

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

Studie im Auftrag des BAFU, Zusammenfassung des Abschlussberichts

Noch fehlen standardisierte Methoden, um die Gewässerqualität auf der Basis ökotoxikologischer Effekte zu bewerten. Das Oekotoxzentrum hat die Möglichkeiten für eine praxistaugliche Bewertung am Beispiel der Belastung mit östrogen aktiven Substanzen beurteilt – ein erster Schritt zu einem umfassenden Beurteilungskonzept.

Einleitung

In der Schweiz werden im Rahmen des Projektes *Modul-Stufen-Konzept* (MSK) standardisierte Methoden für die Untersuchung und Beurteilung des Zustandes der Fließgewässer erarbeitet. Sie sollen strukturelle und hydrologische, biologische, chemische sowie ökotoxikologische Aspekte der Wasserqualität erfassen. Zusammen mit Vertretern vom Bundesamt für Umwelt (BAFU) und von kantonalen Fachstellen, privaten Laboren und der Forschung werden die vorgeschlagenen Methoden diskutiert und bearbeitet.

Zielsetzung des Moduls Ökotoxikologie ist die Entwicklung eines belastbaren Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von Biotests. Das Konzept soll die Probenahme, die Probenaufbereitung, die Anwendung ausgewählter Biotests und die Beurteilung der Effekte umfassen. Die Biotests sollen sensitiv, wirkungsbasiert, einfach durchführbar, kostengünstig und gut interpretierbar sein.

In einer ersten Studie hat das Oekotoxzentrum exemplarisch östrogene Effekte betrachtet. Diese Stoffgruppe, eine der wichtigsten Gruppen von Umweltschadstoffen, wurde ausgewählt, da sie in Konzentrationen in Oberflächengewässern vorkommt, bei denen Wirkungen auf empfindliche Organismen (z.B. Fische) beobachtet werden konnten (z.B. Vermeirssen et al. 2005). Nach Meinung von Experten aus Behörden, Forschung und Industrie sind östrogene Effekte in schweizerischen Oberflächengewässern relevant (Trachsel 2008). Die niedrigen Wirkkonzentrationen (im unteren ng/L-Bereich) sind für einige der Stoffe auch mit aufwändiger chemischer Spurenanalytik nicht nachweisbar.

Inhalt / Durchführung

In dieser Studie wurden zwei ausgewählte Testsysteme zur Detektion und Quantifizierung von Östrogenität in Wasserproben für eine Anwendung durch Vollzugsbehörden und private Labore evaluiert. Basierend auf diesen Testsystemen wurde ein Erhebungs- und Beurteilungskonzept vorgeschlagen.

Das vorgeschlagene Biotest-basierte Erhebungs- und Beurteilungskonzept beinhaltet drei Schritte (Abb. 1).

In einem ersten Schritt wird die Belastung der Gewässer über den Abwasseranteil abgeschätzt. In einem zweiten Schritt werden Biotests mit dem gereinigten Abwasser durchgeführt und daraus die Belastung im Oberflächengewässer über die Verdünnung abgeschätzt. Danach kann in einem dritten Schritt die Belastung beurteilt werden. Im Rahmen dieser Studie wurde im Frühjahr 2010 eine Messkampagne an 14 schweizerischen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) und angrenzenden Fließgewässern durchgeführt. Diese Resultate dienen als Grundlage für das vorliegende Konzept. Im Weiteren wurden auch Beispiele aus der Literatur betrachtet.

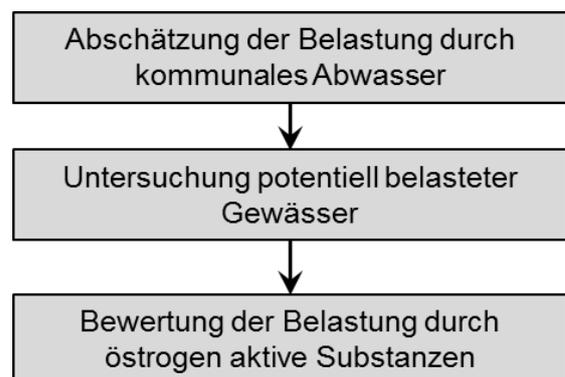


Abb. 1: Überblick über die einzelnen Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzeptes für östrogen aktive Substanzen (verändert nach Götz et al., 2011).



Biotests

Die folgenden zwei *in vitro* Tests, die eine östrogene Aktivität messen, wurden in der Messkampagne eingesetzt:

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

Mit diesen beiden Testsystemen kann, anhand der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol, die östrogene Wirkung einer Umweltprobe als 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration (EEQ) quantifiziert werden. Begleitend zu den Biotests wurden die wichtigsten in kommunalem Abwasser bekannten östrogenen Stoffe (17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, Estron, Bisphenol A und Nonylphenol) mit chemischer Analytik (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie) bestimmt.

Ergebnisse

1. Vergleich Biotestergebnisse mit chemischer Analytik:

Mit chemischer Analytik allein lässt sich die Wasserqualität in Bezug auf eine Belastung mit Östrogenen nicht gesamthaft beurteilen, da die Bestimmungsgrenzen für einige der bekannten Substanzen höher liegen als deren Effektkonzentrationen und zudem möglicherweise nicht alle relevanten Substanzen erfasst werden (siehe Abb. 2).

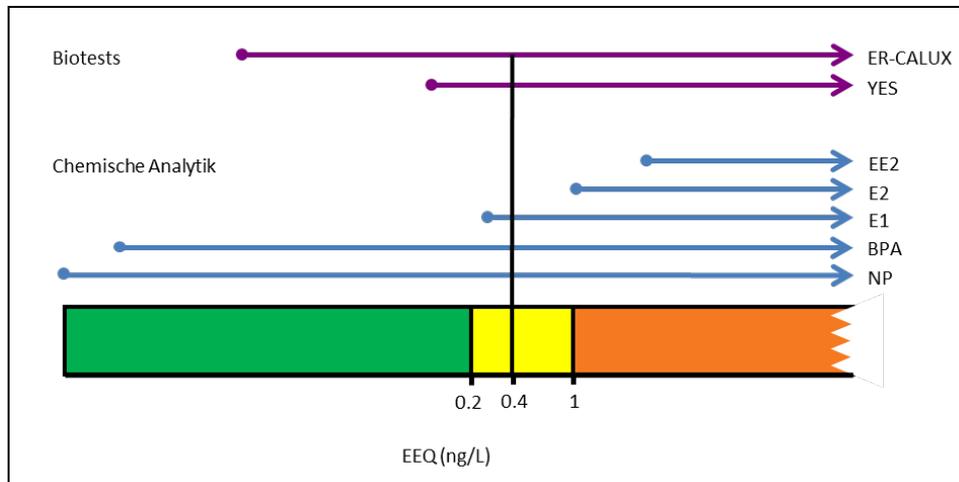


Abb. 2: Verteilung der 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) anhand der 3-skaliigen Wasserqualitätsklassenverteilung von grün (gut) nach orange (unbefriedigend bis schlecht). Pfeile deuten an, in welchem Konzentrationsbereich EEQs aufgrund der Bestimmungsgrenzen (• oder •) der jeweiligen Methodik bestimmt werden können.

2. Vergleich YES und ER-Calux:

Die Ergebnisse der beiden Biotestverfahren ER-CALUX[®] und YES zeigen eine gute Korrelation über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ($r^2 = 0.71$, siehe Abb. 3). Insgesamt liefert der ER-CALUX[®] aber die höheren EEQ als der YES (vergl. 1:1 Linie in Abb. 3).

3. Beurteilung der Wasserqualität:

Die Beurteilung der Wasserqualität bzgl. einer Belastung mit Östrogenen wurde nach dem oben vorgeschlagenen Schema exemplarisch für die angrenzenden Fließgewässer der 14 ARA aus der Messkampagne vom Frühjahr 2010 durchgeführt. Dabei wurden die Fließgewässer vor der Abwassereinleitung durch die entsprechende ARA sowie danach untersucht. Die Beurteilung fällt je nach Biotest unterschiedlich aus und es konnte nicht abschliessend geklärt werden, welche Resultate die tatsächlich

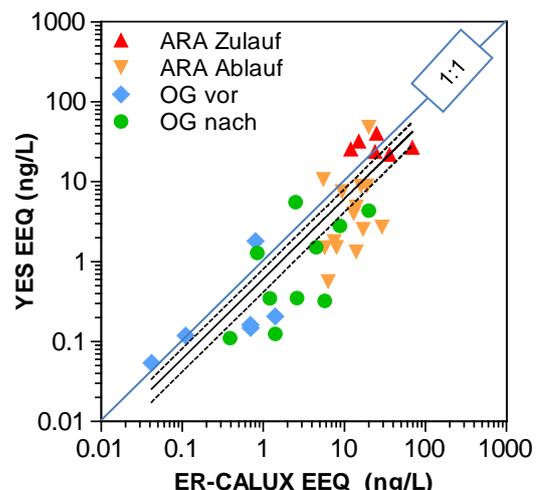


Abb. 3: Korrelation der im YES und ER-CALUX[®] ermittelten EEQ-Werte (ng/L) ($r^2 = 0.71$ (log Daten), $p < 0.0001$). ARA: Abwasserreinigungsanlage, OG: Oberflächengewässer



vorliegende Situation besser beschreiben.

Die östrogene Aktivität nimmt in der Reihenfolge Oberflächengewässer vor ARA < Oberflächengewässer nach ARA < ARA-Ablauf < ARA-Zulauf zu. Dieses Resultat erscheint plausibel. Die gemessenen Werte bestätigen zudem die bisherigen Befunde, dass die östrogene Aktivität in belasteten Gewässern durchaus im relevanten Bereich liegen kann. Die Methoden und deren Interpretation müssen jedoch noch weiter validiert werden.

Biotests für eine Grobbeurteilung geeignet

Als pragmatisches Vorgehen für die Grobbeurteilung abwasserbelasteter Gewässer kann momentan empfohlen werden, die Östrogenität im ARA-Ablauf mit dem YES zu messen und daraus die resultierende Gewässerbelastung über die Verdünnung im Fließgewässer abzuschätzen (Abb. 4). Dies hat insbesondere den Vorteil, dass mit einem vertretbaren Aufwand Sammelproben genommen werden können. Eine solche Grobbeurteilungsmethode liesse sich konzeptuell auch auf weitere Testsysteme zur Messung anderer Effekte ausweiten und würde eine wichtige Ergänzung zu den gängigen im Vollzug verwendeten spurenanalytischen Methoden darstellen. Wichtige Validierungsdaten, wie beispielsweise die Wiederholbarkeit resp. die Variabilität der Biotests, die für die Einschätzung der resultierenden EEQ, der Signifikanz der gefundenen Unterschiede, und der daraus folgenden Beurteilungsklassen unabdingbar sind, sind aber derzeit noch nicht vollumfänglich vorhanden.

In Anlehnung an die Methoden des MSK wird zur Beurteilung der Messwerte exemplarisch ein 3-skaliges System zur Beurteilung der Wasserqualität vorgeschlagen. Für eine erste Beurteilung östrogenen Effekte erscheint aktuell ein 3-skaliges System besser geeignet als das übliche 5-skalige System, das eher zu einer Überinterpretation der Resultate führen könnte. Die EEQ-Werte aus den Biotests werden hierfür mit dem chronischen Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol (aktueller Vorschlag = 0.4 ng/L) verglichen (siehe Tab. 1). Dieses Qualitätskriterium soll empfindliche Organismen vor den Auswirkungen einer langfristigen Belastung mit 17 β -Estradiol schützen.



Abb. 4: Elemente des Vorschlags für ein Beurteilungskonzept für die Belastung von Oberflächengewässern mit östrogen aktiven Substanzen (Grafik: Eawag).

Tab. 1: Vorschlag zur Evaluation der Wasserqualität für östrogen aktive Substanzen aus kommunalem Abwasser (angepasst nach dem Modul „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ (Liechti, 2010) des Modulstufenkonzepts).

EEQ = 17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration, RQ = Risikoquotient = Verhältnis von EEQ zum chronischen Qualitätskriterium für 17 β -Estradiol

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



Der in der Messkampagne durchgeführte YES ist zwar etwa 10fach weniger empfindlich als der ER CALUX[®], weist jedoch eine genügend gute Sensitivität auf um die Einhaltung der vorgeschlagenen Qualitätskriterien zu überprüfen. Der YES würde sich gut für eine Anwendung in kantonalen und privaten Laboratorien eignen: Der Test ist relativ einfach durchzuführen und preiswert.

Oberflächenwasserproben sind in der Regel weniger belastet als ARA-Ablaufproben. Für ihre direkte Beurteilung mit Biotests lassen sich noch keine praxistauglichen Methoden vorschlagen. Die dazu infrage kommenden Testsysteme müssen zunächst noch besser evaluiert werden, bevor sie für einen routinemässigen Einsatz empfohlen werden können.

Weiteres Vorgehen und Folgeprojekte

Die hier aufgezeigten Konzepte und Methoden sind vielversprechend und unsere Ergebnisse zeigen auf, dass mit Biotests grundsätzlich die östrogene Aktivität in abwasserbelasteten Fließgewässern erfasst werden kann und die Sensitivität der vorgestellten Biotests für die Überprüfung der aktuellen Vorschläge für Qualitätskriterien ausreichend ist.

Es ist jedoch noch eine bessere Validierung der Testsysteme nötig. Hierfür werden in einem Folgeprojekt unter anderem Arbeiten zu Variabilität und Wiederfindung von Standardsubstanzen bei Probenaufbereitung und Biotests durchgeführt. Dabei sollen auch weitere Verfahren identifiziert werden, die bei einer direkten Anwendung in Oberflächengewässern tiefere Bestimmungsgrenzen liefern, z.B. ein optimiertes YES-Verfahren mit höherer Sensitivität.

Im Verlauf der nächsten Jahre soll ein erweitertes Konzept zur ökotoxikologischen Grobbeurteilung der Wasserqualität in abwasserbelasteten Gewässern anhand von Biotests konkretisiert werden. Es soll geprüft werden, welche Biotestmethoden dafür geeignet sind. In diesem Grobkonzept werden unter anderem die hier vorgestellten Verfahren unter Berücksichtigung aktueller Validierungsdaten reevaluiert. Bereits laufende Arbeiten mit dem Ziel der internationalen Standardisierung von Biotests zur Messung östrogenen Effekte und von Argentoxizität sollen weiter vorangetrieben werden.

Der Projektbericht kann bei Cornelia Kienle bezogen werden.

Kontakt: Cornelia Kienle, cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch

Bericht

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

Referenzen

- Götz CW, Kase R, Hollender J, 2011. Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU: Eawag, Dübendorf. p. 108.
- Liechti P, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Chemisch-Physikalische Erhebungen, Nährstoffe. Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. p. 44.
- Trachsel M, 2008. Nationales Forschungsprogramm 50 - „Hormonaktive Stoffe“. Konsensplattform „Hormonaktive Stoffe in Abwasser und Gewässern“ - Schlussdokument. p. 15.
- Vermeirssen ELM., Burki R, Joris C, Peter A, Segner H, Suter MJF, Burkhardt-Holm P (2005): Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2226–2232.