonzentrationen (EC_{50}) der Referenzsubstanz Diuron lagen im Mittel bei 1.86×10^{-8} M Diuron (95% Konfidenzintervall = 1.73×10^{-8} bis 2.01×10^{-8} M).

Tab. 2: Überblick über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im kombinierten Algentest.

DEQ = Diuron-Äquivalenzkonzentration, SPE = Festphasenextraktion

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
Ohne Aufkonzentrierung	185 ± 85 ng/L DEQ	632 ± 277 ng/L DEQ
Mit SPE (100 bis 200-fache Anreicherung)	1 - 2 ng/L DEQ	3 - 6 ng/L DEQ

Wiederholbarkeit

Zur Untersuchung der Wiederholbarkeit wurde die gleiche Probe vier Mal am selben Tag sowie an fünf unterschiedlichen Tagen gemessen. Untersucht wurden nachgebildete Extrakte von Wasserproben, d.h. Ethanol, das mit Diuron bzw. einer Mischung aus vier PSII-Hemmstoffen versetzt wurde (ohne Festphasenextraktion/SPE). Die daraus ermittelte Variabilität der DEQ-Werte aus dem kombinierten Algentest lag bei den nachgebildeten Extrakten zwischen 5 und 11% (siehe Tab. 18 im Anhang 3).

Wiederfindung

Zur Untersuchung der Wiederfindung wurden sowohl nachgebildete Extrakte von Wasserproben als auch SPE-Extrakte von Reinstwasser und Abwasser im kombinierten Algentest untersucht, die mit Diuron bzw. einer Mischung aus vier PSII-Hemmstoffen versetzt waren.

Nachgebildete Extrakte von Wasserproben und Reinstwasser: Die Wiederfindung von nominal 50 und 500 bzw. 1000 ng/L Diuron bzw. DEQ in nachgebildeten Extrakten von Wasserproben bzw. SPE-Extrakten von Reinstwasser lag zwischen 75 und 102% (bezogen auf durch chemische Analytik gemessene Konzentrationen).

Abwasser: In SPE-Extrakten von Abwasser konnten 99 bis 125% des zugegebenen Diurons wiedergefunden werden. Berechnet man die Wiederfindung anhand der DEQ-Werte, die in den mit Diuron versetzten Reinstwasser-Proben im Biotest gemessen wurden (durch chemische Analytik bestimmt: 96, 460 bzw. 952 ng/L, im Biotest gemessen: 44, 365 und 755 ng/L), liegt sie für den kombinierten Algentest zwischen 112 und 147 %.

Gesamtvariabilität (Festphasenextraktion + Biotest)

Die Gesamtvariabilität wurde anhand der Ergebnisse aus Festphasenextraktion von Reinstwasser (versetzt mit Diuron bzw. einer Mischung aus vier PSII-Hemmstoffen) und Abwasser mit anschliessendem kombiniertem Algentest ermittelt.

Reinstwasser: Bei schwach (50 ng/L Diuron bzw. DEQ) und stark (500 ng/L Diuron bzw. DEQ) belasteten Proben ergab sich eine Gesamtvariabilität der DEQ-Werte von 7 bis 17%. Die Variabilität in schwach und stark belasteten Proben unterschied sich nicht deutlich.

Abwasser: In Abwasser betrug die Gesamtvariabilität der DEQ-Werte 10%.



Tab. 3 gibt einen Überblick über die Validierungsdaten. Detaillierte Informationen zu den Untersuchungen finden sich in Anhang 3.

Tab. 3: Zusammenfassung der Daten zur Validierung des kombinierten Algentests.

Abw = Abwasser, n = Anzahl Wiederholungen je Konzentration, nb = nicht bestimmt, SPE = Festphasenextraktion.

		Wiederholbarkeit	Wiederfindung Biotest	Gesamtvariabilität
		(n = 8 für Ethanol bzw. 4 für Reinstwasser)	(n = 8 bzw. 5 (Abw.))	(n = 4 bzw. 10 (Abw.))
Ethanol bzw. Reinstwasser (versetzt mit Diuron bzw. PSII-Hemmstoffen)	Tiefer Konzentrationsbereich	5 - 15%	75 - 98%	7 - 15%
	Mittlerer/hohes Konzentrationsbereich	5 - 17%	82 - 102%	10 - 17%
Abwasser (versetzt mit Diuron)		nb	104 - 125% (bezogen auf chemische Analytik) 112 - 147% (im Biotest gemessen*)	10%

* bezogen auf Werte die im Biotest in mit Diuron versetztem Reinstwasser gemessen wurden

3.2 Yeast Estrogen Screen (YES) zur Erfassung von östrogen-aktiven Stoffen in Abwasser

Der Yeast Estrogen Screen (YES), auch Hefezellöstrogentest genannt, wird mit genetisch veränderter Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durchgeführt und zeigt die östrogene Aktivität einer Probe an (Routledge und Sumpter, 1996). Er ist vor allem für die Untersuchung von Abwasserproben geeignet. Der YES ist eine einfache Methode, die in der Schweiz bereits seit mehr als 10 Jahren etabliert ist und weltweit viel verwendet wird. Er zeichnet sich durch niedrige Unterhalts- und Verbrauchskosten, Einfachheit der Einarbeitung und freie Verfügbarkeit des Testorganismus aus. Der Test wurde bereits in diversen Projekten zum Nachweis östrogenen 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). Die ISO-Zertifizierung des YES wurde initiiert.

Abb. 5 zeigt ein Beispiel für eine Testplatte im YES.

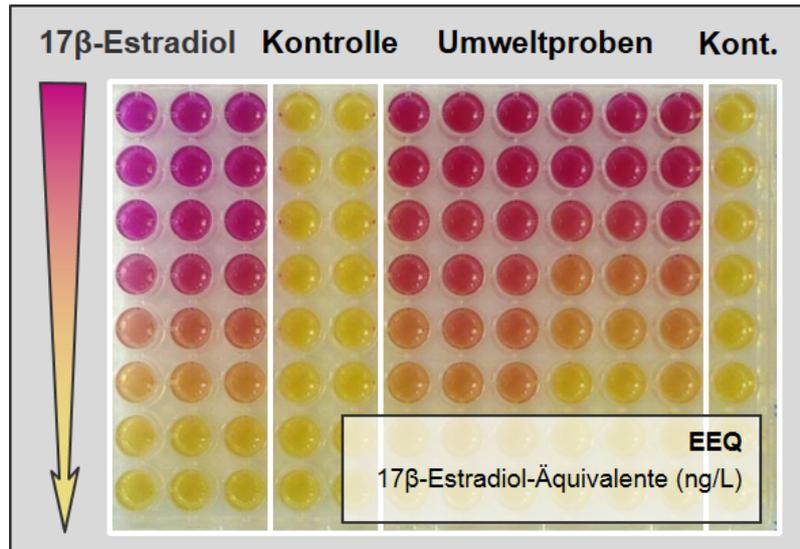


Abb. 5: Yeast Estrogen Screen (YES): Testplatte zur Messung der östrogenen Aktivität.

In den ersten drei Spalten findet sich eine 1:2 Verdünnungsreihe mit der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol. Die Spalten 4, 5 und 12 enthalten nur Kontrollmedium. In den Spalten 6-11 wurden Extrakte von Umweltproben in einer 1:2 Verdünnungsreihe in je 3 technischen Replikaten untersucht. Je dunkler die Färbung, desto höher ist die östrogene Aktivität. Eine gelbe Färbung bedeutet keine östrogene Aktivität. Effekte in den Umweltproben werden jeweils relativ zur Referenzsubstanz 17 β -Estradiol untersucht und in 17 β -Estradiol-Äquivalenten (EEQ) (ng/L) angegeben.

Im Folgenden werden die Durchführung, die Datenauswertung ebenso wie die Validierung des Tests kurz beschrieben.

3.2.1 Überblick: Test-Durchführung und Datenauswertung

Testorganismus

Die genetisch veränderten Hefezellen stammen von John Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK). Ein Bezug in der Schweiz kann über das Oekotoxzentrum erfolgen. Vor Testbeginn werden die Hefezellen in Wachstumsmedium (Minimalmedium) auf einem Orbitalschüttler bei 30°C für 24 h vorkultiviert.

Testdurchführung

Der Test wird in 96-Well-Mikrotiterplatten nach der Methode von Routledge und Sumpter (1996) und Escher et al. (2008b) durchgeführt. Als Referenzsubstanz dient das Östrogen 17 β -Estradiol (E2). Reines Testmedium wird als Negativkontrolle und Ethanol als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Am Testtag werden die Referenzsubstanz und die Umweltproben, ebenso wie beim Algentest, in Duplikaten oder Triplikaten in einer 1:2-Verdünnungsreihe auf die Platten pipettiert. Die Test-Konzentrationen von 17 β -Estradiol reichen von 1.25×10^{-9} bis 9.77×10^{-12} M 17 β -Estradiol (entspricht 341 bis 2.7 ng/L).

Um die geeigneten Test-Konzentrationen für die Abwasserproben zu bestimmen wird im YES, ebenso wie beim Algentest, ein Vortest empfohlen. Geeignete maximale Anreicherungsfaktoren der Umweltproben reichen, je nach Belastung, von ca. 20-150fach (Abwasserproben) bis hin zu 400fach (Oberflächengewässerproben). Im Ablauf von stark belasteten kommunalen Kläranlagen (ab ca. 9 ng EEQ/L) können auch direkt native Proben mit ausreichender Sensitivität untersucht werden.

Nach Pipettieren aller Proben wird das Lösungsmittel vollständig in einer Sterilbank abgedampft. Währenddessen erfolgen die Bestimmung der Zelldichte der Hefezellen aus der



Vorkultur und die Vorbereitung von Testmedium. Dieses Testmedium wird mit 4×10^7 Hefezellen versetzt. Im Anschluss wird die Hefezellsuspension auf die Testplatte pipettiert (200 μ L/Well) und die Platte bei 30°C inkubiert.

Nach 72 h werden die Zelldichte über die Messung der optischen Dichte bei 620 nm (OD_{620}) und die Farbveränderung (OD_{540}) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen (z.B. Synergy 2, Biotek, Winooski, USA).

Datenauswertung

Zur Quantifizierung der östrogenen Aktivität werden, wie beim Algentest, bioanalytische Äquivalenzkonzentrationen berechnet. Diese sind bezogen auf die Referenzsubstanz 17 β -Estradiol, sogenannte 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ). Die ermittelten EEQ-Werte werden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in ng EEQ/L umgerechnet. Die Datenauswertung erfolgt, wie beim Algentest, mit Excel und einem geeigneten Statistikprogramm.

3.2.2 Informationen zur Validierung des Testes

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Der YES kann durch Festphasenextraktion eine Nachweisgrenze von 0.09 ng/L E2 bzw. EEQ und eine Bestimmungsgrenze von rund 0.22 ng/L E2 bzw. EEQ erreichen. Damit ist auch eine Messung von schwach belasteten Proben möglich. Ohne Aufkonzentrierung lag die mittlere Nachweisgrenze im YES bei 9.2 ± 2.0 ng/L E2 / EEQ (n = 44 Tests im Jahr 2013 am Ökotoxzentrum, in diesem Jahr wurden auch die Validierungsarbeiten durchgeführt). Die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 11 ± 2.6 ng/L E2 / EEQ. Die Effektkonzentrationen (EC_{50}) der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol lagen im Mittel bei 1.0×10^{-10} M 17 β -Estradiol (95% Konfidenzintervall = 9.5×10^{-11} bis 1.1×10^{-10} M). Die Daten zu Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Überblick über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Yeast Estrogen Screen.

EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration, SPE = Festphasenextraktion

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
Ohne Aufkonzentrierung	9.2 ± 2.0 ng/L EEQ	11 ± 2.6 ng/L EEQ
Mit SPE (50 bis 100-fache Anreicherung)	0.09 - 0.19 ng/L EEQ	0.11 - 0.22 ng/L EEQ

Wiederholbarkeit

Zur Untersuchung der Wiederholbarkeit wurde die gleiche Probe fünf Mal am selben Tag sowie an fünf unterschiedlichen Tagen gemessen. Untersucht wurden nachgebildete Extrakte von Wasserproben, d.h. Ethanol, das mit 17 β -Estradiol bzw. einer Mischung aus vier östrogen-aktiven Stoffen versetzt wurde (ohne Festphasenextraktion/SPE). Die daraus ermittelte Variabilität der im YES ermittelten EEQ-Werte lag bei nachgebildeten Extrakten zwischen 12 und 31%, wobei die höchste Variabilität in der Probe mit 0.3 ng EEQ/L, also einer Konzentration nahe an der Bestimmungsgrenze, gemessen wurde.

Wiederfindung

Zur Untersuchung der Wiederfindung wurden sowohl nachgebildete Extrakte von Wasserproben als auch SPE-Extrakte von Reinstwasser und Abwasser im YES untersucht, die mit 17 β -Estradiol bzw. einer Mischung aus vier östrogen-aktiven Stoffen versetzt waren.

Nachgebildete Extrakte von Wasserproben und Reinstwasser: Die Wiederfindung von nominal 6 ng/L 17 β -Estradiol in nachgebildeten Extrakten von Wasserproben wie auch SPE-Extrakten



von Reinstwasser erwies sich als robust und lag zwischen 82 und 108%. Einzig in schwach belasteten Proben war die Wiederfindung im YES nicht sehr hoch (40 bis 63%), allerdings liegt die untersuchte Konzentration (0.3 ng/L E2) nahe an der Bestimmungsgrenze (0.11-0.22 ng/L E2).

Abwasser: In SPE-Extrakten von Abwasser konnten nominal 48 bis 81% des zugegebenen 17 β -Estradiols wiedergefunden werden. Berechnet man die Wiederfindung anhand der EEQ-Werte, die tatsächlich in den mit 17 β -Estradiol versetzten Reinstwasser-Proben gemessen wurden (z.B. nominal 6 ng/L, gemessen 4.4 ng/L), liegt sie für den YES zwischen 86 und 114%.

Gesamtvariabilität (Festphasenextraktion und Biotest)

Die Gesamtvariabilität wurde anhand der Ergebnisse aus Festphasenextraktion von Reinstwasser (versetzt mit 17 β -Estradiol bzw. einer Mischung aus vier östrogen-aktiven Stoffen) und Abwasser mit anschließendem YES ermittelt.

Nachgebildete Wasserproben: Die Gesamtvariabilität der EEQ-Werte in den mittel bis stark belasteten Proben (max. 6 ng/L E2 bzw. EEQ) lag bei 17 bis 19%. Die Gesamtvariabilität bei den schwach belasteten Proben (0.3 ng/L E2 bzw. EEQ) war mit 26% etwas höher.

Abwasser: In Abwasser betrug die Gesamtvariabilität der EEQ-Werte 21%.

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) sind die Ergebnisse der Validierung zusammengefasst. Detaillierte Informationen zu den Untersuchungen finden sich in Anhang 4.

Tab. 5: Zusammenfassung der Daten zur Validierung des Yeast Estrogen Screen.

Abw = Abwasser, n = Anzahl Wiederholungen je Konzentration, nb = nicht bestimmt, SPE = Festphasenextraktion.

		Wiederholbarkeit (n = 10)	Wiederfindung Biotest (n = 10 bzw. 5 (Abw.))	Gesamtvariabilität (n = 5 bzw. 10 (Abw.))
Ethanol bzw. Reinstwasser (versetzt mit 17 β -Estradiol bzw. östrogen-aktiven Stoffen)	Tiefer Konzentrationsbereich	31%	40 - 63%	26%
	Mittlerer/hocher Konzentrationsbereich	12 - 23%	79 - 108%	17 - 19%
Abwasser (versetzt mit 17 β -Estradiol)		nb	48 - 81% (nominal) 86 - 114% (gemessen*)	21%

* bezogen auf Werte die im Biotest in mit E2 versetztem Reinstwasser gemessen wurden



4 Möglichkeiten zur Beurteilung der Wasserqualität anhand der ausgewählten Biotests

Wurde eine östrogene bzw. PSII-hemmende Belastung im Gewässer ermittelt, sollte sie anschliessend bewertet werden. Dies kann über eine Risikoanalyse erfolgen, also über den Vergleich der gemessenen Konzentrationen resp. Konzentrationsäquivalenten mit den entsprechenden Qualitätskriterien. Im Fall einer Überschreitung solcher Qualitätskriterien kann eine mögliche Gefährdung von Wasserlebewesen nicht ausgeschlossen werden (Götz et al., 2011; Junghans et al., 2013; Kase et al., 2011). Zur Differenzierung der Beurteilung können, wie im Rahmen des MSK üblich, Bewertungssysteme mit mehreren Zustandsklassen verwendet werden.

4.1 Ermittlung von Risikoquotienten

Um die Belastung eines Fließgewässers zu beurteilen, werden die ermittelten bioanalytischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQs) aus Biotests oder die gemessenen Umweltkonzentrationen (MECs) aus der chemischen Analytik mit chronischen Qualitätskriterien (siehe auch Götz et al., 2011; Kase et al., 2011) verglichen. Aus dem Verhältnis der beiden Werte werden anschliessend Risikoquotienten berechnet. Darunter versteht man das Verhältnis zwischen der gemessenen Umweltkonzentration und dem Qualitätskriterium. Im Fall von spezifischen Biotests sind gemessene Umweltkonzentrationen bioanalytische Äquivalenzkonzentrationen z.B. EEQs aus dem YES und DEQs aus dem kombinierten Algentest.

Die Berechnung des Risikoquotienten erfolgt anhand der folgenden Gleichung:

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

mit:

MEC = gemessene Umweltkonzentration

BEQ = bioanalytische Äquivalenzkonzentration

EQS = Umweltqualitätsstandard = chronisches Qualitätskriterium (CQK)

Ist der Risikoquotient <1 ist das Risiko tolerierbar, bei einem Risikoquotienten >1 ergibt sich ein nicht tolerierbares Risiko (Junghans et al., 2013).

Aus den gemessenen BEQ-Werten können so direkt Gewässerzustandsklassen abgeleitet werden (siehe auch Liechti (2010)). Dieses Beurteilungsverfahren ermöglicht die Identifizierung von Gewässern oder Gewässerabschnitten mit problematischen Konzentrationen an östrogenaktiven und/oder PSII-hemmenden Stoffen.

Für die Beurteilung der östrogenen Belastung wird das Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L) herangezogen. Die Beurteilung einer Belastung mit Herbiziden, welche die Photosynthese von Algen beeinträchtigen, erfolgt anhand des Qualitätskriteriums für Diuron (70 ng/L). Diese Qualitätskriterien wurden, u.a., aus den folgenden Gründen für die Beurteilung ausgewählt:

a) Östrogene Wirkungen

Das chronische Umweltqualitätskriterium für 17 β -Estradiol (E2) liegt zwischen dem Kriterium von Estron (E1) (3.6 ng/L) und 17 α -Ethinylestradiol (EE2) (0.037 ng/L). Zudem werden die Hauptanteile der östrogenen Aktivität in Oberflächengewässern meist durch E1 und E2 verursacht. Eine Beurteilung ist leicht durchzuführen, da in den Biotests die östrogene Wirkung bereits in 17 β -Estradiol-Äquivalenten ermittelt wird. Weitere Details hierzu finden sich auch in Kienle et al. (2012).



b) PSII-hemmende Wirkungen

Das chronische Umweltqualitätskriterium für Diuron liegt tiefer als die Qualitätskriterien mehrerer weiterer Hemmstoffe des Photosystems II (z.B. Isoproturon: 640 ng/L und Terbutylazin: 220 ng/L, siehe www.oekotoxzentrum.ch) und höher als die Qualitätskriterien für Terbutryn (65 ng/L) und Irgarol (2.3 ng/L), das aber inzwischen nicht mehr eingesetzt wird. Somit wird mit der Verwendung dieses Qualitätskriteriums ein guter Schutz aquatischer Primärproduzenten erreicht. Diuron ist zudem ein sehr potenter Hemmstoff des Photosystems II, was auch das niedrige chronische Qualitätskriterium zeigt. Dieses umweltrelevante Herbizid wurde in der Schweiz in Konzentrationen von 100-300 ng/L gemessen (Wittmer et al., 2010). Eine Beurteilung ist leicht durchzuführen, da in den Biotests die PSII-hemmende Wirkung bereits in Diuron-Äquivalenten ermittelt wird.

4.2 Möglichkeiten für Beurteilungssysteme

4.2.1 Bewertung der Wasserqualität in drei Zustandsklassen

Eine Möglichkeit ist die Einteilung der gemessenen östrogenen bzw. PSII-hemmenden Belastung der Umweltprobe anhand eines 3-klassigen Beurteilungssystems (Tab. 6).

Tab. 6: Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe aus kommunalem Abwasser basierend auf drei Zustandsklassen (angepasst nach Götz et al. (2011) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).

BEQ = bioanalytische Äquivalenzkonzentration, RQ = Risikoquotient = Verhältnis von TEQ zu chronischem Umweltqualitätskriterium

Beurteilung		Bedingung/Beschreibung		Einhaltung Zielvorgabe
	sehr gut bis gut	BEQ ist kleiner als das chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	RQ < 1	Eingehalten
	mässig	BEQ ist kleiner als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	1 \leq RQ < 2.5	Überschritten
	unbefriedigend bis schlecht	BEQ ist gleich oder grösser als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol/Diuron	RQ \geq 2.5	

In Werten ausgedrückt ergibt sich die Aufteilung in folgende Klassen für östrogen-aktive Stoffe (Tab. 7):

Tab. 7: Vorschlag für eine Einteilung in drei Zustandsklassen anhand der gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).

Beurteilung		Bedingung	Einhaltung Zielvorgabe
	sehr gut bis gut	EEQ < 0.4 ng/L	Eingehalten
	mässig	0.4 ng/L \leq EEQ < 1 ng/L	Überschritten
	unbefriedigend bis schlecht	EEQ \geq 1 ng/L	

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



nachdem wie viele Daten zu einem Stoff vorhanden sind), keine Langzeit-Effekte auf Organismen zu erwarten. Treten höhere Konzentrationen auf, können solche Effekte nicht ausgeschlossen werden. Die untere Klassengrenze 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).

Für PSII-hemmende Stoffe könnte die Einteilung folgendermassen vorgenommen werden (Tab. 8):

Tab. 8: Vorschlag für eine Einteilung in drei Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für Diuron (70 ng/L).

Beurteilung	Bedingung	Einhaltung Zielvorgabe
sehr gut bis gut	DEQ < 70 ng/L	Eingehalten
mässig	70 ng/L ≤ DEQ < 175 ng/L	Überschritten
unbefriedigend bis schlecht	DEQ ≥ 175 ng/L	

Unter Berücksichtigung der bekannten ökotoxikologischen Daten und von Sicherheitsfaktoren sind bei diesem Stoff bis zu einer Konzentration von 70 ng/L keine chronischen Effekte auf Organismen zu erwarten. Bei höheren Konzentrationen können solche Effekte nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Bewertung der Wasserqualität in fünf Zustandsklassen

Soll die Einteilung analog zum Modulstufenkonzept (Baumann und Langhans, 2010; Liechti et al., 1998) anhand von fünf Beurteilungsklassen erfolgen, sähe eine mögliche Einteilung folgendermassen aus (Tab. 9).

Tab. 9: Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe aus kommunalem Abwasser basierend auf fünf Zustandsklassen (angepasst nach Götz et al. (2011) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).

BEQ = bioanalytische Äquivalenzkonzentration, RQ = Risikoquotient = Verhältnis von BEQ zu chronischem Umweltqualitätskriterium

Beurteilung	Bedingung/Beschreibung	Einhaltung Zielvorgabe
sehr gut	BEQ ist mehr als 10 Mal kleiner als das chronische Qualitätskriterium für 17β-Estradiol/Diuron	RQ < 0.1
gut	BEQ ist 1 bis 10 Mal kleiner als das chronische Qualitätskriterium für 17β-Estradiol/Diuron	0.1 ≤ RQ < 1
mässig	BEQ ist kleiner als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17β-Estradiol/Diuron	1 ≤ RQ < 2.5
unbefriedigend	BEQ ist gleich oder grösser als das 2.5-fache chronische Qualitätskriterium für 17β-Estradiol/Diuron	2.5 ≤ RQ < 10
schlecht	BEQ ist gleich oder grösser als das 10-fache chronische Qualitätskriterium für 17β-Estradiol/Diuron	RQ ≥ 10

In Werten ausgedrückt ergibt sich die Aufteilung in folgende Klassen für östrogen-aktive Stoffe (Tab. 10):



Tab. 10: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).

Beurteilung	Bedingung	Einhaltung Zielvorgabe
sehr gut	EEQ < 0.04 ng/L	Eingehalten
gut	0.04 ng/L ≤ EEQ < 0.4 ng/L	
mässig	0.4 ng/L ≤ EEQ < 1 ng/L	Überschritten
unbefriedigend	1 ng/L ≤ EEQ < 4 ng/L	
schlecht	EEQ ≥ 4 ng/L	

Für PSII-hemmende Stoffe könnte die Einteilung folgendermassen vorgenommen werden (Tab. 11):

Tab. 11: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für Diuron (70 ng/L).

Beurteilung	Bedingung	Einhaltung Zielvorgabe
sehr gut	DEQ < 7 ng/L	Eingehalten
gut	7 ng/L ≤ DEQ < 70 ng/L	
mässig	70 ng/L ≤ DEQ < 175 ng/L	Überschritten
unbefriedigend	175 ng/L ≤ DEQ < 700 ng/L	
schlecht	DEQ ≥ 700 ng/L	

Im Anhang 5 wird dieses Beurteilungssystem beispielhaft in zwei Fallstudien angewendet.

4.2.3 Wertfunktionen zur Beurteilung der Wasserqualität

Das Bewertungskonzept kann, basierend auf dem Leitfaden für die Modulentwicklung nach Richtlinien des Seenkonzepts (Schlosser et al., 2013), ergänzt werden. Ziel dieser Richtlinien ist die zukünftige Erarbeitung methodisch einheitlicher Module, was auch die Synthese verschiedener Module erleichtert. In Anhang 6 wird ein Überblick über mögliche Wertfunktionen für eine Beurteilung und den Umgang mit Unsicherheiten gegeben.



5 Schlussfolgerungen und Ausblick

5.1 Möglichkeiten der Beurteilungsmethode

Die vorgeschlagene Beurteilungsmethode ermöglicht eine integrative Erfassung von Auswirkungen durch östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe. Da die Wirkungen aller in der Wasserprobe vorhandenen Stoffe auf die Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor und die Hemmung des PSII erfasst werden, wird auch eine Beurteilung der Mischungseffekte beider Stoffklassen ermöglicht. Dadurch kann eine erste Grobbeurteilung der ökotoxikologischen Belastung anhand der ausgewählten Effektgruppen durchgeführt werden. Die Belastung mit östrogen-aktiven und PSII-hemmenden Stoffen, zwei relevanten Stoffgruppen für Wasserlebewesen, kann möglicherweise stellvertretend für eine Vielzahl weiterer Belastungen ermittelt werden. Über- oder Unterschreitungen von Qualitätskriterien basierend auf ökotoxikologischen Effektdaten können so ermittelt und bewertet werden. Abschliessend muss bei der Anwendung des vorgestellten Grobkonzeptes beachtet werden, dass mit den ausgewählten Tests spezifische ökotoxikologische Potentiale auf suborganismischer Ebene bestimmt werden können, aber bisher keine direkten Rückschlüsse auf Effekte auf der Ökosystem-Ebene möglich sind.

5.2 Weiteres Vorgehen

Das vorliegende Grobbeurteilungskonzept beschreibt die Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Als pragmatischer Ansatz wurden zunächst zwei Biotests für zwei relevante Stoffgruppen (östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe) ausgewählt: der YES für die Bestimmung von östrogen-aktiven Stoffen und der kombinierte Algentest für die Bestimmung von Photosystem II-hemmenden Stoffen. Beide Tests befinden sich derzeit in Vorbereitung zur Standardisierung bzw. in der Standardisierung durch die Internationale Standardisierungsorganisation (ISO).

Für die weitere Entwicklung von Konzepten zur Beurteilung der Wasserqualität anhand ökotoxikologischer Biotests sind die folgenden Schritte geplant:

- *Standardisierung:* Eine aktive Beteiligung der Schweiz an den Arbeiten zur Teststandardisierung und ISO-Zertifizierung ist für die Finalisierung des Grobbeurteilungskonzeptes essentiell und wird durch das Oekotoxzentrum mit verschiedenen Partnern aktiv unterstützt. Bis zum Abschluss dieser Arbeiten wird es voraussichtlich noch mehrere Jahre dauern.
- *Erweiterung um andere Wirkmechanismen:* Zukünftig wäre es erstrebenswert sukzessive geeignete Tests für weitere Wirkmechanismen bzw. Stoffgruppen in ein Beurteilungskonzept einzubeziehen. Vom Oekotoxzentrum wurde hierfür ein Methodenüberblick mit Vorschlägen für vielversprechende Biotests erarbeitet (Kienle et al., 2015).
- *Erweiterung für die Beurteilung von diffusen Belastungen:* Das vorgestellte Konzept ist derzeit nur für die Anwendung auf Punktquellen (kommunale Abwässer) konzipiert. Es wäre sinnvoll und zu empfehlen, das Konzept in den nächsten Jahren um die Beurteilung der Gewässerbelastung mit Mikroverunreinigungen aus diffusen Quellen zu erweitern (analog BAFU-Projekt „Mikroverunreinigungen aus diffusen Quellen“ (Wittmer et al., 2014)).



6 Referenzen

- Abegglen C, Siegrist H, 2012. Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Umwelt-Wissen Nr 1214: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 210.
- Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen, 2013. Spurenstoffe im Abwasser - Suche nach relevanten Emissionsquellen, Ergebnisse der Messkampagne 2012.
- Baumann P, Langhans SD, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Synthese der Beurteilungen auf Stufe F (flächendeckend). Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 47.
- Bengtson Nash SM, Goddard J, Muller JF, 2006. Phytotoxicity of surface waters of the Thames and Brisbane River estuaries: a combined chemical analysis and bioassay approach for the comparison of two systems. *Biosensors & bioelectronics* 21:2086-2093.
- Bengtson Nash SM, Quayle PA, Schreiber U, Muller JF, 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquatic toxicology* 72:315-326.
- Blumberg R, 1988. Liquid-liquid extraction. London: Academic Press.
- Bundi U, Langhans S, Weber C, 2008. The Swiss Modular Stepwise Procedure (Das Modul-Stufen-Konzept). Eawag Special Seminar.
- Durand A, Rotteveel S, Collombon M, van der Grinten E, Maas J, Verweij W, 2009. Toxicity measurements in concentrated water samples. Evaluation and validation. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Ecotox Centre, 2015. Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays. p. 20.
- 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 BI, Bramaz N, Maurer M, Richter M, Sutter D, von Kanel C, Zschokke M, 2005. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 24:750-758.
- 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 : JEM* 10:612-621.
- Escher BI, Bramaz N, Ort C, 2009. JEM spotlight: Monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. *Journal of environmental monitoring : JEM* 11:1836-1846.
- 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 : JEM* 10:622-631.
- Escher BI, Neale PA, Leusch FDL, 2015. Effect-based trigger values for *in vitro* bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water Res* 81:137-148.
- 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.
- Hall S, Bradley T, Moore JT, Kuykindall T, Minella L, 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. *Nanotoxicology* 3:91-97.
- 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.



- International Organization for Standardization, 1992. Water quality -- Sampling -- Part 10: Guidance on sampling of waste waters. ISO 5667-10:1992
- International Organization for Standardization, 1998. Water quality -- Sampling -- Part 16: Guidance on biotesting of samples. ISO 5667-16:1998
- 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, 2012. Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2012.
- Junghans M, Kunz P, Werner I, 2013. Toxizität von Mischungen - Aktuelle praxisorientierte Ansätze für die Beurteilung von Gewässerproben. Aqua & Gas 5.
- Kase R, Eggen RIL, Junghans M, Götz C, Hollender J, 2011. Assessment of micropollutants from municipal wastewater - Combination of exposure and ecotoxicological effect data for Switzerland. In: Einschlag FSG, editor. Waste Water - Evaluation and Management: InTech - Open Access Publisher.
- 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, Gauch R, Vermeirssen E, Werner I, 2015. Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
- 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.
- Kienle C, Kunz PY, 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.
- Kühn R, Pattard M, 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. Water Res 24:31-38.
- 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.
- Langhans SD, Reichert P, Schuwirth N, 2014. The method matters: A guide for indicator aggregation in ecological assessments. Ecological Indicators 45:494-507.
- Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van der Burg B, 2002. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. Environmental science & technology 36:4410-4415.
- Leusch FD, 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 & technology 44:3853-3860.
- Leusch FDL, 2008. Tools to detect estrogenic activity in environmental waters. Global Water Research Coalition. p. 86.
- 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. Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr 26: Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern.
- Liška I, 2000. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - Historical development and overview. Journal of Chromatography A 885:3-16.
- Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Chue KL, Keller J, Mueller JF, 2010. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. Water Res 44:477-492.



- Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, Abegglen C, Thonney D, Chevre N, Scharer M, Barry DA, 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? *Sci Total Environ* 461-462:480-498.
- Murk AJ, Legler J, van Lipzig MM, Meerman JH, Belfroid AC, Spenkelink A, van der Burg B, Rijs GB, Vethaak D, 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 21:16-23.
- OECD, 2006. OECD Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- Ralph PJ, Smith RA, Macinnis-Ng CMO, Seery CR, 2007. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicological & Environmental Chemistry* 89:589-607.
- Reichert P, Schuwirth N, Langhans S, 2013. Constructing, evaluating and visualizing value and utility functions for decision support. *Environ Modell Softw* 46:283-291.
- Reungoat J, Macova M, Escher BI, Carswell S, Mueller JF, Keller J, 2010. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Res* 44:625-637.
- 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 / SETAC* 15:241-248.
- Schindler Wildhaber Y, Mestankova H, Schärer M, Schirmer K, Salhi E, von Gunten U, 2015. Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone. *Water Res* 75:324-335.
- Schlösser JA, Haertel-Borer S, Liechti P, Reichert P, 2013. Konzept für die Untersuchung und Beurteilung der Seen in der Schweiz. Anleitung zur Entwicklung und Anwendung von Beurteilungsmethoden. Bundesamt für Umwelt, Bern Umwelt-Wissen Nr 1326: 38 S.
- Schreiber U, Quayle P, Schmidt S, Escher BI, Mueller JF, 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosensors & bioelectronics* 22:2554-2563.
- 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.
- Stalter D, Magdeburg A, Wagner M, Oehlmann J, 2011. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Res* 45:1015-1024.
- Struijs J, van de Kamp R, Zwart Dd, Ritsema R, 2000. Toxic pressure in surface water, a pilot on new monitoring techniques. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Struijs J, van der Grinten E, Aldenberg T, 2010. Toxic pressure in the Dutch delta measured with bioassays : Trends over the years 2000 - 2009. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Uehlinger U, Robinson CT, 2006. Auswirkungen von Massnahmen in der ARA Hofen auf die Steinach unterhalb der heutigen Einleitung. Dübendorf: Eawag.
- US EPA. Revised Manual of Standard Operating Procedures for Environmental Monitoring against the Cockburn Sound Environmental Quality Criteria (2003 - 2004). A supporting document to the State Environmental (Cockburn Sound) Policy. 2005.
- van der Grinten E, Pikkemaat MG, van den Brandhof EJ, Stroomberg GJ, Kraak MH, 2010. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80:1-6.
- 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 & technology* 42:5814-5820.
- Vermeirssen EL, Hollender J, Bramaz N, van der Voet J, Escher BI, 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21



- treated sewage effluents. Environmental toxicology and chemistry / SETAC 29:2575-2582.
- 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 / SETAC 24:2226-2233.
- Wittmer I, Junghans M, Singer H, Stamm C, 2014. Mikroverunreinigungen – Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus diffusen Einträgen. Studie im Auftrag des BAFU. Eawag, Dübendorf.
- Wittmer IK, Bader HP, Scheidegger R, Singer H, Luck A, Hanke I, Carlsson C, Stamm C, 2010. Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. Water Res 44:2850-2862.
- Wittwer A, Gubser C, 2010. Umsetzung des Verbots von Pflanzenschutzmitteln. Untersuchung zum Stand der Umsetzung des Anwendungsverbots von Unkrautvertilgungsmitteln auf und an Strassen, Wegen und Plätzen. Umwelt-Wissen: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 54.
- Yang LH, Ying GG, Su HC, Stauber JL, Adams MS, Binet MT, 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Environmental toxicology and chemistry / SETAC 27:1201-1208.



7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick über wichtige Wirkungen, die mit Biotests erfasst werden können.	1
Abb. 2: Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept für die Belastung von abwasserbelasteten Oberflächengewässern mit östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen (Grafik: Eawag).....	3
Abb. 3: Überblick über das Vorgehen zur Probenahme und Probenaufbereitung.....	4
Abb. 4: Kombiniertes Algentest: Testplatte zur Messung der Quantenausbeute der Photosynthese.....	10
Abb. 5: Yeast Estrogen Screen (YES): Testplatte zur Messung der östrogenen Aktivität.....	14
Abb. 6: Ableitung von Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) durch den Vergleich der Effektkonzentration einer Umweltprobe mit jenen der Referenzsubstanz Diuron.	36
Abb. 7: Ableitung von 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) durch den Vergleich der Effektkonzentration einer Umweltprobe mit jenen der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol.....	45
Abb. 8: Ergebnisse des Yeast Estrogen Screen in Kläranlagenabläufen. Der Median über alle Messungen ist 0.73 ng EEQ/L, der 10-fache Beurteilungswert 4 ng/L.	51
Abb. 9: Im Yeast Estrogen Screen gemessene EEQ in Kläranlagenabläufen extrapoliert über den Verdünnungsfaktor auf die angrenzenden Fließgewässer. Eine potentielle Vorbelastung der Fließgewässer wurde dabei nicht berücksichtigt. Für Seen wurden keine EEQ extrapoliert.	52
Abb. 10: Beurteilung der 44 untersuchten Kläranlagen bzw. Fließgewässer anhand des vorgeschlagenen 5-stufigen Beurteilungskonzeptes.....	53
Abb. 11: Ergebnisse des Yeast Estrogen Screen in Kläranlagenabläufen (ARA) und Fließgewässern.....	55
Abb. 12: Ergebnisse des kombinierten Algentests in Kläranlagenabläufen (ARA) und Fließgewässern.....	55
Abb. 13: Beurteilung der Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen in den 12 in EcolImpact untersuchten Fließgewässern anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept.	56
Abb. 14: Beurteilung der Belastung mit Photosystem II-hemmenden Stoffen in den 12 in EcolImpact untersuchten Fließgewässern anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept.....	57
Abb. 15: Vorschlag für eine Zielhierarchie mit zugehörigen Attributen: Das Oberziel sind „keine ökotoxikologischen Effekte“. Die Unterziele sind „keine Östrogenität“ und „keine Photosystem II-Hemmung“. Gemessen werden diese beiden Ziele anhand der Attribute 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ, ng/L) und Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ, ng/L).	58
Abb. 16: Übersetzung der Zustandsklassen in eine kontinuierliche Funktion am Beispiel der Östrogenität.....	59
Abb. 17: Additiv-Minimum-Aggregation der Bewertung der Östrogenität und der Photosystem II-hemmenden Wirkung.	60
Abb. 18: Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Östrogenität in EEQ (ng/L) für ein Beispiel A mit Mittelwert 6 ng/L und Standardabweichung 0.5 ng/L (dunkelgrau) und für ein Beispiel B mit Mittelwert 1 ng/L und Standardabweichung 0.1 ng/L (hellgrau).....	61
Abb. 19: Grafische Darstellung der Resultate mit Unsicherheit für eine Probe mit 1 ± 0.1 ng EEQ/L und 6 ± 0.5 ng/L DEQ unter Verwendung des kontinuierlichen Bewertungsverfahrens mit Median (schwarze Linie) und 90% Vertrauensintervall (eingefärbte Fläche), hypothetisches Beispiel.....	61



7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über den kombinierten Algentest und den Yeast Estrogen Screen.....	9
Tab. 2: Überblick über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im kombinierten Algentest. ..	12
Tab. 3: Zusammenfassung der Daten zur Validierung des kombinierten Algentests.	13
Tab. 4: Überblick über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Yeast Estrogen Screen. ...	15
Tab. 5: Zusammenfassung der Daten zur Validierung des Yeast Estrogen Screen.	16
Tab. 6: Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe aus kommunalem Abwasser basierend auf drei Zustandsklassen (angepasst nach Götz et al. (2011) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).	18
Tab. 7: Vorschlag für eine Einteilung in drei Zustandsklassen anhand der gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).....	18
Tab. 8: Vorschlag für eine Einteilung in drei Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für Diuron (70 ng/L).....	19
Tab. 9: Vorschlag für eine Evaluation der Wasserqualität für östrogen-aktive und PSII-hemmende Stoffe aus kommunalem Abwasser basierend auf fünf Zustandsklassen (angepasst nach Götz et al. (2011) und dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).	19
Tab. 10: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L).....	20
Tab. 11: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ)-Werte (ng/L). Als Qualitätskriterium dient das chronische Umweltqualitätskriterium für Diuron (70 ng/L).....	20
Tab. 12: Festphasenextraktion für Biotests (nach Escher et al., 2008b): Überblick über die Arbeitsschritte der für die biologische Analytik von östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen verwendeten Probenaufbereitungsmethode.....	30
Tab. 13: Nominale Konzentrationen von Photosystem II-hemmenden Stoffen in den nachgebildeten Wasserproben.....	33
Tab. 14: Phase I - Liste der untersuchten nachgebildeten Proben.....	34
Tab. 15: Phase II - Liste der untersuchten realen Umweltproben mit und ohne Aufstockung....	35
Tab. 16: Diuron-Äquivalenzfaktoren (DEF) Photosystem II-hemmender Substanzen und die daraus berechneten Soll-DEQ-Konzentrationen (ng/L) der untersuchten Proben im kombinierten Algentest.....	36
Tab. 17:Wiederfindung von Diuron in nachgebildeten und ethanolischen Proben im kombinierten Algentest.....	37
Tab. 18: Variabilität im kombinierten Algentest: Je 4- bzw. 5-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte innerhalb und zwischen verschiedenen Tagen.	38
Tab. 19: Reproduzierbarkeit und Variabilität von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest: 4-malige SPE jeder Probe und Messung im kombinierten Algentest (Abwasser (ARA) je 10x)....	38
Tab. 20: Abschätzung der SPE-basierten Variabilität (= Gesamtvariabilität – Biotest-Variabilität).	39
Tab. 21: Standardaddition von Diuron zu realen Umweltproben und nachfolgende Messung im kombinierten Algentest.....	39
Tab. 22: Konzentrationen östrogen-aktiver Stoffe in den nachgebildeten Wasserproben.	42
Tab. 23: Phase I - Liste der untersuchten nachgebildeten Proben.....	43
Tab. 24: Phase II - Liste der untersuchten nachgebildeten und realen Umweltproben mit Aufstockung.....	44
Tab. 25: 17 β -Estradiol (E2)-Äquivalenzfaktoren (EEF) östrogen-aktiver Substanzen und die daraus berechneten Soll-EEQ-Konzentrationen (ng/L) der untersuchten Proben im Yeast Estrogen Screen.....	45



Tab. 26: Wiederfindung von 17 β -Estradiol (E2) in nachgebildeten und ethanolischen Proben im YES.	46
Tab. 27: Variabilität und Reproduzierbarkeit im Yeast Estrogen Screen (YES): Je 5-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte innerhalb und zwischen verschiedenen Tagen.....	47
Tab. 28: Reproduzierbarkeit und Variabilität von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest. 5-malige SPE jeder Probe und Messung im Yeast Estrogen Screen (YES) (Abwasser (ARA) je 10x).....	47
Tab. 29: Abschätzung der SPE-basierten Variabilität (= Gesamtvariabilität - Biotest-Variabilität).	48
Tab. 30: Standardaddition von 17 β -Estradiol (E2) zu realen Umweltproben und nachfolgende Messung im YES.	48



Anhang 1 *Standard Operating Procedures (SOPs)* für Probenahme und Probenaufbereitung

Probenahme

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.

Flaschen für Probenahme

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

Vorbehandlung der Probenflaschen

- 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.
- Eine Flasche mit Reinstwasser sollte als „Field Blank“ bei der Probenahme mitgeführt und genauso wie die Proben behandelt werden, um sicher zu gehen, dass die Flaschen und ihre Reinigung keine Effekte im Biotest bewirken.

Probenahme und Lagerung

- Um das Zerschneiden der Glasgefäße beim Einfrieren zu verhindern, füllen Sie sie bitte nur bis zur Hälfte (z.B. 1L Probeflüssigkeit 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 bei 0-5°C aufbewahrt werden.

Transport

- Transportieren Sie die Proben gekühlt (mit Eis / Kühlelementen oder auf 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.



Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion

Eine detaillierte Anleitung für die Aufkonzentrierung von Umweltproben mittels Festphasenextraktion findet sich in der folgenden SOP:

Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays.

Tab. 12 gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte.

Tab. 12: Festphasenextraktion für Biotests (nach Escher et al., 2008b): Überblick über die Arbeitsschritte der für die biologische Analytik von östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen verwendeten Probenaufbereitungsmethode.

Allgemeine Informationen	
Probentyp	Wasserproben
Probenvolumina	500 ml ARA-Ablauf
Leerprobe/Blank	500 ml Reinstwasser
Probenvorbereitung	
Filtration	Ja, z.B. mit Glasfaserfiltern Typ APFD 09050 (1 µm) (Merck Millipore)
Ansäuerung	Ja, mit HCl auf pH 3
Addierung von Isotopenmarkierter interner Mischstandardlösung (IS)	Nein (Standardadditionen zur Kontrolle der Wiederfindung in der SPE möglich)
Probenaufbereitung	
Anreicherung	Festphasenextraktion (SPE)
SPE Kartuschen	LiChrolut EN RP-18 (100 mg LiChrolut EN unten, 200 mg LiChrolut RP 18 oben) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Konditionierung	2 ml Hexan 2 ml Aceton 6 ml Methanol 6 ml Wasser (pH 3.0)
Waschen	Nein, nur Auffüllen der Kartusche mit Wasser (pH 3.0)
Elution	4 ml Aceton 1 ml Methanol
Einengen	mit N ₂ auf ca. 500 µl einengen, dann auf 1000 µl mit Ethanol auffüllen
Aufkonzentrierungsfaktor	500-fach ARA-Ablauf
Lagerung	Dunkel, bei -20°C



Anhang 2 Informationen zu SOPs für die Biotests

Um sicherzugehen, dass jeweils die aktuellste Version der SOPs für die Biotests verwendet wird, beinhaltet dieses Dokument keine SOPs für Biotests. Die laufend aktualisierten SOPs können auf Anfrage beim Ökotoxzentrum bezogen werden (Kontakt: info@oekotoxzentrum.ch).

Kombinierter Algentest

Eine detaillierte Anleitung für den kombinierten Algentest findet sich in:

Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Combined Algae Assay.

Yeast Estrogen Screen

Die Durchführung des Hefezellöstrogentests ist in folgendem Dokument genau beschrieben:

Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Yeast Estrogen Screen.



Anhang 3 Validierung des Kombinierten Algentests

Bestimmung der Variabilität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung von Photosystem II-hemmenden Wirkungen in Festphasenextraktion und im kombinierten Algentest

Einleitung

Ausgangslage und Problematik

Um Biotests in ein Beurteilungssystem für Wasserqualität aufnehmen zu können, muss es möglich sein mit Hilfe der in den Biotests ermittelten bioanalytischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) Güteklassen zu bestimmen. Nur wenn die Variabilität und Reproduzierbarkeit der Tests bekannt sind, kann eine robuste Beurteilung durchgeführt werden. Im Rahmen dieses Projektes wurden die genannten Parameter daher für den kombinierten Algentest ermittelt.

Das Projekt war in zwei Phasen aufgeteilt. In einer ersten Phase wurden Reproduzierbarkeit, Variabilität und Festphasenanreicherung (SPE) zunächst anhand von nachgebildeten Wasserproben und den entsprechenden Kontrollproben im kombinierten Algentest untersucht. In einer zweiten Phase wurde eine ARA-Ablauf-Probe untersucht, mit dem Ziel zu überprüfen, in wie weit sich die Ergebnisse der ersten Phase auf reale Umweltproben übertragen lassen. Im Folgenden werden die Resultate zusammengefasst.

Zielsetzung dieser Studie

Die folgenden Aspekte der Methodvalidierung wurden in dieser Studie für den kombinierten Algentest untersucht:

Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Für den kombinierten Algentest wurden Nachweisgrenze (Mittelwert der Kontrolle + 3x Standardabweichung der Kontrolle) und Bestimmungsgrenze (BG = Mittelwert der Kontrolle + 10x Standardabweichung der Kontrolle) bestimmt.

Wiederfindung

Durch Addition einer definierten Konzentration der Standardsubstanz Diuron, oder Mischungen von Photosystem II-Hemmstoffen, zu Reinstwasser und nachfolgender Extraktion sollte deren Wiederfindung im kombinierten Algentest bestimmt werden. Als Kontrollen wurden ethanolische Standards verwendet. Hierbei sollte insbesondere ermittelt werden, ob der Biotest hohe ebenso wie tiefe Konzentrationen an Diuron bzw. Photosystem II-Hemmstoffen nachweisen kann.

Variabilität und Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in der SPE und im Biotest zu überprüfen, wurden stark und schwach belastete ethanolische Proben und nachgebildete Wasserproben, die mittels SPE extrahiert wurden, im kombinierten Algentest untersucht. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich bei 4- bzw. 5-maliger Testung einer Probe am gleichen und an unterschiedlichen Tagen Unterschiede in den ermittelten DEQ-Werten feststellen (intra- und inter-day Variabilität des Biotests)?
- Lassen sich bei 4-maliger Extraktion derselben Probe und anschließender Messung im kombinierten Algentest Unterschiede in den ermittelten DEQ-Werten feststellen (Gesamtvariabilität)?



Übertragbarkeit auf reale Umweltprobe

Um zu prüfen, in wie weit sich die Resultate zu Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit aus nachgebildeten Proben auf reale Umweltproben übertragen lassen, wurde eine ARA-Ablaufprobe untersucht.

Eignung der Standardaddition (Aufstockung)

Zur Untersuchung ob eine Aufstockung von Umweltproben mit Diuron (vor der Extraktion), wie dies bei chemisch-analytischen Messungen üblich ist, auch bei Biotests zur Qualitätssicherung geeignet ist, wurden Reinstwasser und reale Umweltproben mit verschiedenen Diuron-Konzentrationen aufgestockt und im Biotest untersucht.

Material und Methoden

Probenherstellung

Nachgebildete Proben

Zur Herstellung der nachgebildeten Wasserproben wurde Reinstwasser mit ethanolischen Stammlösungen versetzt, um umweltrelevante Konzentrationen Photosystem II-hemmender Stoffe zu erhalten. Folgende nachgebildete Wasserproben wurden hergestellt (Tab. 13):

Tab. 13: Nominale Konzentrationen von Photosystem II-hemmenden Stoffen in den nachgebildeten Wasserproben.

Probenbezeichnung	Stoff	Nachgebildete Probe (ng/L)
Diuron _{tief}	Diuron	50
Diuron _{hoch}	Diuron	500
MIX _{tief}	Diuron	15
	Isoproturon	30
	Terbuthylazin	60
	Terbutryn	7.5
MIX _{hoch}	Diuron	150
	Isoproturon	300
	Terbuthylazin	600
	Terbutryn	75

Die Probe Diuron_{hoch} soll Diuron-Konzentrationen in einem ARA-Ablauf repräsentieren und Diuron_{tief} diejenigen in abwasserbelasteten Oberflächengewässern. Die nachgebildeten Gemischproben (MIX) setzen sich aus umweltrelevanten Konzentrationen der Photosystem II-hemmenden Herbizide Diuron, Isoproturon, Terbuthylazin und Terbutryn zusammen. Die hoch belastete Probe (MIX_{hoch}) entspricht hierbei erwarteten Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) im ARA-Ablauf, wohingegen die tief belastete Probe DEQs in Oberflächengewässern widerspiegelt. Mit Hilfe dieser Proben sollen Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit in Festphasenextraktion und Biotests in stark wie auch schwach belasteten Proben ermittelt werden. Als Kontrollen wurden ethanolische Lösungen hergestellt (nachgebildete Extrakte), die mit den gleichen Konzentrationen Photosystem II-hemmender Stoffe versetzt wurden, wie sie in den Extrakten der nachgebildeten Proben zu erwarten sind. In Tab. 14 findet sich eine detaillierte Aufstellung und Beschreibung aller untersuchten Proben.



Tab. 14: Phase I - Liste der untersuchten nachgebildeten Proben

Probenbezeichnung	Beschreibung	Probenaufarbeitung und Untersuchung
Wiederfindung von Diuron in nachgebildeten Proben		
Blank	SPE von Reinstwasser (<i>Procedural Blank</i>)	SPE, Biotest
Diuron _{tief}	Ethanol versetzt mit 50 ng/L Diuron	Biotest
Diuron _{hoch}	Ethanol versetzt mit 500 bzw. 1000 ng/L Diuron	Biotest
Diuron _{tief} (SPE)	SPE von Reinstwasser mit 50 ng/L Diuron versetzt	SPE, Biotest
Diuron _{hoch} (SPE)	SPE von Reinstwasser mit 500 ng/L Diuron versetzt	SPE, Biotest
Diuron _{tief} nach SPE	SPE von Reinstwasser: Nachträgliche Zugabe von 50 ng/L Diuron	SPE, Diuron-Zugabe, Biotest
Diuron _{hoch} nach SPE	SPE von Reinstwasser: Nachträgliche Zugabe von 500 ng/L Diuron	SPE, Diuron -Zugabe, Biotest
Variabilität im Biotest: 4-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte an einem Tag (intra-day Variabilität) und an 5 verschiedenen Tagen (inter-day Variabilität)		
Diuron _{tief}	Ethanol versetzt mit 50 ng/L Diuron	4 bzw. 5 x Biotest
Diuron _{hoch}	Ethanol versetzt mit 500 ng/L Diuron	4 bzw. 5 x Biotest
MIX _{tief}	Ethanol versetzt mit einem Gemisch aus Diuron, Isoproturon, Terbutylazin und Terbutryn entsprechend 50 ng/L DEQ (MIX _{tief})	4 bzw. 5 x Biotest
MIX _{hoch}	bzw. 500 ng/L DEQ (MIX _{hoch})	4 bzw. 5 x Biotest
Gesamtvariabilität der Methode: 4-malige Extraktion (SPE) jeder nachgebildeten Probe gefolgt von Biotest		
Blank 1-4 (SPE)	SPE von Reinstwasser (<i>Procedural Blank</i>)	4 x SPE, 4 x Biotest
Diuron _{tief} 1-4 (SPE)	SPE von Reinstwasser mit 50 ng/L Diuron versetzt	4 x SPE, 4 x Biotest
Diuron _{hoch} 1-4 (SPE)	SPE von Reinstwasser mit 500 ng/L Diuron versetzt	4 x SPE, 4 x Biotest
MIX _{tief} 1-4 (SPE)	SPE von Reinstwasser mit umweltrelevanten Konzentrationen von Diuron, Isoproturon, Terbutylazin und Terbutryn versetzt	4 x SPE, 4 x Biotest
MIX _{hoch} 1-4 (SPE)	entsprechend 50 ng/L DEQ (MIX _{tief}) bzw. 500 ng/L DEQ (MIX _{hoch})	4 x SPE, 4 x Biotest

Nachgebildete und reale Umweltproben mit Aufstockung

Um zu prüfen ob die Resultate zu Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit auf eine reale Umweltprobe übertragbar sind, wurde eine ARA-Ablauf-Probe wiederholt extrahiert und im kombinierten Algentest untersucht. Dieses gereinigte Abwasser weist üblicherweise DEQ-Werte um 500 ng/L auf.

Zur Herstellung der aufgestockten Proben für die Untersuchungen zur Eignung der Standardaddition wurden die realen Umweltproben zusätzlich mit 100, 500 und 1000 ng/L Diuron versetzt. Als Kontrolle wurde Reinstwasser mit den gleichen Diuron-Konzentrationen versetzt, wie sie den realen Umweltproben zugesetzt wurden. In Tab. 15 findet sich eine detaillierte Aufstellung und Beschreibung der untersuchten Proben.



Tab. 15: Phase II - Liste der untersuchten realen Umweltproben mit und ohne Aufstockung

ARA = Abwasserreinigungsanlage, SPE = Festphasenextraktion

Probenbezeichnung Proben-Name	Beschreibung	Probenaufarbeitung und Untersuchung
Übertragbarkeit auf reale Umweltprobe zur Untersuchung der Gesamtvariabilität der Methode: Wiederholte Extraktion (SPE) der ARA-Ablauf-Probe mit anschliessendem Biotest		
Blank 1-4 (SPE)	SPE von Reinstwasser	4 x SPE, 4 x Biotest
ARA 1-10	SPE von ARA-Ablauf-Probe	10 x SPE, 10 x Biotest
Aufstockung von realen Umweltproben (Standardaddition mit Diuron)		
Diuron _{tief} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser mit 100 ng/L Diuron versetzt	3 x SPE, 3 x Biotest
Diuron _{mittel} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser mit 500 ng/L Diuron versetzt	3 x SPE, 3 x Biotest
Diuron _{hoch} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser mit 1000 ng/L Diuron versetzt	3 x SPE, 3 x Biotest
ARA + Diuron _{tief} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe mit 100 ng/L Diuron versetzt	5 x SPE, 5 x Biotest
ARA + Diuron _{mittel} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe mit 500 ng/L Diuron versetzt	5 x SPE, 5 x Biotest
ARA + Diuron _{hoch} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe mit 1000 ng/L Diuron versetzt	5 x SPE, 5 x Biotest

Probenextraktion

Der Konzentrationsfaktor der zu testenden Probenextrakte wurde bei allen Versuchen mit nachgebildeten Umweltproben so gewählt, dass im Biotest eine Nachweisgrenze von 6 ng/L erreicht werden kann. Dies übertrifft die Anforderungen an die chemische Analytik im Rahmen der EU-Wasserrahmen-Richtlinie. Hier ist eine „Nachweisgrenze $\leq 0.3 \cdot \text{AA-EQS}$ “ vorgeschrieben. Für Diuron bzw. DEQs entspricht dies „ $0.3 \cdot 70 \text{ ng/L Diuron AA-EQS}$ “, also 21 ng/L.

Zur Messung im kombinierten Algentest wurden die nachgebildeten Wasserproben und die realen Umweltproben mittels SPE angereichert und extrahiert. Hierfür wurde nach der Herstellung der Proben der pH-Wert mit HCl (1 M) auf pH 3 eingestellt und gemäss SOP (Ecotox Centre, 2015) mittels Lichrolut RP18/EN Kartuschen (Merck, Darmstadt, Deutschland) extrahiert: Zunächst wurden die Kartuschen mit 2 ml Hexan, 2 ml Aceton, 6 ml Methanol und 6 ml Reinstwasser (pH 3.0) konditioniert. Danach wurden je 1000 mL (Proben: Blank, Diuron_{tief} und MIX_{tief}) bzw. 500 mL (alle anderen Proben) über die Kartuschen extrahiert. Als Blank dienten 1000 mL Reinstwasser. Für die Elution der Proben aus den Kartuschen wurden 4 x 1 mL Aceton und 1 mL Methanol verwendet. Die eluierten Lösungsmittel wurden mit Stickstoff auf 0.5 mL eingengt und anschliessend mittels einer 1 mL Hamilton-Spritze mit Ethanol auf 1 mL addiert. Die nun in 1 mL einer Lösungsmittelmischung (~50% Ethanol, ~50% Aceton und Methanol) vorliegenden 1000-fach (Blank, Diuron_{tief} und MIX_{tief}) bzw. 500-fach aufkonzentrierten Proben (alle anderen Proben) wurden bei -20°C bis zur Analyse in den Biotests gelagert. Zur Untersuchung der Variabilität der Extraktion selbst wurde oben beschriebene Extraktionsmethode mit jeder Probe 5 Mal durchgeführt.



Durchführung des Biotests

Methodenbeschreibung

Eine detaillierte Methodenbeschreibung für den kombinierten Algentest findet sich in Margot et al. (2013). Bei allen Untersuchungen im kombinierten Algentest wurden eine Dosis-Wirkungskurve der Referenzsubstanz Diuron (entsprechend der Konzentration der Diuron_{hoch}-Probe) und eine Lösungsmittelkontrolle (je 8 technische Replikate) zur Qualitätskontrolle miteinbezogen.

Bei den ethanolischen und nachgebildeten MIX-Proben wurden der erwartete DEQ einer Probe mit Hilfe der testspezifischen Diuron-Äquivalenzfaktoren (DEF) berechnet (Tab. 16), um basierend auf diesem Wert die Wiederfindung für die Biotests selbst sowie für die gesamte Methode zu ermitteln.

Tab. 16: Diuron-Äquivalenzfaktoren (DEF) Photosystem II-hemmender Substanzen und die daraus berechneten Soll-DEQ-Konzentrationen (ng/L) der untersuchten Proben im kombinierten Algentest.

Stoff / Probenbezeichnung	DEF	Soll-DEQ (ng/L)
Diuron	1	
Isoproturon	0.178	
Terbutryn	1.14	
Terbuthylazin	0.354	
MIX _{tief}		49
MIX _{hoch}		491

Datenanalyse

Standardkurven wurden mittels nichtlinearer Regression (4-Parameter Hill Funktion, GraphPad Prism®) gefittet, um die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), die Nachweisgrenze ($\text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} + 3 \cdot \text{Standardabweichung}_{\text{Kontrolle}}$) und die Bestimmungsgrenze ($BG = \text{Mittelwert}_{\text{Kontrolle}} + 10 \cdot \text{Standardabweichung}_{\text{Kontrolle}}$) zu bestimmen. Für Proben mit quantifizierbaren Effekten im kombinierten Algentest (Messwert > Nachweisgrenze) wurden Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) berechnet. Die DEQ ist definiert als jene Konzentration von Diuron, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe (siehe Abb. 6).

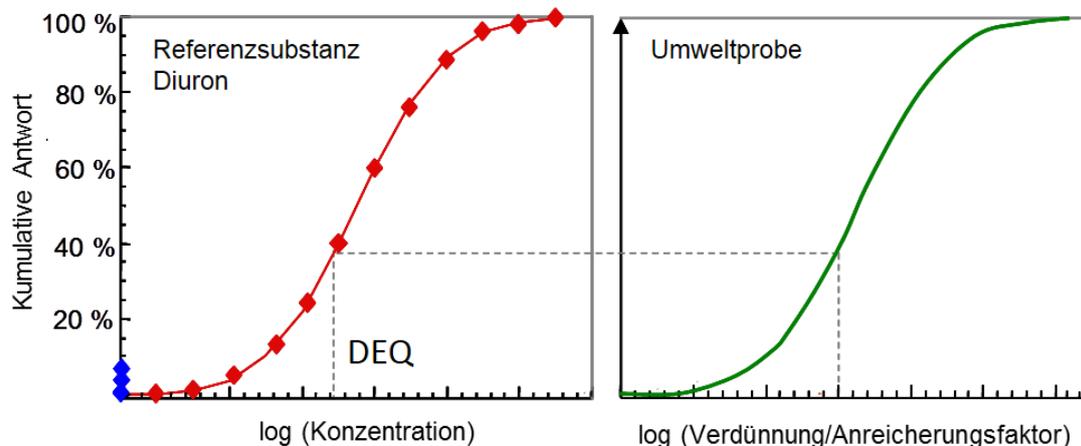


Abb. 6: Ableitung von Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) durch den Vergleich der Effektkonzentration einer Umweltprobe mit jenen der Referenzsubstanz Diuron.



Die ermittelten Werte werden unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnung in ng/L DEQ umgerechnet. Im kombinierten Algentest wurden die Messwerte der Proben quantifiziert, wenn sie über der Nachweisgrenze lagen.

Ergebnisse und Diskussion

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Der kombinierte Algentest kann durch Festphasenextraktion eine Nachweisgrenze von 1-2 ng/L Diuron bzw. DEQ erreichen, die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 3-6 ng/L Diuron/DEQ. Ohne Aufkonzentrierung lag die mittlere Nachweisgrenze im kombinierten Algentest bei 185 ± 85 ng/L Diuron / DEQ ($n = 91$ Tests im Jahr 2014 am Oekotoxzentrum). Die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 632 ± 277 ng/L Diuron / DEQ. Die Effektkonzentrationen (EC_{50}) der Referenzsubstanz Diuron lagen im Mittel bei 1.86×10^{-8} M Diuron (95% Konfidenzintervall = 1.74×10^{-8} bis 2.02×10^{-8} M).

Wiederfindung

Die Bestimmung und Wiederfindung von nominal 50 und 500 bzw. 1000 ng/L Diuron in nachgebildeten Wasserproben wie auch Kontrollproben lag zwischen 76 und 102% (bezogen auf durch chemische Analytik gemessene Konzentrationen) (Tab. 17). Wurde das Diuron nach SPE zugegeben betrug die Wiederfindung 61 und 90%.

Tab. 17: Wiederfindung von Diuron in nachgebildeten und ethanolischen Proben im kombinierten Algentest.

Werte sind als Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) (ng/L) angegeben. MW = Mittelwert (Triplikat-Bestimmung), SD = Standardabweichung, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-DEQ (ng/L)	Chem-DEQ gemessen mit chemischer Analytik (ng/L)	Bio-DEQ im kombinierten Algentest (ng/L)		Wiederfindung (bezogen auf Chem-DEQ)
			MW	SD	
Blank	0		nd		
Diuron _{tief}	50	50	41	2	81%
Diuron _{tief} (SPE)	50	47	36	3	75%
Diuron _{tief} nach SPE	50	4*	2.5	0.6	61%
Diuron _{hoch}	1000	960	980	51	102%
Diuron _{hoch} (SPE)	500	440	361	61	82%
Diuron _{hoch} nach SPE	500	348	312	6	90%

*wird nochmal wiederholt

Insgesamt war die Wiederfindung von (nominal) 50 und 500 bzw. 1000 ng/L Diuron gut.

Variabilität und Reproduzierbarkeit

Die Variabilität der im kombinierten Algentest ermittelten DEQ-Werte wurde für das wiederholte Messen derselben Proben innerhalb eines Tages (intra-day) und an verschiedenen Tagen (inter-day) ermittelt. Um ein Bild von der Variabilität der Biotest-Ergebnisse zu erhalten (ohne Variabilität der Festphasenextraktion) wurden ethanolische Proben untersucht (nachgebildete Extrakte), die mit den gleichen Konzentrationen Photosystem II-hemmender Stoffe versetzt wurden, wie sie in den Extrakten der nachgebildeten Proben zu erwarten sind.



Variabilität und Reproduzierbarkeit des Biotests

Wurden die Proben innerhalb eines Tages und zwischen verschiedenen Tagen in jeweils 4 bzw. 5 unabhängigen Tests gemessen, variierten die im kombinierten Algentest ermittelten DEQ-Werte um 0.1-5% (intra-day) und 5-12% (inter-day). Es wurden keine Unterschiede in der Variabilität zwischen verschiedenen Probentypen beobachtet. Die Diuron-Proben wiesen eine Wiederfindungsrate von 81 und 102% auf. In den beiden Gemischproben konnten jeweils 98% der erwarteten DEQs gemessen werden (Tab. 18).

Tab. 18: Variabilität im kombinierten Algentest: Je 4- bzw. 5-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte innerhalb und zwischen verschiedenen Tagen.

Werte sind als Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) (ng/L) angegeben. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Probenbezeichnung	Soll-DEQ (ng/L)	Chem-DEQ gemessen mit chemischer Analytik (ng/L)	Bio-DEQ im kombinierten Algentest (ng/L)		Variabilität	Wiederfindung (bezogen auf Chem-DEQ)
			MW	SD		
Diuron _{tief}	50	50	41	2	5%	81%
Diuron _{hoch}	1000	960	980	51	5%	102%
MIX _{tief}	50	50	49	5	11%	98%
MIX _{hoch}	500	517	508	30	6%	98%

Gesamtvariabilität und Reproduzierbarkeit von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest in nachgebildeten Proben und realen Umweltproben

Nachgebildete Proben wurden jeweils 4x mittels Festphasenextraktion extrahiert und aufkonzentriert. Danach wurde für jeden Extrakt im kombinierten Algentest die DEQ-Konzentration ermittelt. Bei der Bestimmung der DEQ-Werte mittels extrahierter Proben lag die Gesamtvariabilität für alle Proben im Bereich von 7 bis 17% (Tab. 19). Die extrahierte Abwasserprobe zeigte mit einer Gesamtvariabilität von 10% im kombinierten Algentest eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten für nachgebildete Proben.

Tab. 19: Reproduzierbarkeit und Variabilität von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest: 4-malige SPE jeder Probe und Messung im kombinierten Algentest (Abwasser (ARA) je 10x).

Werte sind als Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) (ng/L) angegeben. ARA = Abwasserreinigungsanlage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-DEQ (ng/L)	Chem-DEQ gemessen mit chemischer Analytik (ng/L)	Bio-DEQ im kombinierten Algentest (ng/L)		Variabilität	Wiederfindung (bezogen auf Chem-DEQ)
			MW	SD		
Blank (SPE) 1-4			nd		--	
Diuron _{tief} (SPE) 1-4	50	47	36	3	7%	75%
Diuron _{hoch} (SPE) 1-4	500	440	361	61	17%	82%
MIX _{tief} (SPE) 1-4	50	48	32	5	15%	66%
MIX _{hoch} (SPE) 1-4	500	524	513	53	10%	98%
Blank (SPE) 1-4	--		nd		--	--
ARA (SPE) 1-10	--		491	50	10%	--

Die Wiederfindung war in den schwach belasteten SPE-Proben etwas geringer als in den stark belasteten SPE-Proben.



Die Reproduzierbarkeit der SPE selbst kann anhand der Daten für die schwach und stark belasteten Proben grob abgeschätzt werden. Die von der SPE herrührenden Schwankungen der in den Biotests ermittelten DEQ-Werte (SPE-basierte Variabilität = Mittelwert Gesamtvariabilität - Mittelwert Biotest-Variabilität) liegen im Bereich von 3-12% (Tab. 20).

Tab. 20: Abschätzung der SPE-basierten Variabilität (= Gesamtvariabilität – Biotest-Variabilität).

Probenbezeichnung	Gesamt-Variabilität	Biotest-Variabilität	SPE-basierte Variabilität
Diuron _{tief}	7%	5%	3%
Diuron _{hoch}	17%	5%	12%
MIX _{tief}	15%	11%	4%
MIX _{hoch}	10%	6%	4%

Generell sollte die SPE-basierte Variabilität eher chemisch-analytisch ermittelt werden. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass sich die SPE-Verfahren zur Messung der Probe im Biotest und für die chemisch-analytische Messung teilweise unterscheiden können.

Eignung der Standardaddition (Aufstockung)

Wurde eine Reinstwasserprobe vor SPE mit unterschiedlichen Diuron-Konzentrationen aufgestockt, betrug die mit chemischer Analytik bestimmte Wiederfindung bei Zugabe von 100, 500 oder 1000 ng/L Diuron 45 bis 79% im kombinierten Algentest. In aufgestockten Abwasserproben lag die mit chemischer Analytik bestimmte Wiederfindung bei 99 bis 125%. Berechnet man die Wiederfindung im Abwasser anhand der DEQ-Werte, die im Biotest in den mit Diuron aufgestockten Reinstwasserproben gemessen wurden, liegt sie für den kombinierten Algentest zwischen 112 und 147% (Tab. 21).

Tab. 21: Standardaddition von Diuron zu realen Umweltproben und nachfolgende Messung im kombinierten Algentest.

Werte sind als Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQs) (ng/L) angegeben. ARA = Abwasserreinigungsanlage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-DEQ* (ng/L)	Chem-DEQ gemessen mit chemischer Analytik (ng/L)	Bio-DEQ im kombinierten Algentest (ng/L)		Wiederfindung**		Variabilität
			MW	SD	bezogen auf Chem-DEQ	gemessen	
Blank 1-4			nd				
Diuron _{tief} (SPE) 1-3	100	96	<u>44</u>	5	45%	--	10%
Diuron _{mittel} (SPE) 1-3	500	460	<u>365</u>	49	79%	--	13%
Diuron _{hoch} (SPE) 1-3	1000	952	<u>755</u>	111	79%	--	15%
ARA (SPE) 1-10	--	472	<u>491</u>	50	104%	--	10%
ARA + Diuron _{tief} (SPE) 1-5	600	559	600	52	107%	<u>112%</u>	9%
ARA + Diuron _{mittel} (SPE) 1-5	1000	1056	1041	67	99%	<u>122%</u>	6%
ARA + Diuron _{hoch} (SPE) 1-5	1500	1462	1832	46	125%	<u>147%</u>	2%

* Für die Berechnung der Soll-DEQ-Werte wurden die aktuell gemessenen DEQ Konzentrationen des Abwassers zu den nominalen, für die Aufstockung genutzten, Konzentrationen addiert.



** Für die Berechnung der Wiederfindung bezogen auf chemische Analytik wurden Chem-DEQ-Werte verwendet. Zum Vergleich wurde die Wiederfindung ebenfalls anhand der im Biotest gemessenen Konzentrationen der Positivkontrolle (Reinstwasser + 100, 500 oder 1000 ng/L Diuron) berechnet (Spalte Wiederfindung gemessen).

Insgesamt ist die Standardaddition von Diuron zu einer Umweltprobe als Qualitätskontrolle für Biotests schwieriger zu interpretieren als bei der chemischen Analytik, wo auch markierte (deuterierte) Standards verwendet werden können. So können mögliche Verluste der Photosystem II-hemmenden Wirkung nicht klar der Probe selbst oder dem addierten Standard zugewiesen werden. Es kann so auch nicht mit Sicherheit bestimmt werden, wie gross die Wiederfindung der Gesamtmethode ist (SPE und Biotest). Durch die Mitführung von Positivkontrollen (mit Diuron versetztes Reinstwasser) kann die Wiederfindung der Methode abgeschätzt werden. Auch muss beachtet werden, dass in Umweltproben stets eine Mischung aus verschiedenen Photosystem II-Hemmstoffen und anderen Substanzen vorhanden ist, die sich womöglich gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen können.

Zusammenfassung und Ausblick

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass die Ermittlung von Diuron-Äquivalenzkonzentrationen in aufkonzentrierten Proben im Algentest in Bezug auf Variabilität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung den Anforderungen an die chemische Analytik (Variabilität um 20-25%) entsprechen und für Abwasser und belastete Oberflächengewässer zur Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt werden können. Die Studie zur Methodvalidierung mittels nachgebildeter Proben und Umweltproben hat ergeben:

- Der Algentest kann durch Festphasenextraktion Nachweisgrenzen von < 6 ng/L Diuron erreichen und erfüllt so die Anforderungen der Wasserrahmenrichtlinie (Nachweisgrenze < 0.3*EQS). Dies ermöglicht die Messung von schwach belasteten Proben mit DEQ unter dem Diuron-AA-EQS von 70 ng/L.
- Die Wiederfindung von 50 und 500 bzw. 1000 ng/L Diuron bzw. DEQ in nachgebildeten Wasserproben ($Diuron_{tief}$, $Diuron_{hoch}$, MIX_{tief} , MIX_{hoch}) erwies sich als robust und lag zwischen 81 und 102%. Die Variabilität der in diesen Proben im Algentest gemessenen DEQ-Werte lag zwischen 5 und 11%.
- Die Festphasenextraktion mit anschliessendem kombiniertem Algentest resultierte bei den schwach ($Diuron_{tief}$ (SPE) und $Diuron_{hoch}$ (SPE)) und stark belasteten Proben ($Diuron_{hoch}$ (SPE) und MIX_{hoch} (SPE)) in einer Gesamtvariabilität der DEQ-Werte von 7 bis 17% und einer Wiederfindung von 66 bis 98%. Die Variabilität von stark und schwach belasteten Proben unterschied sich nicht deutlich.
- Eine grobe Abschätzung für die Reproduzierbarkeit der SPE (= Gesamtvariabilität – Biotest-Variabilität) führt bei den schwach und stark belasteten Proben zu einer SPE-basierten Variabilität der DEQ-Werte von ca. 3 bis 12%.
- Wurde eine ARA-Ablaufprobe mit verschiedenen Diuron-Konzentrationen aufgestockt, betrug die auf chemische Analytik bezogene Wiederfindung 99 bis 125%.



Anhang 4 Validierung des Yeast Estrogen Screen

Bestimmung der Variabilität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung östrogener Aktivität in Festphasenextraktion und Biotest (Yeast Estrogen Screen)

Einleitung

Ausgangslage und Problematik

Um Biotests in ein Beurteilungssystem für Wasserqualität aufnehmen zu können, muss es möglich sein mit Hilfe der in den Biotests ermittelten bioanalytischen Äquivalenzkonzentrationen (hier: 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ)) Güteklassen zu bestimmen. Eine robuste Beurteilung ist nur möglich, wenn die Variabilität und Reproduzierbarkeit der Tests bekannt sind. Diese Parameter wurden im Rahmen dieses Projektes für den Yeast Estrogen Screen (YES) ermittelt.

Das Projekt gliedert sich in zwei Phasen. Die erste Phase hatte zum Ziel, im YES anhand von nachgebildeten Wasserproben und den entsprechenden Kontrollproben Reproduzierbarkeit, Variabilität und Festphasenanreicherung (SPE) zu untersuchen. Aufbauend auf diese Resultate wurde in der zweiten Phase eine ARA-Ablauf-Probe untersucht, um zu prüfen, in wie weit die Resultate der ersten Phase sich auf reale Umweltproben übertragen lassen. Im Folgenden werden die Resultate zusammengefasst.

Zielsetzung dieser Studie

Diese Studie untersuchte folgende Aspekte der Methodvalidierung für den YES:

Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Für den YES wurden Nachweisgrenze (Mittelwert der Kontrolle + 3x Standardabweichung der Kontrolle) und Bestimmungsgrenze (BG = Mittelwert der Kontrolle + 10x Standardabweichung der Kontrolle) bestimmt.

Wiederfindung

Mit Hilfe der Addition einer definierten Konzentration der Standardsubstanz 17 β -Estradiol (E2) oder Mischungen von Östrogenen zu Reinstwasser und nachfolgender Festphasenextraktion (SPE) sollte deren Wiederfindung im YES bestimmt werden. Als Kontrollen wurden ethanolische Standards verwendet. Insbesondere sollte ermittelt werden, ob der Biotest fähig ist, hohe wie auch tiefe E2-Konzentrationen (beispielsweise in Oberflächengewässern) nachzuweisen.

Variabilität und Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Resultate in SPE und Biotest wurden tief und hoch belastete ethanolische Proben und nachgebildete Wasserproben, die mittels SPE extrahiert wurden, im YES untersucht. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich bei 5-maliger Testung einer Probe am gleichen und an unterschiedlichen Tagen Unterschiede in den ermittelten EEQ-Werten feststellen (intra- und inter-day Variabilität des Biotests)?
- Lassen sich bei 5-maliger Extraktion derselben Probe und anschließender Messung im YES Unterschiede in den ermittelten EEQ-Werten feststellen (Gesamtvariabilität)?



Übertragbarkeit auf reale Umweltprobe

Um zu prüfen, in wie weit sich die Resultate zu Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit aus nachgebildeten Proben auf reale Umweltproben übertragen lassen, wurde eine ARA-Ablaufprobe untersucht.

Eignung der Standardaddition (Aufstockung)

Zur Untersuchung ob eine Aufstockung von Umweltproben mit 17 β -Estradiol (vor der Extraktion), wie dies bei chemisch-analytischen Messungen üblich ist, auch bei Biotests zur Qualitätssicherung geeignet ist, wurden Reinstwasser und reale Umweltproben mit verschiedenen 17 β -Estradiol-Konzentrationen aufgestockt und im Biotest untersucht.

Material und Methoden

Probenherstellung

Nachgebildete Proben

Zur Herstellung der nachgebildeten Wasserproben wurde Reinstwasser mit ethanolischen Stammlösungen versetzt um umweltrelevante Konzentrationen östrogen-aktiver Stoffe zu erhalten. Folgende nachgebildete Wasserproben wurden hergestellt (Tab. 22):

Tab. 22: Konzentrationen östrogen-aktiver Stoffe in den nachgebildeten Wasserproben.

Probenbezeichnung	Stoff	Nachgebildete Probe (ng/L)
E2 _{tief}	17 β -Estradiol	0.3
E2 _{hoch}	17 β -Estradiol	6
MIX _{tief}	17 β -Estradiol	0.1
	Estron	0.8
	Ethinylestradiol	0.01
	Bisphenol A	50
MIX _{hoch}	17 β -Estradiol	1
	Estron	8
	Ethinylestradiol	0.1
	Bisphenol A	500

Die Probe E2_{hoch} soll 17 β -Estradiol-Konzentrationen in einem ARA-Ablauf repräsentieren. E2_{tief} wurde so gewählt, dass die Konzentration unter dem vorgeschlagenen chronischen Qualitätskriterium (CQK, auch Annual Average Environmental Quality Standard, AA-EQS) für 17 β -Estradiol von 0.4 ng/L liegt. Die nachgebildeten Gemischproben (MIX) setzen sich aus umweltrelevanten Konzentrationen von Estron (E1), 17 β -Estradiol (E2), 17 α -Ethinylestradiol (EE2) und Bisphenol A (BPA) zusammen, wobei die hoch belastete Probe den erwarteten EEQ-Werten nach einem ARA-Ablauf entspricht und die tief belastete Probe EEQs in Oberflächengewässern widerspiegelt. Diese Proben sollen es erlauben, Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit in stark wie auch schwach belasteten Proben in Festphasenextraktion und Biotests zu ermitteln. Zur Herstellung der aufgestockten Proben für die Untersuchungen zur Eignung der Standardaddition wurden die nachgebildeten Proben zusätzlich mit E2 versetzt.

Als Kontrollen wurden ethanolische Lösungen hergestellt (nachgebildete Extrakte), die mit den gleichen Konzentrationen östrogen-aktiver Stoffe versetzt wurden, wie sie in den Extrakten der nachgebildeten Proben zu erwarten sind.

In Tab. 23 findet sich eine detaillierte Aufstellung und Beschreibung der untersuchten Proben.



Tab. 23: Phase I - Liste der untersuchten nachgebildeten Proben.

BPA = Bisphenol A, E1 = Estron, E2 = 17 β -Estradiol, EE2 = 17 α Ethinylestradiol, SPE = Festphasenextraktion

Probenbezeichnung	Beschreibung	Probenaufarbeitung und Untersuchung
Wiederfindung von E2 in nachgebildeten Proben		
Blank (SPE)	SPE von Reinstwasser (<i>Procedural Blank</i>)	SPE, Biotest
E2 _{hoch}	Ethanol versetzt mit 6 ng/L E2	Biotest
E2 _{tief} (SPE)	SPE von Reinstwasser versetzt mit 0.3 ng/L E2	SPE, Biotest
E2 _{hoch} (SPE)	SPE von Reinstwasser versetzt mit 6 ng/L E2	SPE, Biotest
E2 _{tief} nach SPE	SPE von Reinstwasser: Nachträgliche Zugabe von 0.3 ng/L E2	SPE, E2-Zugabe, Biotest
E2 _{hoch} nach SPE	SPE von Reinstwasser: Nachträgliche Zugabe von 6 ng/L E2	SPE, E2-Zugabe, Biotest
Variabilität und Reproduzierbarkeit im Biotest: 5-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte an einem Tag (intra-day Variabilität) und an 5 verschiedenen Tagen (inter-day Variabilität)		
E2 _{hoch}	Ethanol versetzt mit 6 ng/L E2	5 x Biotest
MIX _{tief}	Ethanol versetzt mit einem Gemisch aus E1, E2, EE2 und BPA	5 x Biotest
MIX _{hoch}	entsprechend 0.3 ng/L EEQ (MIX _{tief}) bzw. 6 ng/L EEQ (MIX _{hoch})	5 x Biotest
Gesamtvariabilität der Methode: 5-malige Extraktion (SPE) jeder nachgebildeten Probe gefolgt von Biotest		
Blank (SPE) 1-5	SPE von Reinstwasser (<i>Procedural Blank</i>)	5 x SPE, 5 x Biotest
E2 _{hoch} (SPE) 1-5	SPE von Reinstwasser versetzt mit 6 ng/L E2	5 x SPE, 5 x Biotest
MIX _{tief} (SPE) 1-5	SPE von Reinstwasser mit umweltrelevanten Konzentrationen von E1, E2, EE2 und BPA versetzt entsprechend 0.3 ng/L EEQ	5 x SPE, 5 x Biotest
MIX _{hoch} (SPE) 1-5	(MIX _{tief}) bzw. 6 ng/L EEQ (MIX _{hoch})	5 x SPE, 5 x Biotest

Nachgebildete und reale Umweltproben mit Aufstockung

Um zu prüfen, ob die Resultate zu Wiederfindung, Variabilität und Reproduzierbarkeit auf eine reale Umweltprobe übertragbar sind, wurde eine schwach belastete ARA-Ablauf-Probe wiederholt extrahiert und im YES untersucht. Dieses gereinigte Abwasser weist üblicherweise EEQ-Werte zwischen 0.5 und 1 ng/L auf.

Zur Herstellung der aufgestockten Proben für die Untersuchungen zur Eignung der Standardaddition wurden die realen Umweltproben zusätzlich mit 0.6, 2 und 6 ng/L E2 versetzt. Als Kontrolle wurde Reinstwasser mit den gleichen E2-Konzentrationen versetzt, wie sie den realen Umweltproben zugesetzt wurden. In Tab. 24 findet sich eine detaillierte Aufstellung und Beschreibung der untersuchten Proben.



Tab. 24: Phase II - Liste der untersuchten nachgebildeten und realen Umweltproben mit Aufstockung

ARA = Abwasserreinigungsanlage, E2 = 17 β -Estradiol, SPE = Festphasenextraktion

Probenbezeichnung	Beschreibung	Probenaufarbeitung und Untersuchung
Übertragbarkeit auf reale Umweltprobe zur Untersuchung der Gesamtvariabilität der Methode: Wiederholte Extraktion (SPE) der ARA-Ablauf-Probe mit anschliessendem Biotest		
Blank 1-4	SPE von Reinstwasser (<i>Procedural Blank</i>)	4 x SPE, 4 x Biotest
ARA 1-10	SPE von ARA-Ablauf-Probe	10 x SPE, 10 x Biotest
Aufstockung von realen Umweltproben (Standardaddition mit E2)		
E2 _{tief x 2} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser versetzt mit 0.6 ng/L E2	3 x SPE, 3 x Biotest
E2 _{mittel} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser versetzt mit 2 ng/L E2	3 x SPE, 3 x Biotest
E2 _{hoch} (SPE) 1-3	SPE von Reinstwasser versetzt mit 6 ng/L E2	3 x SPE, 3 x Biotest
ARA + E2 _{tief x 2} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe versetzt mit 0.6 ng/L E2	5 x SPE, 5 x Biotest
ARA + E2 _{mittel} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe versetzt mit 2 ng/L E2	5 x SPE, 5 x Biotest
ARA + E2 _{hoch} (SPE) 1-5	SPE von ARA-Ablauf Probe versetzt mit 6 ng/L E2	5 x SPE, 5 x Biotest

Probenextraktion

Bei allen Versuchen mit nachgebildeten Proben und realen Umweltproben wurde der Konzentrationsfaktor der zu testenden Probenextrakte so gewählt, dass im Biotest eine Nachweisgrenze von 0.12 ng/L erreicht werden kann. Dies entspricht den Anforderungen an die chemische Analytik im Rahmen der EU-Wasserrahmen-Richtlinie, die eine „Nachweisgrenze $\leq 0.3 \cdot \text{AA-EQS}$ “ vorschreibt. Für E2/EEQs entspricht dies „ $0.3 \cdot 0.4 \text{ ng/L E2 AA-EQS}$ “, also 0.12 ng/L.

Für die Messung im Biotest wurden die nachgebildeten Wasserproben und die Umweltproben mittels SPE angereichert und extrahiert. Hierfür wurde nach der Herstellung der Proben der pH-Wert mit HCl (1 M) auf pH 3 eingestellt und gemäss SOP (Ecotox Centre, 2015) mittels Lichrolut RP18/EN Kartuschen (Merck, Darmstadt, Deutschland) extrahiert. Die Kartuschen wurden zunächst mit 2 mL Hexan, 2 mL Aceton, 6 mL Methanol und 6 mL Reinstwasser (pH 3.0) konditioniert. Danach wurden je 1000 mL (Proben E2_{tief}, MIX_{tief}) bzw. 500 mL (alle anderen Proben) über die Kartuschen extrahiert. Als methodischer Blank dienen 500 mL Reinstwasser. Für die Elution der Proben aus den Kartuschen wurden 4 x 1 mL Aceton und 1 mL Methanol verwendet. Die eluierten Lösungsmittel wurden mit Stickstoff auf 0.5 mL eingengt und anschliessend mittels einer 1 mL Hamilton-Spritze mit Ethanol auf 1 mL addiert. Die nun in 1 mL einer Lösungsmittelmischung (~50% Ethanol, ~50% Aceton und Methanol) vorliegenden 1000-fach (Proben: E2_{tief}, MIX_{tief}) bzw. 500-fach aufkonzentrierten Proben (alle anderen Proben) wurden bei -20°C bis zur Analyse in den Biotests gelagert. Zur Untersuchung der Variabilität der Extraktion selbst, wurde oben beschriebene Extraktionsmethode mit jeder Probe 5 Mal durchgeführt.



Durchführung des Biotests

Methodenbeschreibung

Eine detaillierte Methodenbeschreibung des YES findet sich in Routledge und Sumpter (1996). Bei allen Untersuchungen im YES wurden eine Dosis-Wirkungskurve der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol und eine Lösungsmittelkontrolle (je 8 technische Replikate) zur Qualitätskontrolle miteinbezogen.

Bei den ethanolischen und nachgebildeten MIX-Proben wurde der erwartete EEQ einer Probe mit Hilfe der testspezifischen E2-Äquivalenzfaktoren (EEF) berechnet (Tab. 25), um basierend auf diesem Wert die Wiederfindung für die Biotests selbst sowie für die gesamte Methode zu ermitteln.

Tab. 25: 17 β -Estradiol (E2)-Äquivalenzfaktoren (EEF) östrogen-aktiver Substanzen und die daraus berechneten Soll-EEQ-Konzentrationen (ng/L) der untersuchten Proben im Yeast Estrogen Screen.

Stoff / Probenbezeichnung	EEF	Soll-EEQ (ng/L)
17 β -Estradiol (E2)	1	
Estron (E1)	0.265	
17 α Ethinylestradiol (EE2)	1.181	
Bisphenol A (BPA)	6.47E-05	
MIX _{tief}		0.31
MIX _{hoch}		3.19

Datenanalyse

Standardkurven wurden mittels nichtlinearer Regression (4-Parameter Hill Funktion, GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc.) gefittet, um die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀), die Nachweisgrenze (Mittelwert_{Untergrundsignal} + 3 * Standardabweichung_{Untergrundsignal}) und die Bestimmungsgrenze (BG = Mittelwert_{Untergrundsignal} + 10 * Standardabweichung_{Untergrundsignal}) zu bestimmen. Für Proben mit quantifizierbaren Effekten im YES (Induktion > Nachweisgrenze) wurden 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) berechnet. Die EEQ ist definiert als jene E2-Konzentration, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe (siehe Abb. 7).

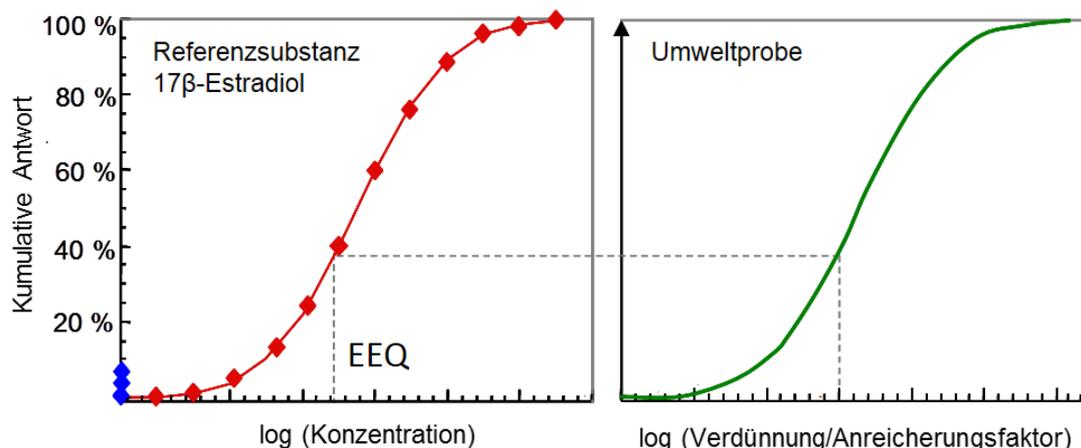


Abb. 7: Ableitung von 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) durch den Vergleich der Effektkonzentration einer Umweltprobe mit jenen der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol.

Im YES wurden die Messwerte der Proben quantifiziert, wenn sie im linearen Bereich zwischen der Nachweisgrenze und dem EC₈₀ lagen. Bei Proben, deren Dosis-Wirkungskurven sich in der



Steigung deutlich vom E2-Standard unterschieden (nicht-parallele Dosis-Wirkungskurven), wurden nur Messpunkte im unteren, linearen Bereich der Dosis-Wirkungskurve (über der Nachweisgrenze) für die EEQ-Berechnungen berücksichtigt.

Ergebnisse und Diskussion

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die mittlere Nachweisgrenze für das Jahr 2013 (in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden) lag im YES bei 9.2 ± 2.0 ng/L E2 bzw. EEQ (n = 44 Tests). Die mittlere Bestimmungsgrenze lag bei 11 ± 2.6 ng/L E2 bzw. EEQ. Die Aufkonzentrierung der nachgebildeten Proben mittels SPE führte zu Nachweisgrenzen von 0.19 ng/L E2 / EEQ für die stark belasteten Proben (E2_{hoch}, MIX_{hoch}) und 0.09 ng/L E2 / EEQ für die schwach belasteten Proben (E2_{tief}, MIX_{tief}). Die Bestimmungsgrenzen lagen bei 0.22 bzw. 0.11 ng/L E2 bzw. EEQ. Die Effektkonzentrationen (EC₅₀) der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol lagen im Mittel bei 1.0×10^{-10} M 17 β -Estradiol (95% Konfidenzintervall = 9.5×10^{-11} bis 1.1×10^{-10} M).

Wiederfindung

Im YES erwies sich die Bestimmung und Wiederfindung von (nominal) 6 ng/L 17 β -Estradiol als robust und lag zwischen 82 und 108%. Die Wiederfindung von 0.3 ng/L E2 in den schwach belasteten Proben war deutlich schlechter und erreichte 40 bis 63% der zugesetzten E2-Konzentrationen (Tab. 26).

Tab. 26: Wiederfindung von 17 β -Estradiol (E2) in nachgebildeten und ethanolischen Proben im YES.

Werte sind als 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) (ng/L) angegeben. MW = Mittelwert (Triplikat-Bestimmung), SD = Standardabweichung, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-EEQ (ng/L)	EEQ im YES (ng/L)		Wiederfindung
		MW	SD	
Blank	0	nd		
E2 _{hoch}	6	6.45	0.44	108%
E2 _{hoch} (SPE)	6	4.90	1.32	82%
E2 _{hoch} nach SPE	6	5.94	0.35	99%
E2 _{tief} (SPE)	0.3	0.19	0.07	63%
E2 _{tief} nach SPE	0.3	0.12	0.05	40%

Um im YES die Wiederfindung bei schwach belasteten Proben abschliessend beurteilen zu können, wird empfohlen, weitere Experimente durchzuführen, die auch Reproduzierbarkeit und Variabilität berücksichtigen.

Variabilität und Reproduzierbarkeit

Die Variabilität und Reproduzierbarkeit der im YES ermittelten EEQ-Werte wurde für das wiederholte Messen derselben Proben innerhalb eines Tages (intra-day) und an verschiedenen Tagen (inter-day) ermittelt. Um ein Bild von der Variabilität der Biotest-Ergebnisse zu erhalten (ohne Variabilität der Festphasenextraktion) wurden ethanolische Proben untersucht (nachgebildete Extrakte), die mit den gleichen Konzentrationen östrogen-aktiver Stoffe versetzt wurden, wie sie in den Extrakten der nachgebildeten Proben zu erwarten sind.



Variabilität und Reproduzierbarkeit des Tests

Wurden die Proben innerhalb eines Tages und zwischen verschiedenen Tagen in jeweils 5 unabhängigen Tests gemessen, variierten im YES die ermittelten EEQ-Werte um 12 bis 31% (Tab. 27). Die höchste Variabilität wurde in der Probe mit 0.3 ng/L EEQ gemessen. Die E2-Probe wies eine Wiederfindung von 109% auf. In den beiden Gemischproben konnten 51-79% der erwarteten EEQs wiedergefunden werden.

Tab. 27: Variabilität und Reproduzierbarkeit im Yeast Estrogen Screen (YES): Je 5-maliges Testen nachgebildeter Probenextrakte innerhalb und zwischen verschiedenen Tagen.

Werte sind als 17β-Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) (ng/L) angegeben. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, E2 = 17β-Estradiol.

Probenbezeichnung	Soll-EEQ (ng/L)	Bio-EEQ im YES (ng/L)		Variabilität	Wiederfindung (bezogen auf Soll-EEQ)
		MW	SD		
E2 _{hoch}	6	6.56	1.52	23%	109%
MIX _{hoch}	3.19	2.52	0.30	12%	79%
MIX _{tief}	0.31	0.16	0.05	31%	51%

Gesamtvariabilität und Reproduzierbarkeit von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest in nachgebildeten Proben und realen Umweltproben

Nachgebildete Proben wurden jeweils 5x mittels Festphasenextraktion extrahiert und aufkonzentriert, die reale Umweltprobe jeweils 10x. Danach wurde für jeden Extrakt im YES die EEQ-Konzentration ermittelt.

Bei der Bestimmung der EEQ-Werte mittels extrahierter Proben im YES lag die Gesamtvariabilität für alle Proben im Bereich von 17-26%. Erwartungsgemäss zeigte die schwach belastete Probe (MIX_{tief} (SPE) 1-5) die grösste Variabilität und die kleinste Wiederfindungsrate. Die extrahierte Abwasserprobe zeigte mit einer Gesamtvariabilität von 21% im YES eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten für nachgebildete Proben (Tab. 28).

Tab. 28: Reproduzierbarkeit und Variabilität von Festphasenextraktion (SPE) und Biotest. 5-malige SPE jeder Probe und Messung im Yeast Estrogen Screen (YES) (Abwasser (ARA) je 10x).

Werte sind als 17β-Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) (ng/L) angegeben. ARA = Abwasserreinigungsanlage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, E2 = 17β-Estradiol, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-EEQ (ng/L)	Bio-EEQ im YES (ng/L)		Variabilität	Wiederfindung (bezogen auf Soll-EEQ)
		MW	SD		
Blank (SPE) 1-5	--	nd		--	--
E2 _{hoch} (SPE) 1-5	6	7.45	1.39	19%	124%
MIX _{hoch} (SPE) 1-5	3.19	2.86	0.48	17%	90%
MIX _{tief} (SPE) 1-5	0.31	0.23	0.06	26%	74%
Blank (SPE) 1-4	--	nd		--	--
ARA (SPE) 1-10	--	0.12	0.03	21%	--

Die Reproduzierbarkeit der SPE selbst kann anhand der Daten für die stark belasteten Proben grob abgeschätzt werden. Die von der SPE herrührenden Schwankungen der in Biotests ermittelten EEQ-Werte (SPE-basierte Variabilität = Mittelwert Gesamtvariabilität – Mittelwert Biotest-Variabilität) liegen im Bereich von -4-5% (Tab. 29).



Tab. 29: Abschätzung der SPE-basierten Variabilität (= Gesamtvariabilität - Biotest-Variabilität).

Probenbezeichnung	Gesamt-Variabilität	Biotest-Variabilität	SPE-basierte Variabilität
E2 _{hoch}	19%	23%	-4%
MIX _{hoch}	17%	12%	5%

Generell sollte die SPE-basierte Variabilität chemisch-analytisch ermittelt werden. Das SPE-Verfahren zur Messung der Probe im Biotest unterscheidet sich jedoch von dem SPE-Verfahren für die chemisch-analytische Messung einer Probe.

Eignung der Standardaddition (Aufstockung)

Die Resultate zur Eignung der Standardaddition von E2 als Qualitätskontroll-Massnahme für Biotests lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Wird eine Umweltprobe mit unterschiedlichen E2-Standardadditionen aufgestockt, beträgt die nominale Wiederfindung im YES bei Zugabe von 0,6, 2 oder 6 ng/L E2 48 bis 81%. Berechnet man die Wiederfindung im Abwasser anhand der im Biotest gemessenen EEQ-Werte in den aufgestockten Reinstwasser-Proben liegt sie für den YES zwischen 86 und 114% (Tab. 30).

Tab. 30: Standardaddition von 17 β -Estradiol (E2) zu realen Umweltproben und nachfolgende Messung im YES.

Werte sind als 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQs) (ng/L) angegeben. ARA = Abwasserreinigungsanlage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, E2 = 17 β -Estradiol, SPE = Festphasenextraktion, nd = nicht messbar/detektierbar.

Probenbezeichnung	Soll-EEQ* (ng/L)	Bio-EEQ im YES (ng/L)		Variabilität	Wiederfindung ** (bezogen auf Soll-EEQ) *	
		MW	SD		nominal	gemessen
Blank 1-4		nd				
E2 _{tief} x 2 (SPE) 1-3	0.60	<u>0.18</u>	0.01	8%	30%	--
E2 _{mittel} (SPE) 1-3	2.00	<u>1.21</u>	0.02	1%	61%	--
E2 _{hoch} (SPE) 1-3	6.00	<u>4.39</u>	0.07	2%	73%	--
ARA (SPE) 1-10	--	<u>0.12</u>	0.03	21%	--	--
ARA + E2 _{tief} x 2 (SPE) 1-5	0.72	0.34	0.03	10%	48%	<u>114%</u>
ARA + E2 _{mittel} (SPE) 1-5	2.12	1.14	0.23	21%	54%	<u>86%</u>
ARA + E2 _{hoch} (SPE) 1-5	6.12	4.93	0.38	8%	81%	<u>109%</u>

* Für die Berechnung der Soll-EEQ-Werte wurden die aktuell gemessenen EEQ Konzentrationen des Abwassers zu den nominalen, für die Aufstockung genutzten, Konzentrationen addiert.

** Für die Berechnung der nominalen Wiederfindung wurden Soll-EEQ-Werte verwendet. Zum Vergleich wurde die Wiederfindung ebenfalls anhand der im Biotest gemessenen Konzentrationen der Positivkontrolle (Reinstwasser + 0,6, 2 oder 6 ng/L E2) und der ARA-Probe berechnet (Spalte Wiederfindung gemessen).

Insgesamt ist die Standardaddition von E2 zu einer Umweltprobe als Qualitätskontrolle für Biotests schwieriger zu interpretieren als bei der chemischen Analytik. Mögliche Verluste an der östrogenen Aktivität einer aufgestockten Probe können nicht klar der Probe selbst bzw. dem addierten Standard zugewiesen werden, wie dies bei deuterierten Standards der chemischen Analytik machbar ist. So kann nicht bestimmt werden, wie hoch die östrogene Aktivität der Probe selbst, ohne Verlust, sein müsste. Zudem kann auch nicht mit Sicherheit ermittelt werden, wie gross die Wiederfindung der gesamten Methode (SPE und Biotest) ist. Die



Mitführung von Positiv-Kontrollen (Reinstwasser aufgestockt mit E2) erlaubt zumindest eine Abschätzung der Wiederfindung der Methode. Schliesslich können auch antagonistisch oder partiell antagonistisch¹ wirkende Stoffe in den Proben zu einer verminderten Aktivität führen, die fälschlicherweise als geringe Wiederfindung der E2-Standardaddition interpretiert werden könnte. Um dies auszuschliessen, würde eine parallele Untersuchung der Probe auf anti-östrogene Aktivität möglicherweise Sinn machen.

Die E2-Standardaddition zu einer Umweltprobe als qualitätssichernde Massnahme, scheint zu keiner Zusatzinformation zu führen. Die Mitführung eines „Procedural Blank“ (Reinstwasser) und von Positiv-Kontrollen (Ethanol versetzt mit E2 und Reinstwasser versetzt mit E2), sowie die parallele Prüfung auf anti-östrogene Aktivität scheinen für diesen Zweck geeigneter zu sein.

Zusammenfassung

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass die gemessenen 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen in aufkonzentrierten Proben im YES in Bezug auf Variabilität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindung den Anforderungen an die chemische Analytik entsprechen (Variabilität um 20-25%) und für Abwasser und belastete Oberflächengewässer zur Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt werden können. Die Studie zur Methodvalidierung mittels nachgebildeter Proben und realer Umweltproben hat zu folgenden Erkenntnissen geführt:

- Der YES kann durch Festphasenextraktion Nachweisgrenzen von < 0.12 ng/L E2 erreichen und erfüllt so die Anforderungen der Wasserrahmenrichtlinie (Nachweisgrenze < 0.3*EQS). Dies ermöglicht die Messung von schwach belasteten Proben mit EEQ unter dem E2-AA-EQS von 0.4 ng/L E2.
- Die Wiederfindung von 6 ng/L 17 β -Estradiol in nachgebildeten Wasserproben wie auch Kontrollproben erwies sich im YES als robust und lag zwischen 82 und 109%. Einzig in schwach belasteten Proben war im YES die Wiederfindung nicht sehr hoch (40-63%). Allerdings liegt die untersuchte Konzentration (0.3 ng/L E2) auch nahe an der Bestimmungsgrenze (0.11 ng/L E2). Diesbezüglich könnten ergänzende Experimente mit nachgebildeten Proben Klarheit bringen.
- Die Variabilität der im YES gemessenen EEQ-Werte lag zwischen 12 und 31%.
- Die Gesamtvariabilität der Untersuchung (Festphasenextraktion mit anschliessendem YES) lag bei den belasteten Proben (E2_{hoch} und MIX_{hoch}) zwischen 17 und 19%. Bei den schwach belasteten Proben (< AA-EQS für E2) war die Gesamtvariabilität mit 26% etwas höher.
- Eine grobe Abschätzung für die Reproduzierbarkeit der SPE (= Gesamt-Variabilität – Biotest-Variabilität) führt bei den stark belasteten Proben zu einer SPE-basierten Variabilität der EEQ-Werte von ca. -4 bis 5%.

In einem zweiten Teil des Projektes wurde die Gesamtvariabilität der Untersuchungsmethoden (SPE mit anschliessendem Biotest) an einer Umweltprobe (Abwasser) untersucht. Dabei wurde die Umweltprobe zusätzlich mit 17 β -Estradiol aufgestockt und die anschliessende Wiederfindung im YES untersucht. Die Ergebnisse hieraus waren:

- Die Festphasenextraktion von Abwasser mit anschliessendem Biotest führte zu einer Gesamtvariabilität der EEQ-Werte im YES von 21%.
- Die E2-Standardaddition zu einer Umweltprobe, als qualitätssichernde Massnahme, scheint zu keiner Zusatzinformation zu führen. Die Mitführung eines „Procedural Blank“ und von Positiv-Kontrollen, sowie die parallele Prüfung auf anti-östrogene Aktivität scheinen für eine Qualitätssicherung geeigneter zu sein.

¹ Partielle Antagonisten haben die Fähigkeit alleine östrogene Aktivität zu induzieren, in Kombination mit E2 jedoch die Wirkung von E2 zu hemmen und so als Antagonisten zu wirken.



Anhang 5 Fallstudien zur Anwendung des Beurteilungskonzepts

Fallstudie 1: Beurteilung der östrogenen Aktivität in Kläranlagenabläufen und Fließgewässern des Kantons St. Gallen

Einleitung

Um Punktquellen von Spurenstoffen durch Immissionsmessungen im kommunalen Abwasser zu ermitteln, wurde im Jahr 2012 eine Untersuchung an Kläranlagenabläufen und Fließgewässern im Kanton St. Gallen und an ausgewählten Kläranlagen in Nachbarkantonen und dem Fürstentum Liechtenstein durchgeführt. Hierbei wurde u.a. auch die östrogene Aktivität mit dem Yeast Estrogen Screen (YES) gemessen. Die im Abwasser gemessenen Konzentrationen wurden anschliessend über die Verdünnung aufs Gewässer umgerechnet. Die so ermittelte Konzentration im Gewässer wurde mit ökotoxikologischen Beurteilungswerten verglichen, um die Relevanz von Östrogenen in angrenzenden Fließgewässern zu ermitteln. Abschliessend erfolgte eine Beurteilung der Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen am Beispiel des vorgeschlagenen 5-stufigen Konzeptes.

Material und Methoden

Im Frühjahr 2012 wurden an 44 kommunalen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) Wochenmischproben im ARA-Ablauf genommen. Beprobt wurden 38 von 42 ARA des Kantons St. Gallen und 6 ARA in Nachbarkantonen und dem Fürstentum Liechtenstein. Es wurden folgende Parameter untersucht: Neben der Messung von 17β -Estradiol-Äquivalenten mittels YES wurden auch verschiedene organische Spurenstoffe, Anionen (Bromid, Chlorid, Fluorid), adsorbierbare organisch gebundene Halogene (AOX) mit Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) quantifiziert. Für die Analysen wurden die Proben jeweils durch eine Festphasenextraktion (siehe Anhang 1) aufkonzentriert. Im Folgenden wird nur auf die Ergebnisse des YES eingegangen. Details zu den weiteren Parametern finden sich im Projektbericht des Amtes für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen (2013).

Ergebnisse

Gemessene EEQ-Werte in den Kläranlagenabläufen

Die Nachweisgrenzen im Test sind jeweils abhängig von den Aufkonzentrierungsfaktoren der Proben und lagen zwischen 0.04 ng/L (bei 186facher Aufkonzentrierung) und 0.02 ng/L (bei 399facher Aufkonzentrierung).

In Abb. 8 sind die im YES bestimmten EEQ-Werte der untersuchten Proben dargestellt.

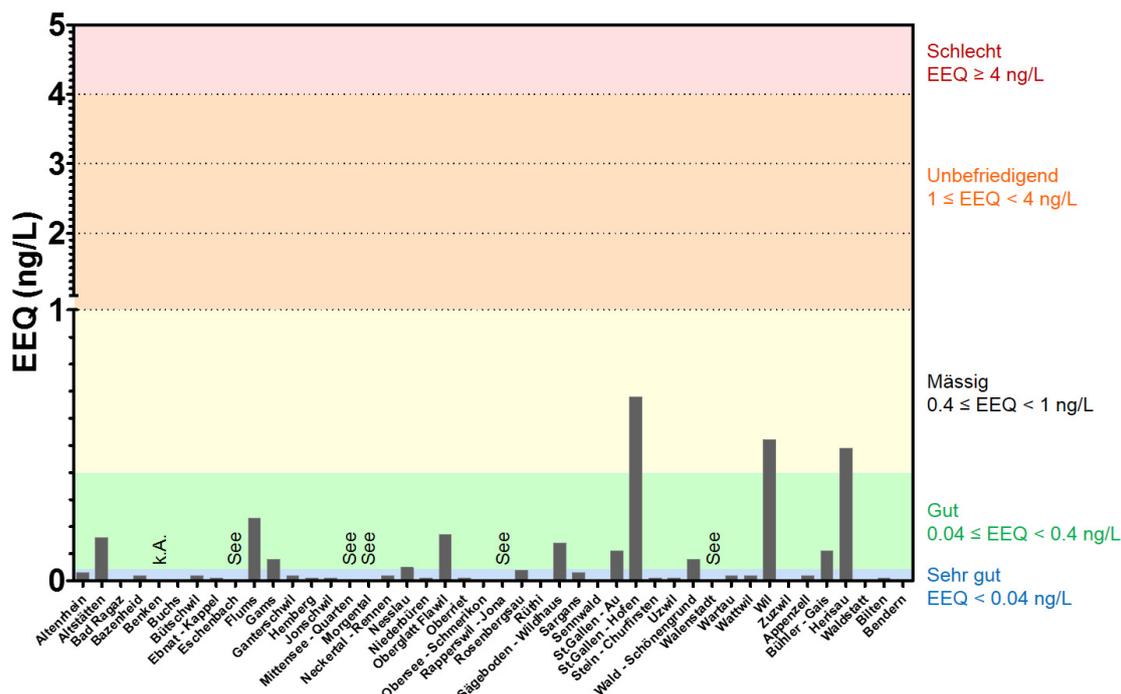


Abb. 10: Beurteilung der 44 untersuchten Kläranlagen bzw. Fließgewässer anhand des vorgeschlagenen 5-stufigen Beurteilungskonzeptes.

EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration. k.A. = keine Angabe, See = Einleitung in See, keine EEQ extrapoliert

Nach dieser Beurteilung ist in 31 von 44 Fließgewässern eine sehr gute Wasserqualität bezüglich östrogenen Belastung zu erwarten, zehn Fließgewässer weisen diesbezüglich eine gute Wasserqualität auf. Lediglich drei Fließgewässer – die Steinach bei der ARA Hofen, der Albach unterhalb der ARA Wil und die Glatt unterhalb der ARA Herisau – weisen, basierend auf diesem Konzept, eine mässige Wasserqualität auf. In keinem Fließgewässer an den Untersuchungsstandorten ist eine schlechte Wasserqualität zu erwarten.

Zusammenfassung

EEQ-Werte im ARA-Ablauf: Im ARA-Ablauf wurden bei 3 von 44 ARA mehr als 4 ng EEQ/L gemessen. Hier wäre bei mehr als 10% Abwasser im Fließgewässer eine Überschreitung des Qualitätskriteriums möglich.

EEQ-Werte extrapoliert auf Fließgewässer: Bei den mit Hilfe des Q₃₄₇ auf Fließgewässer extrapolierten Werten sind Überschreitungen bei Niedrigwasser bei drei Anlagen möglich. Bei einem dieser Standorte (ARA Hofen) wurden bereits in früheren Studien erhöhte Vitellogenin-Werte in Fischen gemessen.

Wasserqualitätsbeurteilung mit 5-stufigem Beurteilungskonzept: Im Grossteil der Fließgewässer unterhalb der ARA wurde die Wasserqualität bzgl. östrogenen Belastungen mit sehr gut bis gut beurteilt. Drei der Fließgewässer wiesen eine mässige Wasserqualität auf.



Fallstudie 2: Messkampagne an 12 Abwasserreinigungsanlagen und angrenzenden Fliessgewässern im Rahmen des Projektes EcolImpact

Einleitung

Ziel des Projektes EcolImpact der Eawag ist die Untersuchung der Auswirkungen von Mikroverunreinigungen aus Kläranlagenabwasser auf Fliessgewässerökosysteme. Hierbei soll sowohl die derzeitige Situation, als auch die Veränderung durch den Ausbau mit erweiterten Reinigungsstufen, wie z.B. eine Ozonung oder Pulveraktivkohlestufe, oder die Abschaltung von Kläranlagen evaluiert werden (weitere Informationen siehe: <http://www.eawag.ch/de/forschung/wasser-fuer-die-oekosysteme/schadstoffe/ecoimpact/>). Im Rahmen dieses Projektes wurden beide vorgeschlagene Biotests, der YES und der kombinierte Algentest, auf Proben von 12 Kläranlagen mit angrenzenden Fliessgewässern angewendet. Die im Abwasser gemessenen Konzentrationen wurden anschliessend über die Verdünnung aufs Gewässer umgerechnet. Zudem wurden die direkt im Gewässer gemessenen Werte beurteilt. Die Konzentration im Gewässer wurde, wie in Fallstudie 1, mit ökotoxikologischen Beurteilungswerten verglichen. Abschliessend erfolgte eine Beurteilung der Belastung mit östrogen-aktiven und Photosystem II-hemmenden Stoffen am Beispiel des vorgeschlagenen 5-stufigen Konzeptes.

Material und Methoden

Im Rahmen von EcolImpact wurde 2013 eine Messkampagne an 12 Schweizer Abwasserreinigungsanlagen (ARA) und angrenzenden Fliessgewässern durchgeführt. Sowohl im ARA-Ablauf als auch im Fliessgewässer wurden Stichproben genommen, um die im Fliessgewässer gemessenen Effekte möglichst gut mit den vom Abwasser aufs Fliessgewässer extrapolierten Effekten in Beziehung bringen zu können. Um die ökotoxikologischen Effekte möglichst umfassend bewerten zu können, wurden im Projekt sowohl Biotests direkt im Feld, als auch mit Wasserproben im Labor durchgeführt. Für die Analysen im Labor wurden die Proben jeweils mittels einer Festphasenextraktion (siehe Anhang 1) aufkonzentriert. Mit allen Proben wurden sowohl der YES als auch der kombinierte Algentest durchgeführt.

Ergebnisse

Beim Parameter östrogene Aktivität ebenso wie bei der Hemmung des Photosystems II konnte ein Einfluss der Kläranlage im Allgemeinen gut festgestellt werden: Im Gewässer unterhalb des Kläranlagenablaufs waren die 17β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) ebenso wie die Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) aus den Biotests in der Regel höher als davor.

In Abb. 11 sind die im YES bestimmten EEQ-Werte der untersuchten Proben dargestellt.

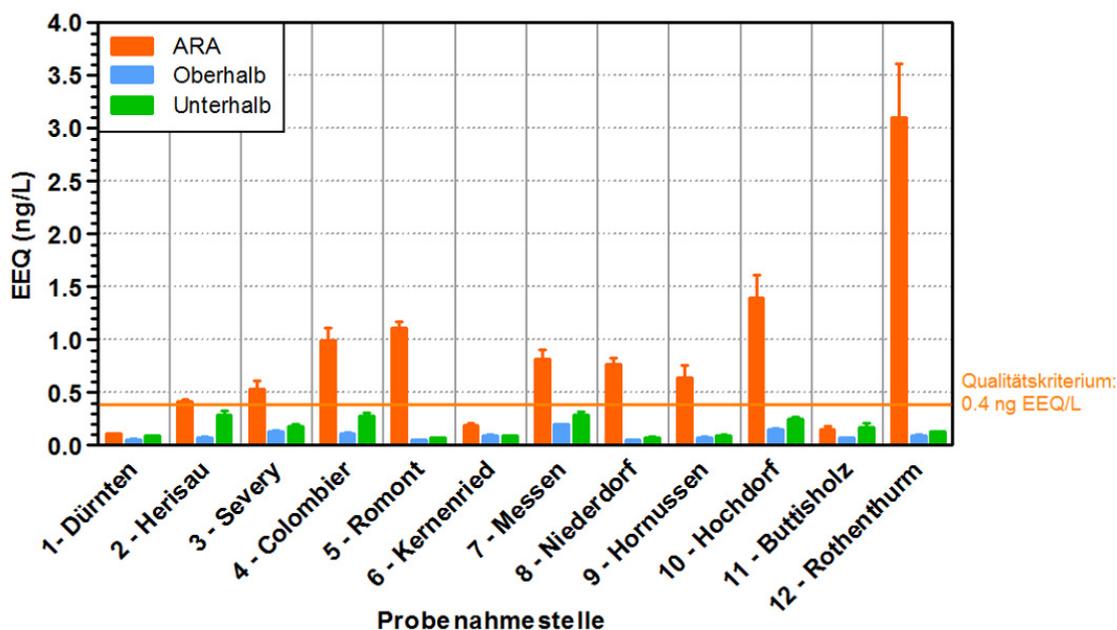


Abb. 11: Ergebnisse des Yeast Estrogen Screen in Kläranlagenabläufen (ARA) und Fließgewässern.

ARA = Abwasserreinigungsanlage, EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration

In keinem der untersuchten Fließgewässern wurden Überschreitungen des chronischen Qualitätskriteriums gemessen.

Abb. 12 zeigt die im Algentest erhaltenen DEQ-Werte der untersuchten Proben.

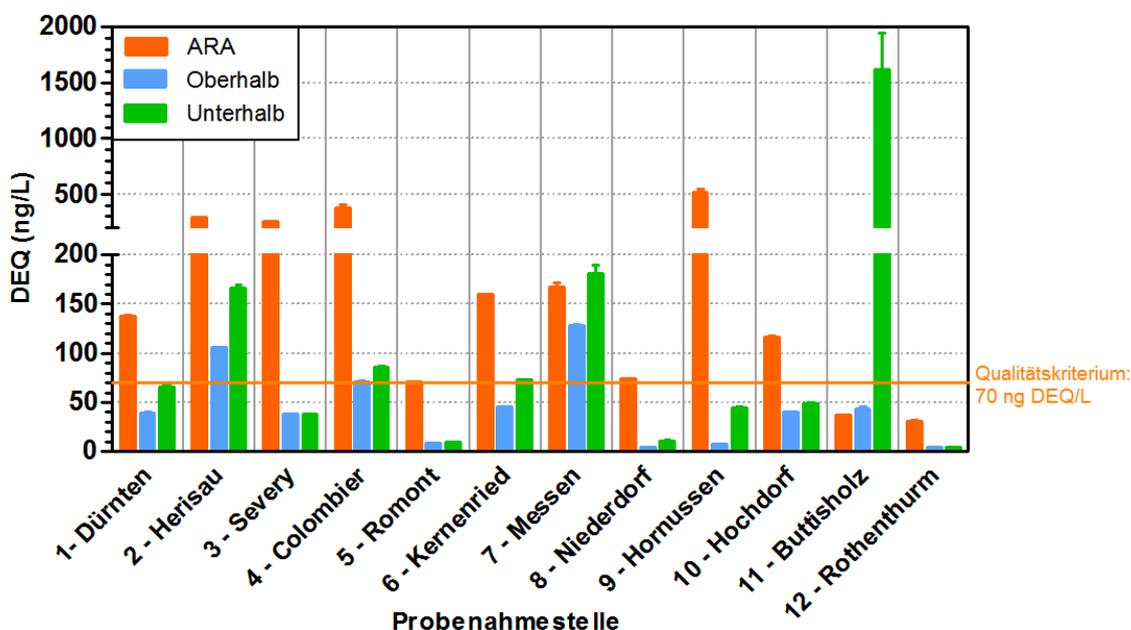


Abb. 12: Ergebnisse des kombinierten Algentests in Kläranlagenabläufen (ARA) und Fließgewässern.

ARA = Abwasserreinigungsanlage, DEQ = Diuron-Äquivalenzkonzentration



Bei Photosystem II-hemmenden Stoffen zeigt sich die Situation deutlich anders. Hier wurde das chronische Qualitätskriterium für Diuron bei 8 von 12 Fliessgewässern bereits oberhalb der Kläranlage überschritten. Unterhalb der ARA gab es Überschreitungen bei 9 Probenahmestellen. An einer Stelle (Buttisholz) war der DEQ nach der Kläranlage um ein Vielfaches höher als der DEQ im Ablauf der zugehörigen Kläranlage. Hier fand vermutlich zwischen Kläranlagenablauf und Probenahmestelle im Fliessgewässer ein Herbizideintrag statt. Das Biotestergebnis wurde durch die chemische Analytik bestätigt, wobei das Herbizid Terbutylazin als der hauptsächlich für den Effekt verantwortliche Stoff identifiziert werden konnte. Die Konzentration unterhalb der ARA lag bei 3000 ng/L, wobei diese Substanz etwa ein Drittel so stark auf das Photosystem II wirkt wie Diuron.

Beurteilung der Belastung im Fliessgewässer anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept

Da bei diesem Projekt die Belastung direkt im Fliessgewässer erfasst wurde, erfolgte die Beurteilung der Fliessgewässerbelastung mittels der dort gemessenen EEQ- und DEQ-Werte anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept (siehe Kapitel 4.2.2).

In Abb. 13 sind die Messwerte mit Einteilung in die Wasserqualitätsklassen für die Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen abgebildet.

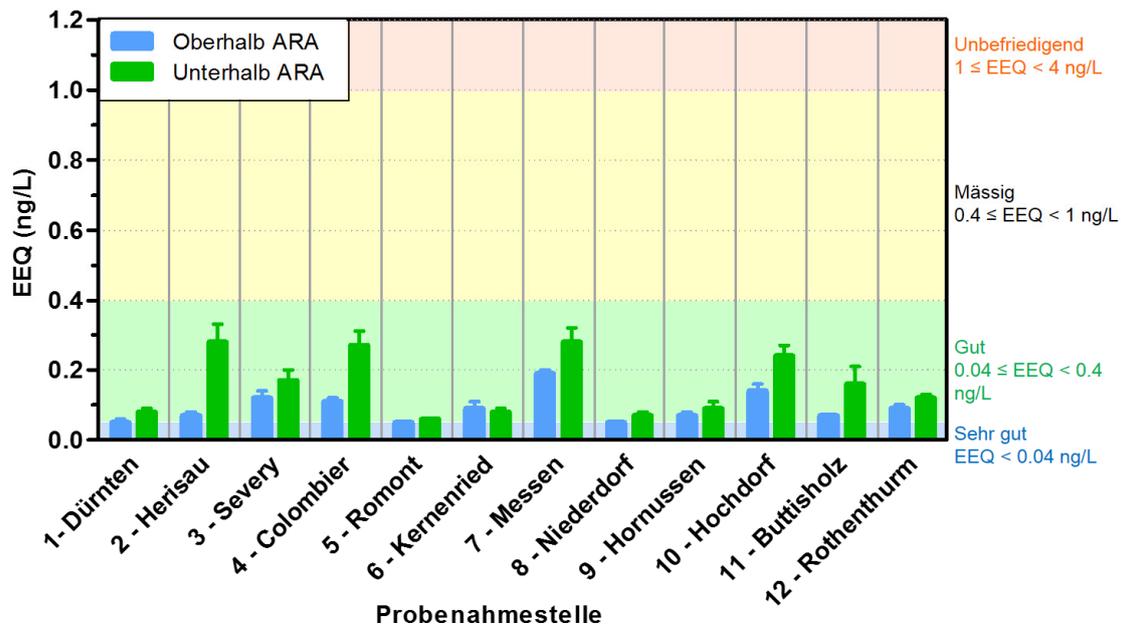


Abb. 13: Beurteilung der Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen in den 12 in Ecolmpact untersuchten Fliessgewässern anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept. ARA = Abwasserreinigungsanlage, EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration.

In allen 12 untersuchten Gewässern lag eine gute Wasserqualität bezüglich östrogen-aktiver Stoffe vor. In Bezug auf Photosystem II-hemmende Stoffe zeigte sich eine andere Situation (Abb. 14).

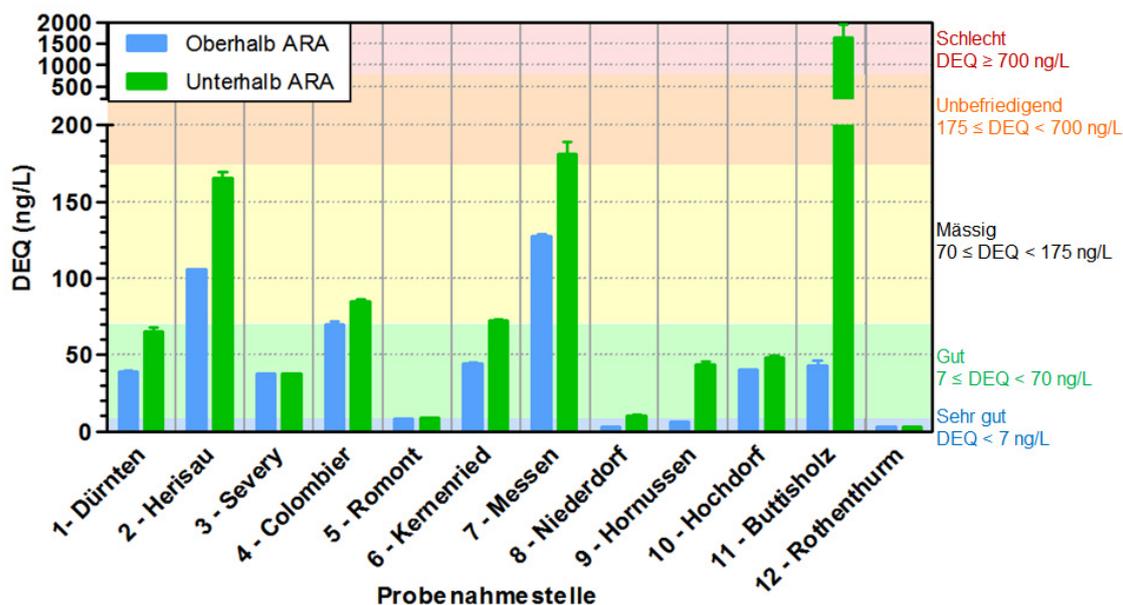


Abb. 14: Beurteilung der Belastung mit Photosystem II-hemmenden Stoffen in den 12 in Ecolmpact untersuchten Fließgewässern anhand des Vorschlags für ein 5-stufiges Beurteilungskonzept. ARA = Abwasserreinigungsanlage, DEQ = Diuron-Äquivalenzkonzentration.

Bei dieser Stoffklasse lag bei 9 Fließgewässern oberhalb der ARA und bei 7 unterhalb der ARA eine sehr gute bzw. gute Wasserqualität vor. Drei Gewässer zeigten oberhalb der ARA eine mässige Wasserqualität. Diese Befunde wurden durch den Einfluss des ARA-Abwassers verstärkt: Unterhalb der ARA waren 3 Gewässer mässiger Qualität, ein Gewässer wurde als unbefriedigend beurteilt und in einem Gewässer war die Wasserqualität bzgl. Photosystem II-hemmender Stoffe schlecht. Diese schlechte Wasserqualität wurde, wie oben erwähnt, vor allem durch das Herbizid Terbutylazin verursacht.

Zusammenfassung

Die angewendeten Methoden erwiesen sich als gut geeignet für eine ökotoxikologische Beurteilung der untersuchten Gewässer. Insgesamt kann die Belastungslage mit östrogenaktiven Stoffen als relativ gering eingestuft werden. Die EEQs überschritten nie das effektbasierte chronische Qualitätskriterium (CQK) für 17 β -Estradiol (0.4 ng/L). Dahingegen war die Belastung mit Photosystem II-hemmenden Stoffen höher: In 5 von 12 untersuchten Gewässern überschritten die DEQ das CQK für Diuron (70 ng/L), in einigen Fällen bereits im Gewässer oberhalb der Kläranlage. Eine unbefriedigende bis schlechte Wasserqualität wurde bei 2 Fließgewässern unterhalb der ARA gemessen.



Anhang 6 Wertfunktionen zur Beurteilung des Wasserqualität

Vorschläge für Wertfunktionen und die Aggregation der Daten

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, kann das Bewertungskonzept basierend auf dem Leitfadens für die Modulentwicklung nach Richtlinien des Seenkonzepts (Schlosser et al., 2013), ergänzt werden. Hierfür sind geringfügige Anpassungen der oben dargestellten Vorschläge erforderlich. Zunächst muss für das Modul Ökotoxikologie eine Zielhierarchie erstellt werden, aus der ersichtlich ist, welche Ziele mit einer Erhebung zu beurteilen sind. Diesen Zielen werden Attribute zugeordnet. Abb. 15 zeigt eine naheliegende Möglichkeit für die Zielhierarchie mit zugehörigen Attributen für Östrogenität und Photosystem II-hemmende Wirkung.

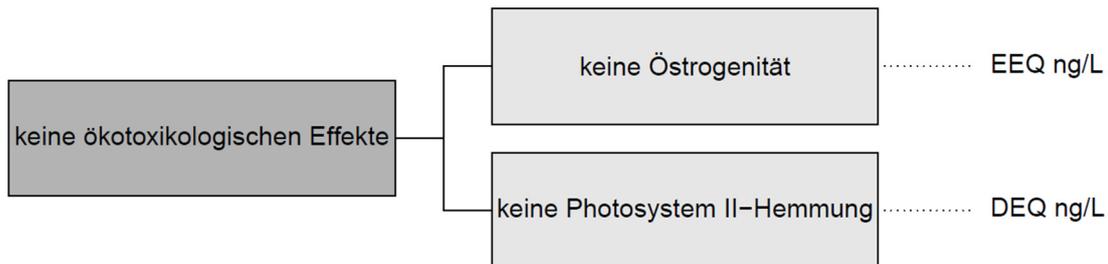


Abb. 15: Vorschlag für eine Zielhierarchie mit zugehörigen Attributen: Das Oberziel sind „keine ökotoxikologischen Effekte“. Die Unterziele sind „keine Östrogenität“ und „keine Photosystem II-Hemmung“. Gemessen werden diese beiden Ziele anhand der Attribute 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ, ng/L) und Diuron-Äquivalenzkonzentration (DEQ, ng/L).

Diese Zielhierarchie kann in Zukunft ergänzt werden, wenn weitere Methoden hinzukommen. Für das Bewertungsverfahren wird die Verwendung einer kontinuierlichen Funktion vorgeschlagen, die zusätzlich zu den Klassen eine standardisierte numerische Bewertung zwischen 0 (schlechter Fall) und 1 (bester Fall) erlaubt. Hierdurch können Rundungsfehler bei Aggregation der Daten zu einem Gesamtwert vermieden werden, und der Erfolg von Massnahmen kann auch innerhalb einer Klasse sichtbar gemacht werden. Hierfür müssen die Bewertungsklassen zunächst in eine kontinuierliche Funktion übersetzt werden. Dies kann durch lineare Interpolation zwischen den Klassengrenzen einfach erreicht werden (Abb. 16).



Beurteilung	Bedingung	Einhaltung Zielvorgabe
sehr gut	$EEQ < 0.04 \text{ ng/L}$	Eingehalten
gut	$0.04 \text{ ng/L} \leq EEQ < 0.4 \text{ ng/L}$	
mässig	$0.4 \text{ ng/L} \leq EEQ < 1 \text{ ng/L}$	Überschritten
unbefriedigend	$1 \text{ ng/L} \leq EEQ < 4 \text{ ng/L}$	
schlecht	$EEQ \geq 4 \text{ ng/L}$	

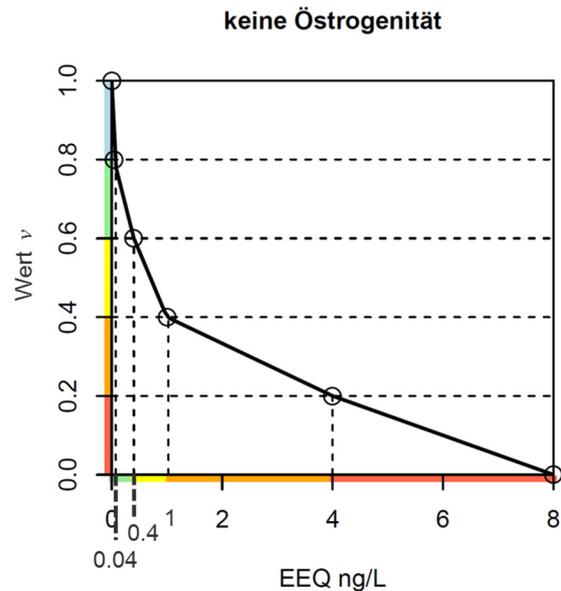


Abb. 16: Übersetzung der Zustandsklassen in eine kontinuierliche Funktion am Beispiel der Östrogenität.

Im Folgenden wird ein Überblick über mögliche Wertfunktionen für eine Beurteilung und den Umgang mit Unsicherheiten gegeben.

Der schlechteste Wert wurde auf 8 ng EEQ/L festgelegt, was dem 20fachen des Qualitätskriteriums von 0.4 ng EEQ/L entspricht. Analog wurde für die Hemmung des Photosystems II im kombinierten Algentest der schlechteste Wert auf 400 ng/L DEQ gesetzt. Falls diese Konzentrationen überschritten werden, bleibt der Wert v bei 0.

Um beide Werte für eine Gesamtbeurteilung zu aggregieren, können verschiedene Aggregationsmethoden gewählt werden. In Abb. 17 ist beispielhaft die Additiv-Minimum-Aggregation dargestellt (Langhans et al., 2014).

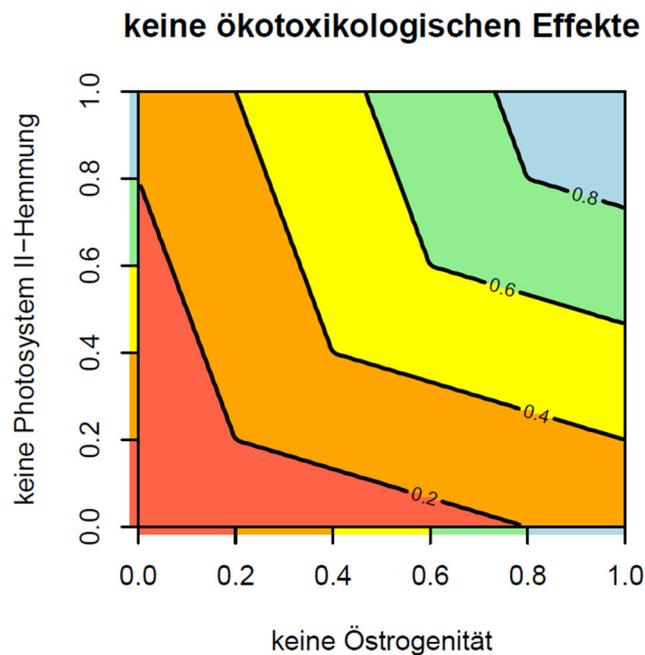


Abb. 17: Additiv-Minimum-Aggregation der Bewertung der Östrogenität und der Photosystem II-hemmenden Wirkung.

Die Aggregation erfolgt hier durch Bildung des Mittelwertes aus arithmetischem Mittelwert v_{add} und dem Minimum v_{min} nach folgender Formel:

$$v_{\text{add-min}} = 0.5 \cdot v_{\text{add}} + 0.5 \cdot v_{\text{min}}$$

mit $v_{\text{add}} = 0.5 \cdot v_1 + 0.5 \cdot v_2$ und $v_{\text{min}} = \min(v_1, v_2)$, wobei v_1 und v_2 die Einzelbewertungen der Östrogenität bzw. der Photosystem II-hemmenden Wirkung darstellen.

Während die rein additive Aggregation (= arithmetische Mittelwertbildung) eine vollständige Kompensation eines schlechten Teilziels durch ein entsprechend besseres Teilziel ermöglicht, ist der Additiv-Minimum-Aggregation zu eigen, dass ein schlechter Wert eines Ziels nur teilweise durch einen guten Wert eines anderen Ziels kompensiert werden kann. Sie wird daher zur Aggregation von Teilzielen empfohlen, die komplementär sind (Langhans et al., 2014). Im Gegensatz zur reinen Minimum-Aggregation, bei der keine Kompensation zwischen Teilzielen möglich ist, da der jeweils schlechteste Wert direkt als Gesamtwert verwendet wird, ist in der Additiv-Minimum-Aggregation eine Verbesserung im Gesamtwert durch eine Verbesserung eines beliebigen Unterziels möglich, auch wenn dieses nicht das schlechteste ist. Die Additiv-Minimum-Aggregation ist daher ein Kompromiss zwischen der Additiven und der Minimum-Aggregation, die die gewünschten Eigenschaften beider vereint.



Umgang mit Unsicherheit

Die Entscheidung über die Anzahl der Zustandsklassen war ursprünglich mit einer Diskussion über die Unsicherheit der Testverfahren verknüpft. Allerdings kann auch bei kleiner Unsicherheit in den Testverfahren und wenigen (z.B. drei) Klassen grosse Unsicherheit über die Zustandsklasse bestehen, wenn das Testergebnis nahe bei einer Klassengrenze liegt. Umgekehrt kann auch bei grösserer Unsicherheit im Testverfahren und vielen (z.B. fünf) Klassen eine kleine Unsicherheit über die Zustandsklasse bestehen, wenn das Testergebnis weit entfernt von einer Klassengrenze liegt (siehe Abb. 18). Je weniger Klassen zur Verfügung stehen, desto grösser ist der Diskretisierungsfehler und desto ungenauer die Aussage des Bewertungsverfahrens, unabhängig von der Unsicherheit im Testverfahren. Falls zusätzlich zur Klasseneinteilung eine kontinuierliche Bewertungsfunktion (siehe obiges Kapitel) zur Verfügung steht, kann ein Diskretisierungsfehler vermieden werden.

Bei Bedarf kann eine korrekte Abschätzung der Unsicherheit über die Zustandsklasse bei bekannter Unsicherheit des Testverfahrens nach folgendem Verfahren erfolgen: 1.) Basierend auf dem Testresultat kann eine Wahrscheinlichkeitsverteilung definiert werden (z.B. eine Normalverteilung mit Mittelwert des Testresultats und Standardabweichung die aus Kapitel 3.2.2 abgeleitet werden kann). 2.) Aus dieser Wahrscheinlichkeitsverteilung werden automatisch zufällige Stichproben gezogen. 3.) Für jede Stichprobe wird der Vorschlag für ein 5-stufiges Bewertungssystem (Kapitel 4.2.2) angewendet und die entsprechende Zustandsklasse ermittelt. 4.) Nun kann eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Zustandsklassen gemacht werden, entsprechend der Häufigkeit in der die jeweiligen Zustandsklassen, welche im 3. Schritt aufgetreten sind (z.B. 50% Wahrscheinlichkeit für die Klasse "mässig", 50% Wahrscheinlichkeit für die Klasse "unbefriedigend", Abb. 18). Die Resultate sollten entsprechend grafisch dargestellt werden (z.B. wie in Abb. 19 (Reichert et al., 2013)). Für eine spätere routinemässige Anwendung dieses Verfahrens im Rahmen des Modul-Stufen-Konzepts müsste eine benutzerfreundliche Auswertungssoftware bereitgestellt werden.

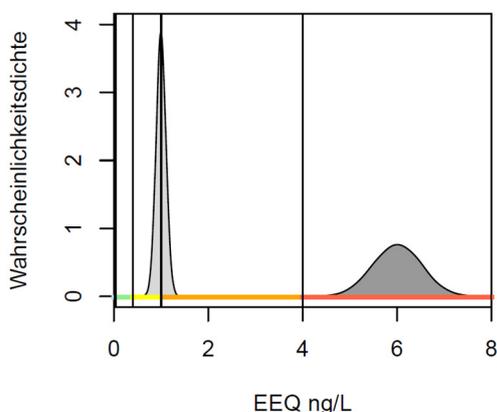


Abb. 18: Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Östrogenität in EEQ (ng/L) für ein Beispiel A mit Mittelwert 6 ng/L und Standardabweichung 0.5 ng/L (dunkelgrau) und für ein Beispiel B mit Mittelwert 1 ng/L und Standardabweichung 0.1 ng/L (hellgrau).

Beispiel A ergibt nach Tab. 9 mit 100%iger Wahrscheinlichkeit die Zustandsklasse "schlecht". Das Beispiel B ergibt trotz geringer Unsicherheit (= kleinere Standardabweichung) eine je 50%ige Wahrscheinlichkeit für die Klassen "mässig" und "unbefriedigend".

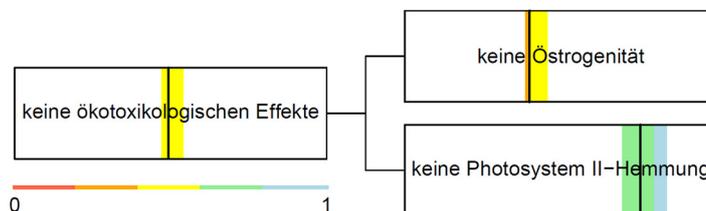


Abb. 19: Grafische Darstellung der Resultate mit Unsicherheit für eine Probe mit 1 ± 0.1 ng EEQ/L und 6 ± 0.5 ng/L DEQ unter Verwendung des kontinuierlichen Bewertungsverfahrens mit Median (schwarze Linie) und 90% Vertrauensintervall (eingefärbte Fläche), hypothetisches Beispiel.