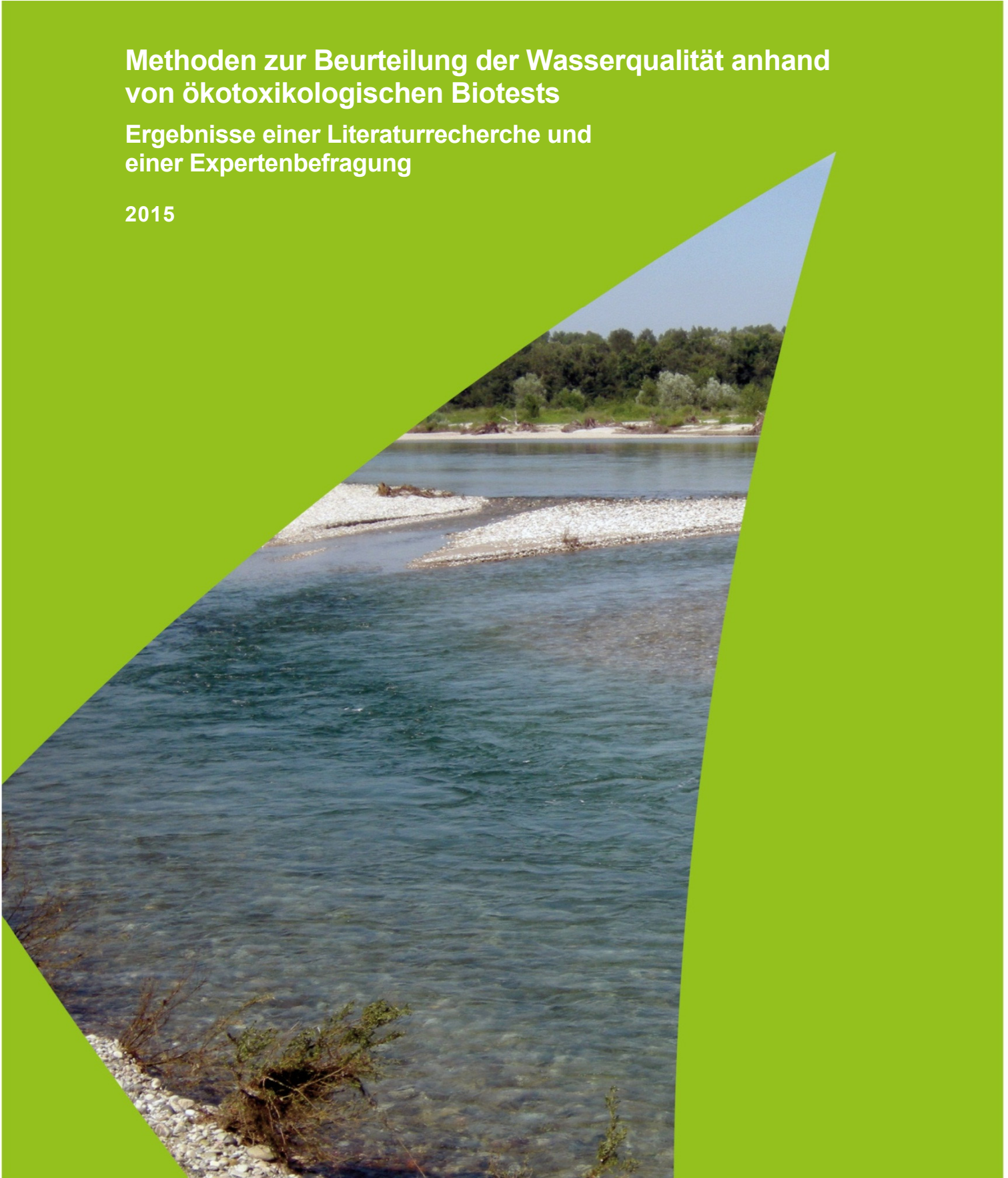




# Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests

Ergebnisse einer Literaturrecherche und  
einer Expertenbefragung

2015



## 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, Roger Gauch, Etienne  
Vermeirssen und Inge Werner

Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte  
Ökotoxikologie Eawag-EPFL

### Fachliche Begleitung

Andreas Häner

BMG Engineering AG

### Danksagung

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

Teilnehmer des  
Expertenworkshops und der  
Expertenbefragung

Mayumi Allison (University of Melbourne, AU), Patrick Balaguer (Université de Montpellier, FR), Ludek Bláha (RECETOX, CZ), Frank Brauer (Umweltbundesamt, D), Marjorie Brooks (University of California, USA), Sebastian Buchinger (BfG, D), Mario Carere (ISS, IT), Carmen Casado-Martinez (Oekotoxzentrum Eawag-EPFL, CH), Margie Koster (Amt für Umwelt, Kt. Thurgau, CH), Elke Dopp (Universität Duisburg, D), Beate Escher (University of Queensland, AUS), Jeanne Garric (IRSTEA, F), Stefan Gartiser (Hydrotox, D), Monika Hammers-Wirtz (Gaiac, D), Andreas Häner (BMG Engineering, CH), Henner Hollert (RWTH Aachen, D), Barbara Känel (AWEL, CH), Robert Kase (Oekotoxzentrum Eawag-EPFL), Hans-Toni Ratte (ToxRat, D), Ralf Bernhard Schäfer (Universität Koblenz-Landau, D), Frans Schulting (Global Water Research Coalition, AUS), Daniel Schlenk (UCR, USA), Helmut Segner (Universität Bern, CH), Louis Tremblay (Cawthron University, NZ), Rita Triebkorn (Universität Tübingen, D), Sara Valsecchi (ISS, IT), Ron van der Oost (Waternet, NL), Brigitte von Danwitz (LANUV, DE), Martin Wagner (Universität Frankfurt, D)

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

Schweizerisches Zentrum für  
angewandte Ökotoxikologie  
Eawag-EPFL

Carmen Casado-Martinez, Robert Kase, Anke Schäfer

## **Hinweis**

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

## **Kontakt**

Cornelia Kienle: [cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch](mailto:cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch)

## **Zitiervorschlag**

Kienle, C., Gauch, R., Vermeirssen, E., Werner, I. 2015. Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests: Ergebnisse einer Literaturrecherche und einer Expertenbefragung. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.

## **Titelfoto: Andri Bryner**

**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](mailto:info@oekotoxzentrum.ch) | [www.oekotoxzentrum.ch](http://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](mailto:info@centreecotox.ch) | [www.centreecotox.ch](http://www.centreecotox.ch)





## Zusammenfassung

Um die Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests beurteilen zu können, werden empfindliche, robuste, standardisierte und möglichst kosteneffiziente Biotests benötigt. Zur Auswahl dafür geeigneter Biotests wurden im Rahmen der Arbeiten zu einem Modul Ökotoxikologie im Schweizerischen Modul-Stufen-Konzept eine Literaturrecherche, eine Expertenbefragung und ein Expertenworkshop durchgeführt. Ziel der Arbeiten war die Identifizierung der relevantesten biologischen Wirkmechanismen von Umweltschadstoffen und von Biotests, mit denen diese Effekte gemessen werden können. Der vorliegende Bericht fasst die Ergebnisse zusammen, empfiehlt Biotests, welche für eine Beurteilung der Wasserqualität geeignet sind, und zeigt den Handlungsbedarf auf.

Ergebnisse der Literaturrecherche belegen, dass bisher in der Regulatorik vor allem *in vivo*-Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität verwendet werden. Die Anwendung von *in vitro*-Biotests zur Ermittlung spezifischer Effekte ist limitiert. Einzig ein *in vitro*-Biotest zur Bestimmung von Gentoxizität ist in der Gesetzgebung in Deutschland verankert, und ein *in vitro*-Biotest zur Messung östrogenen Aktivität wird in Schweden eingesetzt. In der Forschung werden eine Vielzahl von *in vitro*-, *in vivo*- und *in situ*-Biotests für die Beurteilung von Abwasser und Oberflächengewässern eingesetzt.

In der Expertenbefragung wurden relevante Wirkmechanismen ermittelt und die vielversprechendsten Biotests identifiziert. Die Anzahl der als relevant eingestufteten Wirkmechanismen und Biotests nahm mit zunehmender trophischer Ebene (Ernährungsstufe) zu. Für Pflanzen wurden nur zwei Wirkmechanismen und sechs verschiedene Biotests vorgeschlagen, wohingegen für Wirbeltiere 10 Wirkmechanismen mit 45 verschiedenen Biotests zur Erfassung der Effekte aufgeführt wurden. Folgende Wirkmechanismen wurden genannt (aufgeführt mit abnehmender Priorität): I) Allgemeine Toxizität und Photosynthesehemmung, II) endokrine Wirkungen, III) Gentoxizität und Mutagenität, IV) Neurotoxizität, V) dioxin-ähnliche Wirkung, sowie VI) Immuntoxizität und oxidativer Stress.

Im Expertenworkshop wurde die Eignung von relevanten Biotests für die Praxis und Regulatorik diskutiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst:

**Allgemeine Toxizität und herbizide Effekte:** Zu diesen Wirkmechanismen sind geeignete Tests verfügbar: Der standardisierte Algen-Wachstumshemmtest ebenso wie der Algen-Photosynthese-Hemmtest.

**Endokrine Wirkungen:** Hier wurde vor allem die östrogene Wirkung priorisiert. Diese kann mit *in vitro*-Biotests, wie dem Hefezellöstrogentest (Yeast Estrogen Screen) und Tests mit menschlichen Zelllinien gemessen werden. Der Vitellogeningehalt in Fischen ist geeignet als Biomarker für östrogene Effekte.

**Gentoxizität und Mutagenität:** Hier wurden grösstenteils bereits standardisierte Tests wie der Ames-Fluktuationstest und der Mikrokern-Test als geeignet erachtet, wobei der Erste als Screening-Methode, und der Zweite für ein vertieftes Umweltmonitoring dienen sollte.

**Neurotoxizität:** Gegenwärtig gibt es nur einen bewährten und standardisierten Biotest zur Messung einer neurotoxischen Wirkung, den Acetylcholinesterase-Enzymhemmtest. Dieser zeigt jedoch ausschliesslich die Wirkung von Organosphosphat- und Carbamat-Insektiziden an. Verhaltenstests mit Fischen oder Krebstieren sind zwar höchst relevant, aber noch im Entwicklungsstadium. Die Messung der Genexpression wurde ebenfalls als vielversprechender Endpunkt angesehen. Auch hier besteht noch Forschungsbedarf.

**Dioxin-ähnliche Wirkung:** Zur Erfassung dieser Wirkung wurden zwei geeignete Tests identifiziert, die die Aktivierung des Arylhydrocarbon (Ah)-Rezeptors messen: Tests mit H4IIE-Zellen ebenso wie ein Test zur Messung der Enzymaktivität von Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in Fischen oder Fischzelllinien. Auch hier können Tests mit H4IIE-Zellen für ein Screening herangezogen werden, wohingegen die EROD-Messung in Fischen mehr für das Umweltmonitoring geeignet ist.

**Immuntoxizität und oxidativer Stress:** Zur Erfassung von Immuntoxizität gibt es keine geeigneten Tests für die Routineanwendung. Obwohl einige vielversprechende Untersuchungsmethoden identifiziert wurden, wie z.B. der *disease challenge* Test oder immunpathologische Untersuchungen mit



Fischen, sind diese gegenwärtig nur in Forschungsprojekten anwendbar. Einzelne Tests zur Erfassung von oxidativem Stress sind verfügbar.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse von Expertenbefragung und -workshop, dass die Methoden, je nach Wirkmechanismus und zugehörigen Biotests, unterschiedlich weit entwickelt sind. Insbesondere zur Erfassung von Neurotoxizität und Immuntoxizität besteht noch Entwicklungs- und Forschungsbedarf. Für eine Anwendung im routinemässigen Monitoring von Oberflächengewässern sind daher Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität und herbiziden Wirkungen, ebenso wie für die Erfassung endokriner Effekte und von Genotoxizität / Mutagenität am besten geeignet. Biotests zur Messung von dioxin-ähnlichen Effekten und teilweise auch Neurotoxizität könnten in näherer Zukunft einbezogen werden.



## Summary

The assessment of water quality based on ecotoxicological bioassays requires the availability of sensitive, robust, standardized and preferably cost-effective methods. As part of the module ecotoxicology within the framework of the Swiss modular stepwise procedure, we conducted an extensive literature search, consulted a group of experts and conducted an expert workshop to identify bioassays with such characteristics. Our aim was the identification of the most relevant biological modes of action of environmental pollutants, and of bioassays to measure such effects. This report summarizes the results and provides recommendations for those bioassays well suited to evaluate water quality, but also shows where further action is required.

The literature search showed that, so far, mainly *in vivo* bioassays have been applied in regulation for the assessment of general toxicity. Application of *in vitro* bioassays to detect specific effects is scarce. Only one *in vitro* bioassay for the detection of genotoxicity has been included in the German legislation. In Sweden, an *in vitro* bioassay to detect estrogenic activity is used. In contrast, a multitude of *in vitro*, *in vivo*, and *in situ* bioassays are used in research to evaluate wastewater effluents or surface waters.

During the expert consultation, relevant mode of actions and the most promising bioassays were identified. The number of modes of toxic actions and bioassays to measure the corresponding effects which were considered relevant by the experts, increased with the trophic level, i.e. more tools are available for fish than for invertebrates or plants. For plants, only two modes of action and six different bioassays were recommended, whereas for vertebrates 10 modes of action with 45 different bioassays were listed. The following modes of action were most relevant (listed in order of decreasing priority): I) General toxicity and inhibition of photosynthesis, II) endocrine disruption, III) genotoxicity and mutagenicity, IV) neurotoxicity, V) dioxin-like effects as well as VI) immunotoxicity and oxidative stress.

During the expert workshop, the suitability of relevant bioassays for practical application and regulation was discussed. The results are summarized below:

**General toxicity and herbicidal effects:** For these modes of action appropriate assays are available – the standardized algal growth assay as well as the algae photosynthesis inhibition assay.

**Endocrine disruption:** Here estrogenic effects were prioritized. They can be measured in *in vitro* bioassays like the Yeast Estrogen Screen or assays with human cell lines. The vitellogenin concentration in fish is suitable as a biomarker for estrogenic effects.

**Genotoxicity and mutagenicity:** Already standardized assays like the Ames fluctuation or the micronucleus assay were considered most suitable. The first should be applied as a screening method, whereas the second one is recommended for more in depth monitoring applications.

**Neurotoxicity:** Currently, only one approved and standardized bioassay is available for measuring neurotoxic effects, the acetylcholine esterase inhibition assay. However, this assay can only detect effects of organophosphate and carbamate insecticides. Behavioral tests with fish or crustaceans are highly relevant, but most are still under development. The measurement of gene expression was regarded as promising, but here, as well, additional research is needed.

**Dioxin-like effects:** To evaluate this mode of action two relevant assays were identified, both measuring the activation of the arylhydrocarbon (Ah)-receptor: assays with H4IIE cells as well as an assay to measure activity of the enzyme Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish or fish cell lines. The assay with H4IIE cells is recommended as a screening tool, whereas the EROD assay in fish is considered more suitable for monitoring purposes.

**Immunotoxicity and oxidative stress:** No appropriate assays to detect immunotoxicity exist for routine application. Although several promising methods were identified, such as the disease challenge test or immunopathological evaluations with fish, these methods are currently only applicable in research projects. Several tests to detect oxidative stress are available.



Overall, the results of the expert consultation and workshop showed that suitable methods for monitoring toxic effects are developed to different extents depending on the mode of action and the associated bioassay. Further research and method development will be needed, in particular for the measurement of neurotoxic and immunotoxic effects. So far, bioassays assessing general toxicity or herbicidal effects, as well as endocrine or genotoxic/mutagenic effects are available for the routine assessment of surface water quality. Bioassays to measure dioxin-like effects and neurotoxic effects could become available for routine monitoring in the near future.





## Resumé

Pour pouvoir apprécier la qualité de l'eau à l'aide de bioessais écotoxicologiques, les évaluateurs doivent disposer de tests sensibles, robustes, standardisés et abordables. Afin d'opérer la sélection nécessaire, une étude basée sur une recherche bibliographique, des entretiens avec les experts et un workshop a été réalisée dans le cadre de l'élaboration d'un module écotoxicologie pour le système modulaire gradué Suisse. L'objectif de ces travaux était d'identifier les mécanismes d'action biologique des polluants devant être pris en compte et les bioessais permettant de mesurer les effets correspondants. Le présent rapport fait la synthèse des résultats, indique les bioessais pouvant être recommandés pour l'appréciation de la qualité de l'eau et met en évidence les besoins de recherche dans ce domaine.

L'étude bibliographique a montré que, dans le domaine normatif et réglementaire, les bioessais utilisés jusqu'à présent pour évaluer la toxicité générale étaient principalement de type *in vivo*. Les tests *in vitro* spécifiques de certains effets intervenant assez peu. Les seuls à apparaître au niveau législatif sont un essai biologique *in vitro* de génotoxicité en Allemagne et un essai mesurant les effets œstrogènes en Suède. Dans la recherche, en revanche, de nombreux essais *in vitro*, *in vivo* et *in situ* sont employés pour étudier les effluents et les eaux de surface.

Les entretiens avec les experts ont permis d'identifier les mécanismes d'action les plus importants et les bioessais les plus prometteurs. Le nombre de mécanismes d'action et de bioessais retenus était d'autant plus important que le niveau trophique était élevé. Pour les végétaux, seuls deux mécanismes d'action et six bioessais ont été proposés alors qu'ils étaient respectivement à 10 et 45 dans le cas des vertébrés. Les mécanismes d'action suivants ont été retenus (par ordre de priorité) : I) toxicité générale et inhibition de la photosynthèse, II) perturbations endocriniennes, III) génotoxicité et effets mutagènes, IV) neurotoxicité, V) effet de type dioxine et VI) immunotoxicité et stress oxydatif.

Au cours du workshop, les qualités des bioessais pour les applications pratiques et les textes réglementaires ont été évaluées. Les résultats de cette analyse sont résumés ci-dessous :

**Toxicité générale et effets herbicides** : Des essais adéquats sont disponibles pour ces mécanismes d'action : le test standardisé d'inhibition de la croissance algale et le test d'inhibition de la photosynthèse algale.

**Perturbations endocriniennes** : La priorité a été donnée aux effets œstrogènes. Ceux-ci peuvent être mis en évidence grâce à des bioessais *in vitro*, comme le test sur levure (test YES, Yeast Estrogen Screen) et des essais sur lignées cellulaires humaines. Le taux de vitellogénine chez les poissons est également un bon biomarqueur des effets œstrogènes.

**Génotoxicité et effets mutagènes** : Des tests en partie déjà standardisés ont été jugés adéquats, notamment le test de fluctuation d'Ames et le test du micronucléus, le premier devant plutôt être utilisé en screening et le second dans le cadre d'un monitoring environnemental plus poussé.

**Neurotoxicité** : A l'heure actuelle, le seul essai biologique standardisé ayant prouvé son efficacité pour mesurer les effets neurotoxiques est le test d'inhibition de l'acétylcholine estérase. Il est cependant spécifique des insecticides de type organophosphoré et carbamate. Les essais de comportement avec les poissons ou les crustacés sont très pertinents mais se trouvent encore en phase expérimentale. La mesure de l'expression génique a également été jugée très intéressante mais, à nouveau, un certain travail de recherche doit encore être fourni avant qu'une utilisation soit envisageable.

**Effets de type dioxine** : Deux types de tests permettant de détecter ces effets en mesurant l'activation du récepteur des hydrocarbures aromatiques (récepteur Ah) ont été retenus par les experts : les tests sur cellules H4IIE d'une part et le test mesurant l'activité enzymatique de l'éthoxy résorufine-O-dééthylase (EROD) dans les poissons ou les lignées de cellules de poisson. Comme précédemment, les tests sur cellules H4IIE conviennent plutôt au screening et celui sur l'EROD au monitoring.

**Immunotoxicité et stress oxydatif** : Aucun test n'a été retenu pour la mesure de l'immunotoxicité dans les analyses de routine. Bien que certaines méthodes aient été jugées prometteuses, comme par



exemple le test de provocation ou *disease challenge* test ou les études immunopathologiques chez les poissons, elles sont aujourd'hui réservées aux approches de recherche. Certains tests sont cependant disponibles pour la mesure du stress oxydatif.

Dans l'ensemble, les résultats des entretiens et du workshop montrent que les outils diagnostiques sont plus ou moins développés selon les mécanismes d'action et les bioessais correspondants. Les besoins en recherche et développement sont particulièrement importants dans le domaine de la neurotoxicité et de l'immunotoxicité. Pour le contrôle de routine de la qualité des eaux de surface, les bioessais le mieux adaptés sont donc actuellement ceux portant sur la toxicité générale et les effets herbicides, les effets œstrogènes, la génotoxicité et les effets mutagènes. Les mesures des effets de type dioxine et, en partie, de la neurotoxicité pourraient venir s'y ajouter prochainement.



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
Summary .....	iii
Resumé .....	v
1 Einleitung .....	1
1.1 Ausgangslage .....	1
1.2 Ansätze zur Beurteilung der Wasserqualität .....	1
1.3 Ziel dieses Berichtes .....	5
2 Grundlagen für eine Biotest-basierte Untersuchung der Wasserqualität .....	7
2.1 Kriterien für die Auswahl geeigneter Biotests .....	7
2.2 Klassierung von Biotests .....	7
2.3 Auswertung und Interpretation von Biotestdaten .....	9
2.4 Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung .....	10
3 Biotestbasierte Erhebungs- und Beurteilungsmethoden .....	11
3.1 In der Regulatorik verwendete Methoden .....	11
3.2 Vielfach angewendete Biotests und vielversprechende Methoden aus der Forschung ..	21
4 Empfehlung von Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität .....	31
5 Handlungsbedarf für Validierung, Forschung und Entwicklung .....	34
6 Schlussfolgerungen .....	35
7 Referenzen .....	36
8 Glossar .....	52
9 Verzeichnisse .....	54
9.1 Abbildungsverzeichnis .....	54
9.2 Tabellenverzeichnis .....	54
Anhang 1 Informationen zu den Auswahlkriterien .....	55
Anhang 2 Probentransport, -lagerung und -vorbereitung .....	57
Anhang 3 Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests in einzelnen Ländern .....	58
Anhang 4 Überblick über weitere Tests für Abwasser- und Oberflächengewässerproben .....	64
Anhang 5 Überblick über die Beurteilung der Biotests anhand der Auswahlkriterien .....	72





# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangslage

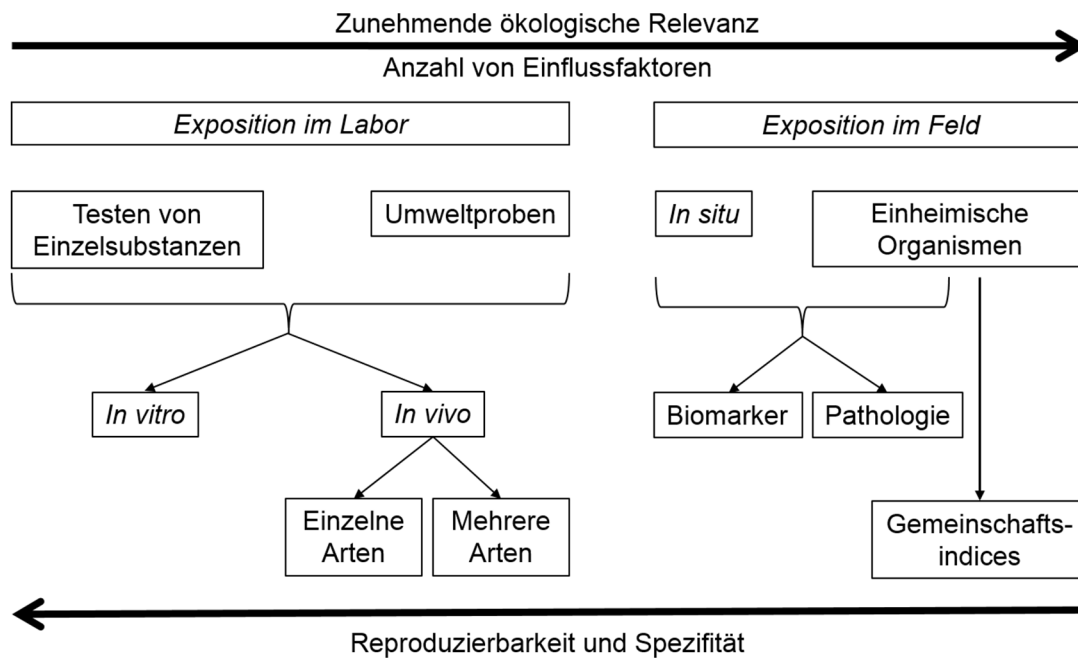
Die Beurteilung der Wasserqualität basiert üblicherweise auf chemischen Analysen und der Effektbeurteilung von Einzelstoffen durch den Vergleich mit Qualitätskriterien [1, 2]. Dieser Ansatz ist jedoch abhängig von der gewählten analytischen Methode und ist zudem limitiert auf bekannte Stoffe, für welche Qualitätskriterien vorhanden sind. Um die Wasserqualität über solche Einzelstoffe hinaus beurteilen zu können, sind integrative Methoden notwendig, wie beispielsweise Biotests. Diese geben Auskunft über die allgemeine Toxizität des Abwassers oder über spezifische Wirkungen von bestimmten Stoffgruppen, wie z.B. hormonähnliche oder herbizide Wirkungen oder Neurotoxizität. Dadurch ist eine Beurteilung der Mischungstoxizität von Chemikalien möglich. Im Wasser vorhandene Einzelstoffe können damit jedoch meist nicht identifiziert werden. Biotests sind besonders wichtig, um die Auswirkungen von Stoffgruppen mit sehr tiefen wirkungsbasierten chronischen Qualitätskriterien (CQK, auch Environmental Quality Standards, EQS) zu erfassen, die nicht oder nur schwer mit chemischer Analytik bestimmt werden können, wie beispielsweise östrogen-aktive Stoffe.

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 [3]. Verschiedene Biotests wurden im Rahmen der Arbeiten für ein Modul Ökotoxikologie des Projektes Modul-Stufen-Konzept (MSK) des BAFU begutachtet, durchgeführt oder entwickelt [4-6]. Es hat sich gezeigt, dass für eine Anwendung in der Praxis in erster Linie gewisse *in vitro*-Testverfahren in Frage kommen. Solche Testverfahren müssen vergleichsweise einfach und kostengünstig anzuwenden sein und robuste, wiederholbare und interpretierbare Ergebnisse liefern.

## 1.2 Ansätze zur Beurteilung der Wasserqualität

### 1.2.1 Biotests

Biotests sind *Analysemethoden, die lebende Zellen, Organismen oder Gemeinschaften in definierter Art und Anzahl einsetzen, um deren Reaktion auf eine Exposition zu messen* [7]. Mit Biotests können Effekte auf verschiedene biologische Organisationsebenen untersucht werden: von der Molekül- und Zellebene, über Gewebe und Organe bis hin zu Individuen, Populationen und Lebensgemeinschaften. Je nach dem Ziel einer Untersuchung können die Biotests entweder im Labor unter standardisierten Bedingungen oder – wenn der Fokus mehr auf ökologischer Relevanz liegt – im Feld durchgeführt werden. Im Labor können einzellige Systeme (*in vitro*), Organismen (*in vivo*) oder (einfache) Lebensgemeinschaften (Mikro- und Mesokosmen) untersucht werden. *In vivo*-Biotests werden häufig komplementär mit Organismen verschiedener trophischer Ebenen durchgeführt, wie z.B. mit Algen (Primärproduzenten), Wasserflöhen (Primärkonsumenten) und Fischen (Sekundärkonsumenten). Im Feld werden *in situ*-Versuche durchgeführt, die Gesundheit von einheimischen Organismen anhand von Biomarkern (d.h. molekulare, biochemische, zelluläre und/oder physiologische Veränderungen im Organismus) erfasst und Veränderungen von Geweben oder Organen (histo-)pathologisch untersucht. Auf Ebene der Lebensgemeinschaft können Gemeinschaftsindizes wertvolle Informationen über Effekte liefern [8]. Abb. 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen biologischen Ansätze.



**Abb. 1: Überblick über verschiedene biologische Ansätze zur Messung der Toxizität von Chemikalien und ihren Effekten in der aquatischen Umwelt (nach [8]).**

Mit zunehmender ökologischer Relevanz nehmen Reproduzierbarkeit und Spezifität der Ansätze ab und damit auch die Eignung für eine Standardisierung der Methoden.

Im Gegensatz zur chemischen Analytik, bei der die *Konzentrationen einzelner Stoffe* ermittelt werden, können mit Biotests die *Auswirkungen von Stoffmischungen* untersucht werden. Je nach Empfindlichkeit des eingesetzten Testorganismus und des gemessenen Endpunkts reagieren Biotests dabei unterschiedlich gut auf verschiedene Stoffgemische. Der Einsatz der verschiedenen Tests ist abhängig von der Fragestellung:

- *In vitro*-Biotests, die auf der Erfassung spezifischer zellulärer Mechanismen beruhen und häufig mit einer Probenaufkonzentrierung kombiniert werden, ermöglichen eine sehr empfindliche Bestimmung der Wirkung bestimmter Stoffklassen mit einem gemeinsamen Wirkmechanismus, beispielsweise östrogen- oder herbizid-wirksame Stoffe.
- *In vivo*-Biotests erfassen Effekte auf Organismen und werden in der Regel mit nativen, nicht aufkonzentrierten Wasserproben durchgeführt. Aus diesen Tests können Schlussfolgerungen über biologische und mögliche ökologische Effekte wie Wachstum, Fortpflanzung und Sterblichkeit gezogen werden.
- *In situ*-Biotests erfassen Effekte auf Organismen direkt im Ökosystem. Hierdurch wird eine hohe ökologische Relevanz gewährleistet.

Alle diese Biotests können zur Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt werden. Hierbei sollte die Auswahl der Tests auf das Ziel der Untersuchung abgestützt werden. Sollen spezifische Stoffklassen wie z.B. östrogen-aktive Stoffe erfasst werden, sind *in vitro*-Biotests geeignet. Für eine integrative Untersuchung von Effekten von Wasserproben auf ganze Organismen im Labor sind *in vivo*-Biotests die Methode der Wahl, und soll schliesslich die Wasserqualität unter möglichst realistischen Bedingungen im Gewässer beurteilt werden, bieten sich *in situ*-Biotests an. Bei der Testauswahl ist zu berücksichtigen, dass der finanzielle und personelle Aufwand von den *in vitro*-Biotests bis hin zu *in situ*-Tests deutlich ansteigt.

Die Variabilität des Biotest-basierten Ansatzes setzt sich aus folgenden Faktoren zusammen:



- **Variabilität der Exposition:** Je nach Probenahmestelle und/oder Stoffklasse kann die Exposition kontinuierlich (z.B. ARA-Abwasser), semi-kontinuierlich (z.B. Staustufe), oder pulsartig (z.B. bei diffusen Quellen aus der Landwirtschaft) verlaufen.
- **Variabilität der Umweltprobe:** Hier spielen die Art der Probenahme (Stichprobe vs. Sammelprobe), der Probentransport und auch die Probenaufbereitung eine Rolle. Diese Faktoren machen oft den grössten Teil der Unsicherheit/Variabilität einer Methode aus.
- **Variabilität der Probenaufbereitung:** Je nach Materialien und Kartuschen, die für die Probenvorbehandlung (Filtration und Festphasenextraktion) verwendet werden, kann hier eine Veränderung in der Zusammensetzung der filtrierten und/oder extrahierten Wasserprobe auftreten.
- **Variabilität des Testsystems selbst:** Hier spielen Sensitivitätsunterschiede zwischen Arten, ebenso wie der allgemeine Gesundheitszustand der Testorganismen eine Rolle. Zudem können Unterschiede in der Testdurchführung durch verschiedene Personen bzw. in verschiedenen Laboren eine wichtige Rolle spielen.

Neben dem Biotest-basierten Ansatz gibt es noch weitere Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### 1.2.2 Chemikalien-basierter Ansatz zur Beurteilung der Wasserqualität mit Umweltqualitätskriterien

Zur Beurteilung der Wasserqualität anhand chemisch-analytischer Messdaten werden in vielen Ländern Umweltqualitätskriterien eingesetzt. Darunter versteht man in der Europäischen Union (EU) wirkungsbasierte (d.h. auf ökotoxikologischen Effektdaten basierte) numerische Anforderungen an die Wasserqualität für Einzelstoffe nach EU-Wasserrahmenrichtlinie [9]. Dieser Ansatz wird in der EU angewendet [10]. Für die Schweiz existieren Empfehlungen für die Anwendung von Umweltqualitätskriterien zur Beurteilung der Wasserqualität [1, 2]. Tab. 1 gibt einen Überblick über die Möglichkeiten und Beschränkungen von Biotest-basierten und Chemikalien-basierten Ansätzen.

**Tab. 1: Vergleich von Möglichkeiten und Grenzen von Biotests im Vergleich zu chemischer Analytik (angepasst nach [11]).**

	Biotests	Chemische Analytik
<b>Einzelchemikalien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Bestimmung von Einzelchemikalien möglich</li> <li>+ Selektiv für spezifische Endpunkte</li> <li>+ Bestimmung von Chemikalien mit dem gleichen Wirkmechanismus möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bestimmung von Einzelchemikalien</li> </ul>
<b>Mischungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bestimmung von Mischungseffekten aller vorhandenen bioaktiven Chemikalien möglich</li> <li>± Keine Unterscheidung von additiven und interaktiven Wirkungen möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bestimmung interaktiver Mischungseffekte nur für messbare Substanzen und mit Modellen möglich</li> </ul>
<b>Gesamtbelastung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Erfassung der Gesamtbelastung mit bioaktiven Chemikalien durch unspezifische Endpunkte und mehrere Testarten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gesamtbelastung mit Chemikalien nicht bekannt</li> </ul>
<b>Sensitivität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>± Oft weniger sensitiv als chemische Analytik für Einzelchemikalien, aber empfindliche Erfassung der Gesamtheit aller Einzelchemikalien mit einem spezifischen Wirkmechanismus möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In „sauberen“ Wasserproben fallen einzelne Stoffe unter das Detektionslimit, sie können aber dennoch zur Mischungstoxizität beitragen und teilweise zu Effekten führen.</li> </ul>
<b>Transformationsprodukte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>± Berücksichtigung von Transformationsprodukten durch Messung von Mischungstoxizität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifikation von Transformationsprodukten nötig bevor Quantifizierung möglich ist</li> </ul>



Die obige Tabelle zeigt, bei welchen Aspekten Biotests eine gute Ergänzung des chemisch-analytischen Ansatzes darstellen. Im Folgenden werden noch einige zusätzliche Aspekte aufgeführt:

Für die Ableitung von Umweltqualitätskriterien werden die empfindlichsten bekannten Arten herangezogen. Hierfür werden alle vorhandenen Toxizitätsdaten für einen Stoff berücksichtigt. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass meist nicht alle, möglicherweise für Effekte verantwortliche, Chemikalien bekannt und messbar sind. Einige Chemikalien können bereits in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze der chemischen Analytik biologische Effekte auslösen (z.B. Ethinylestradiol, Pyrethroide). Diese werden bei einer Chemikalien-basierten Beurteilung der Wasserqualität nicht erfasst. Derzeit wird daher die Anwendung von *in vitro*-Biotests zur Erfassung von Östrogenen im Rahmen des Monitorings für die Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union diskutiert [12].

### **1.2.3 Biologische Beurteilung der Wasserqualität anhand von Lebensgemeinschaften im Freiland (Bioassessment) (z.B. Saprobienindex, SPEAR-Index, Methoden Modul-Stufen-Konzept)**

In der sogenannten biologischen Beurteilung der Wasserqualität wird eine mögliche Belastung anhand verschiedener Parameter direkt im Ökosystem untersucht. Häufig untersuchte Parameter u.a. auch im Rahmen des Modul-Stufen-Konzepts [13] sind die Artenzusammensetzungen der Lebensgemeinschaften von Kieselalgen (Diatomeen) [14], Wasserwirbellosen (Makrozoobenthos) [15], höheren Wasserpflanzen (Makrophyten) [16] und Fischen [17]. Der chemische (v.a. auf Nährstoffe bezogene) Zustand der Fließgewässer wird mit Hilfe des Moduls „Chemisch-physikalische Erhebungen, Nährstoffe“ bestimmt [18]. Als Ergänzung zu den gewässerchemischen Untersuchungen ermöglicht die Zusammensetzung der Kieselalgen-Lebensgemeinschaft ebenfalls Aussagen über die chemische Wasserqualität [14]. Ein weiterer vielsprechender Ansatz, bei dem die Empfindlichkeit der Gewässerlebewesen (Makrozoobenthos) in die Bewertung einbezogen wird, ist der SPEAR (*SPEcies At Risk*)-Ansatz [19]. Bei dieser Methode werden die am Flussgrund lebenden wirbellosen Tiere aufgrund spezifischer Eigenschaften in „gefährdete Arten“ (*Species at Risk*) und „ungefährdete Arten“ (*Species not at Risk*) eingeteilt. Berücksichtigt werden hier ihre Empfindlichkeit gegenüber Pestiziden (vor allem Insektiziden) ihre Generationsdauer, ihre Bewegungsfähigkeit und das Vorhandensein aquatischer Lebensstadien während der Anwendungszeit von Pestiziden [19].

Bei den biologischen Beurteilungsmethoden werden, wie bei den *in situ*-Biotests, Einflüsse verschiedener Stressfaktoren integrativ gemessen. Die Methoden können beeinträchtigte Standorte aufzeigen. Allerdings ist zu beachten, dass keine oder nur begrenzte Rückschlüsse auf schädliche Faktoren möglich sind. Auch ist die Identifizierung einer Beeinträchtigung erst dann möglich, wenn die Schädigung im Ökosystem sichtbar ist; es ist keine Vorhersage möglich. Um eine frühzeitige Erkennung gefährdeter Gewässerabschnitte zu ermöglichen sind daher ökotoxikologische Biotests eine sinnvolle Ergänzung und Erweiterung der bisher verwendeten Methoden in der Gewässerbewertung.





### 1.3 Ziel dieses Berichtes

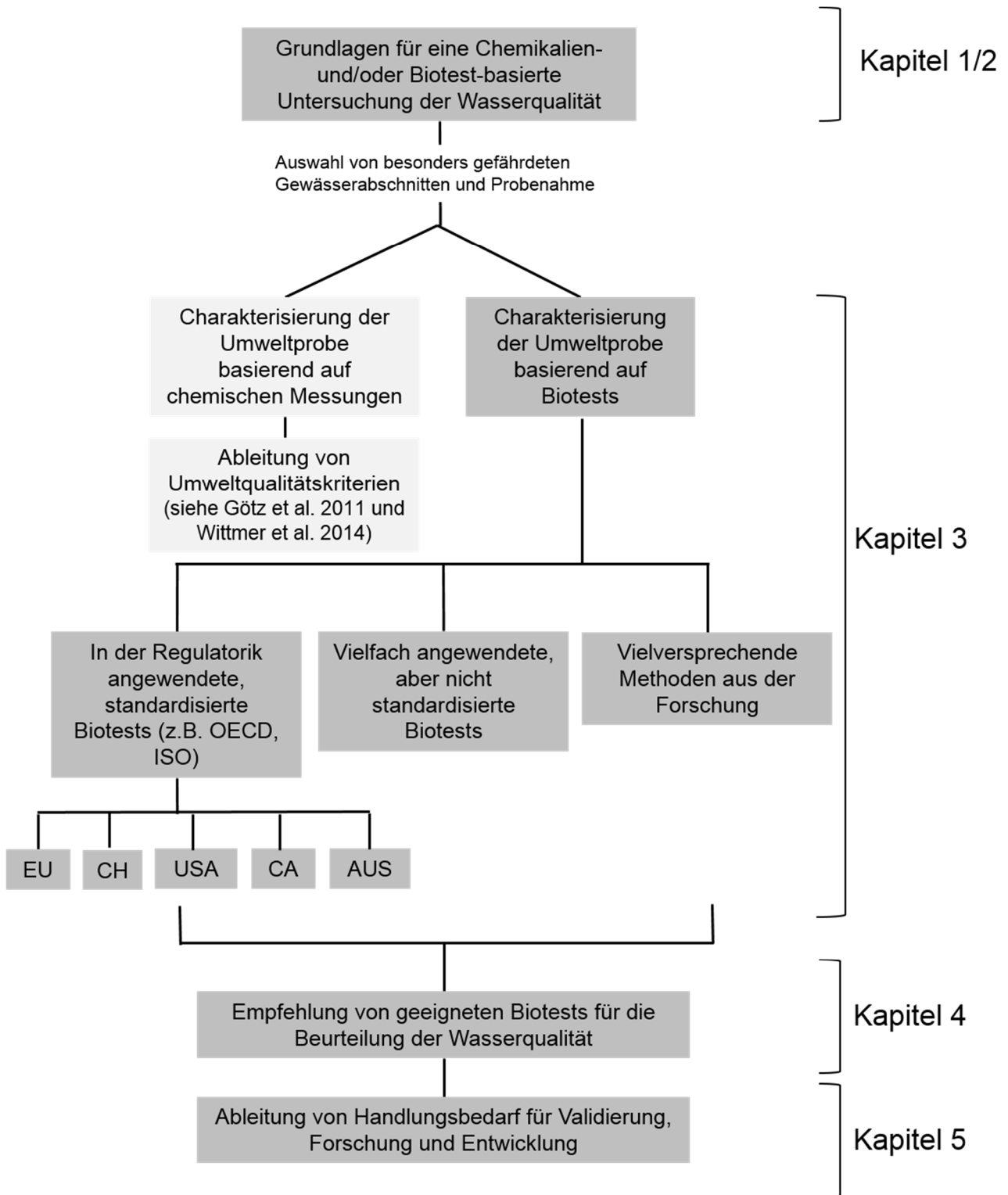
Für die Beurteilung der Wasserqualität ist eine Vielzahl von Biotests verfügbar, die aber derzeit überwiegend in der Forschung eingesetzt werden. Der vorliegende Bericht soll einen Überblick über in der Regulatorik verschiedener Länder angewendete Biotests geben. Des Weiteren soll aufgezeigt werden, welche zusätzlichen geeigneten Biotest-Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität existieren; hierzu zählen:

- Standardisierte Biotests
- Vielfach angewendete aber nicht standardisierte Biotests
- Vielversprechende Methoden aus der Forschung

Im Bericht wird eine Empfehlung geeigneter Methoden für kantonale Gewässerschutzfachstellen, private Labors und weitere Experten aus der Praxis des Gewässerschutzes gegeben. Neben einem Überblick verfügbarer Methoden werden ausgewählte, für die Praxis geeignete, Methoden verglichen. Diese wurden bezüglich ihrer Anwendbarkeit als Messmethoden zur Beurteilung der Wasserqualität miteinander verglichen. Zudem wird grob aufgezeigt, welche dieser Biotests für welche Fragestellungen geeignet sind, welcher Aufwand bei der Anwendung der Methoden anfällt, welche Schwachpunkte und Stärken diese Tests aufweisen und was für Aussagen und Resultate zu erwarten sind. Soweit für das allgemeine Verständnis der Empfehlung notwendig, werden folgende Elemente illustrativ, kurz und allgemeinverständlich zusammengefasst:

- Ergebnisse einer Literaturrecherche, einer Expertenbefragung und eines Expertenworkshops
- Handlungsbedarf für Validierung, Forschung und Entwicklung.

Abb. 2 gibt einen Überblick über Beurteilungsmethoden für Wasserqualität und zeigt auf, in welchen Kapiteln sie behandelt werden.



**Abb. 2: Überblick über Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität und die Struktur des Berichts.**  
Helle Kästen zeigen die Beurteilung einer Umweltprobe basierend auf chemischen Messungen – Dunkle Kästen zeigen das vorgeschlagene Vorgehen für die Beurteilung einer Umweltprobe basierend auf Biotests. Der Fokus des Berichts liegt auf der Beurteilung von Kläranlagenausläufen und Oberflächengewässern basierend auf ökotoxikologischen Biotests.



## 2 Grundlagen für eine Biotest-basierte Untersuchung der Wasserqualität

### 2.1 Kriterien für die Auswahl geeigneter Biotests

Um aus der Vielzahl vorhandener Biotests geeignete Verfahren für die Gewässerbeurteilung auszuwählen, wurden folgende Kriterien definiert:

1. **Anwendbarkeit für Umweltproben**
2. **Empfindlichkeit**
3. **Robustheit**
4. **Grad der Validierung / Standardisierung**
5. **Kosteneffizienz und gute routinemässige Anwendbarkeit**
6. **Anwendbarkeit in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren**

Des Weiteren wurde berücksichtigt:

- **Interpretierbarkeit:** Kann der Test zwischen akzeptablen und inakzeptablen Bedingungen auf eine wissenschaftliche und gerichtsfeste Art und Weise entscheiden?
- **Relevanz:** Kann ein Bezug zu negativen Effekten auf anderen biologischen Organisationsebenen hergestellt werden?
- **Vorausschauende Eigenschaften:** Lässt der Test Rückschlüsse auf Effekte zu, bevor schwere Schädigungen auftreten (Frühwarnsystem)?

In Anhang 1 finden sich weitere Details zu den Beurteilungskriterien und in Anhang 2 Informationen zu Probenahme, Probentransport und Probenlagerung für die Biotests, da dies zentral für die Durchführung der Tests ist.

### 2.2 Klassierung von Biotests

Zur Bestimmung der Wasserqualität können, wie in Kapitel 1 beschrieben, *in vitro*-, *in vivo*- und *in situ*-Testmethoden eingesetzt werden.

***In vitro*-Biotests** basieren auf spezifischen zellulären Mechanismen und messen spezifische Gruppen von Schadstoffen mit gleichen Wirkmechanismen. In diesen Tests werden Zellkulturen, transgene Bakterien oder Hefezellen eingesetzt, um z.B. Veränderungen in der Rezeptoraktivierung oder von Enzymfunktionen zu messen. Hierzu zählen endokrine, genotoxische, oder mutagene Effekte oder eine Hemmung der zellulären Signalübertragung [20]. Dahingegen werden ***Ex vivo***-Biotests mit Gewebe- oder Organkulturen durchgeführt, die aus Organismen isoliert wurden. Die Dauer dieser Tests erstreckt sich in der Regel von wenigen Minuten auf wenige Tage. Häufig werden konzentrierte Proben für die Tests eingesetzt. Die Vorhersagbarkeit von Effekten auf höheren biologischen Ebenen ist aufgrund der gewonnenen Daten begrenzt. Wo entsprechende wissenschaftliche Erkenntnisse vorliegen, kann jedoch eine Verbindung von *in vitro*-Effekten mit schädlichen Auswirkungen auf Populationsebene hergestellt werden. *In vitro*-Biotests für östrogen-aktive Stoffe sind hier ein gutes Beispiel [8].

***In vivo*-Biotests** dienen zur Untersuchung von Schadstoffeffekten auf ganze Organismen. Sie sind häufig validiert und standardisiert und werden mit Testarten verschiedener trophischer Ebenen (Ernährungsstufen) (z.B. Algen, höhere Wasserpflanzen, Wirbellose, und Fische) durchgeführt. Gemessene Parameter sind beispielsweise: Wachstum, Fortpflanzung, Frassaktivität und Sterblichkeit [20]. Standard-Biotests werden häufig mit Modellarten durchgeführt, die leicht zu züchten und zu halten sind, allerdings sind sie womöglich nicht immer repräsentativ für einheimische Arten [8]. Solche Biotests werden in einigen Ländern bereits seit Jahrzehnten zur Untersuchung der Wasserqualität verwendet (z.B. Deutschland, USA). *In vivo*-Biotests erfassen die Wirkung aller Substanzen in einer



Wasserprobe, auf die diese Organismen empfindlich reagieren, können aber keine bzw. nur begrenzt Auskunft über die, für die schädigende Wirkung verantwortliche(n), Stoffklasse(n) geben. Dies kann, u.a. in *In vivo*-Biotests, nur mit Hilfe von weiteren Untersuchungen spezifischer biochemischer Effekte, sogenannten Biomarkern (s.u.), erfolgen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Empfindlichkeit und Dauer der Tests: Wenn z.B. die Auswirkungen von Mikroverunreinigungen zeitnah erfasst werden sollen, sind *in vitro*-Biotests mit aufkonzentrierten Proben häufig empfindlicher und schneller als *in vivo*-Biotests. Je nach Testdauer unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Tests: Akute Tests dauern in der Regel Stunden bis zu wenigen Tagen, chronische Tests von Tagen bis zu mehreren Monaten, je nach Lebenszyklus des Testorganismus. Bei chronischen Tests werden meist sublethale Parameter bestimmt, wie z.B. Schlupf, Nachkommenzahl oder Schwimmverhalten, aber auch Sterblichkeit. Eine Biotestbatterie mit verschiedenen *in vivo*-Biotests beinhaltet häufig Organismen mehrerer trophischer Ebenen, z.B. Algen, Wasserflöhe und Fische. Neben Tests mit einzelnen Arten können auch Tests mit mehreren Arten durchgeführt werden, bei denen dann komplexere Interaktionen, wie z.B. das Räuber-Beute-Verhalten oder Konkurrenz, untersucht werden können.

***In situ*-Biotests** erfassen Effekte auf Organismen direkt im Ökosystem. Es existieren verschiedenste *In situ*-Methoden. Meist werden die Organismen in Käfigen im zu untersuchenden Gewässer ausgebracht [21] oder in Bypässen im Durchfluss gegenüber Flusswasser exponiert [22] und ihre Reaktion auf vorhandene abiotische Umweltfaktoren gemessen. Dazu zählt, neben z.B. Temperatur, pH-Wert, Nährstoffen und Sauerstoffgehalt, auch die Belastung mit Umweltchemikalien. Die Dauer der Tests kann von einer Woche bis zu mehreren Monaten variieren. Hierdurch wird eine hohe ökologische Relevanz gewährleistet. Allerdings ist die Interpretation der Ergebnisse solcher Biotests schwieriger als bei *In vitro*- und *In vivo*-Biotests, da sie nicht unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt werden und die gemessenen Effekte verschiedene Ursachen haben können. Sie sind in der Regel mit einem relativ hohen finanziellen und personellen Aufwand verbunden und schwierig zu standardisieren [8].

**Biomarker** können ebenfalls zur Messung von subletalen Effekten in Organismen dienen. Sie sind definiert als molekulare zelluläre, physiologische oder biochemische Veränderungen im Organismus, die durch äussere Stressfaktoren hervorgerufen werden [23]. Man unterscheidet hier oft zwischen Effekt- und Expositions-Biomarkern. Effekt-Biomarker geben Auskunft über den Gesundheitszustand des Organismus, lassen aber keine Rückschlüsse auf verursachende Faktoren zu. Dahingegen kann mit Expositions-Biomarkern vor allem die verursachende Stoffklasse identifiziert werden. Beispielsweise deutet eine erhöhte Konzentration von Vitellogenin (Vorläufer des weiblichen Eidotterproteins) bei Jungfischen oder männlichen Fischen auf eine Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen hin [20] und erhöhte Konzentrationen von Metallothionein geben einen Hinweis auf eine Belastung mit bioverfügbaren Schwermetallen [24].

**Gemeinschaftsindices** dienen zur Erfassung von Effekten auf Ebene der Lebensgemeinschaft. Sie geben Auskünfte über die Gesundheit des Ökosystems im beprobten Gewässerabschnitt und integrieren alle Effekte die auf die Organismen wirken. Bei *in situ*-Biotests werden eher kurzfristige Effekte gemessen, wohingegen Gemeinschaftsindices langfristige Effekte, die auch über mehrere Organismengenerationen hinweg reichen können, aufzeigen. Beispiele für Gemeinschaftsindices sind der Index biologischer Integrität (IBI) [25] oder der SPEcies At Risk (SPEAR)-Index [19].

Detaillierte Hintergrundinformationen zu den verschiedenen Testmöglichkeiten finden sich in [8].



## 2.3 Auswertung und Interpretation von Biotestdaten

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über häufig angewendete Methoden zur Auswertung und Interpretation von Biotestdaten.

Die in den Biotests gemessenen Parameter wie Rezeptoraktivität, Zellzahl und Zellvitalität werden als Endpunkte bezeichnet. Toxizitätsparameter, die mit Hilfe statistischer oder mathematischer Methoden berechnet werden, dienen dazu, die Toxizität für die jeweiligen Endpunkte auszudrücken. Folgende Toxizitätsparameter können für Biotests mit gängigen Programmen wie Microsoft Excel oder einem Statistikprogramm (z.B. GraphPad Prism) berechnet werden (Abb. 3):

**EC<sub>x</sub>** Die EC<sub>x</sub> ist die Konzentration (oder % der Probe) bei der x% (z.B. 10, 20 oder 50%) des maximal induzierbaren Effekts erreicht werden (z.B. Bindung an den Östrogenrezeptor). Der EC<sub>50</sub> wird eher für akute Tests, der EC<sub>10</sub> für chronische Testendpunkte verwendet. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einer Regressionsanalyse und gibt, zusätzlich zum jeweils abgeleiteten Toxizitätsparameter, ein Konfidenzintervall (i.d.R. 95% Konfidenzintervall) an. Dieses gibt den Konzentrationsbereich wieder, in dem die tatsächliche Konzentration mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt (Abb. 4A).

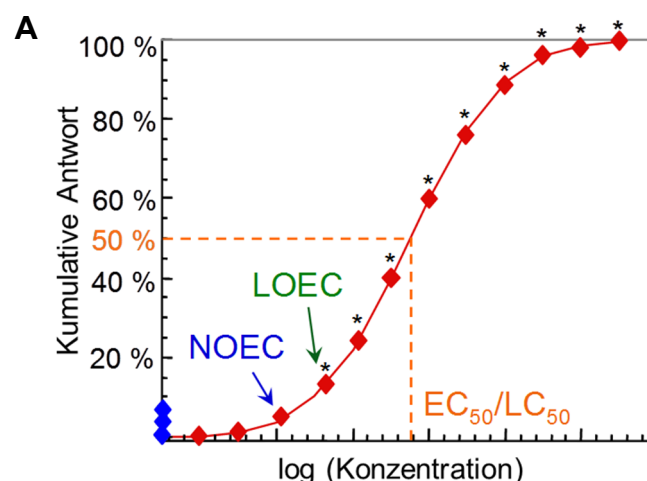
Je niedriger der EC<sub>x</sub>-Wert, d.h. je niedriger die ermittelte Konzentration ist, bei der x% Effekt auftritt, desto toxischer ist die untersuchte Substanz oder Probe.

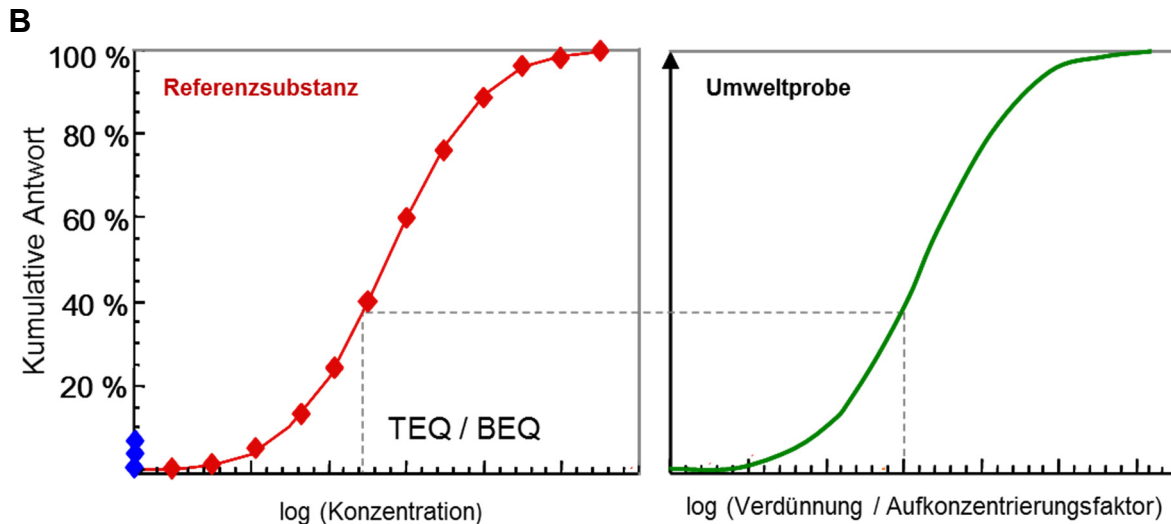
**NOEC** Die NOEC (*No Observed Effect Concentration*) ist die höchste getestete Konzentration, die noch keinen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Dieser Parameter wird vor allem für chronische Testendpunkte verwendet (Abb. 4A).

**LOEC** Die LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) ist die niedrigste getestete Konzentration die einen statistisch signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle hervorruft (Abb. 4A).

**TEQ/BEQ** Die toxische Äquivalenzkonzentration (TEQ) (je nach Testendpunkt auch bioanalytische Äquivalenzkonzentration (BEQ) genannt [26]) ist definiert als jene Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt wie die Umweltprobe hat (z.B. [27]). Die Referenzsubstanzen variieren je nach gemessenem spezifischem Endpunkt. Somit kann eine (toxische) Potenz (oder Toxizitätsmenge) einer Mischung als Konzentration einer Referenzsubstanz ausgedrückt werden (Abb. 4B).

Je höher der TEQ- bzw. BEQ-Wert, desto toxischer ist die untersuchte Probe.





**Abb. 3: Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und  $EC_{50}$ .**

◇ Kontrolle, ◇ Behandlung, \* signifikante Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 3A). Abb. 3B zeigt die Ableitung von Toxizitäts-Äquivalenzkonzentrationen (TEQs) bzw. bioanalytischen Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) durch den Vergleich der Effektkonzentrationen einer Umweltprobe mit jener einer Referenzsubstanz, z.B. 17 $\beta$ -Estradiol. Die TEQ bzw. BEQ ist definiert als jene Konzentration der Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe. NOEC No observed effect concentration, LOEC lowest observed effect concentration, EC Effektkonzentration, LC Letzhale Konzentration.

## 2.4 Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung

Die Durchführung und Auswertung von ökotoxikologischen Biotests ist in der Regel in internationalen Richtlinien festgelegt und wird auf Stufe Labor im Rahmen von Standardarbeitsanweisungen (*Standard Operational Procedure*, SOP) umgesetzt. Eine Standardisierung von Biotests erfolgt durch internationale Standardisierungsorganisationen wie beispielsweise die OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, [www.oecd.org](http://www.oecd.org)) (Biotests zur Chemikaliertestung), die ISO (*International Organisation for Standardisation*, [www.iso.org](http://www.iso.org)) (Biotests zur Untersuchung von Umweltproben), AFNOR (*Association française de normalisation*, [www.afnor.org](http://www.afnor.org)) oder ASTM International (*American Society for Testing and Materials*, [www.astm.org](http://www.astm.org)).

Zur Qualitätssicherung sind in den Richtlinien sogenannte Validitätskriterien definiert, die eingehalten werden müssen, damit ein Test Gültigkeit hat. Übersteigt zum Beispiel die Variabilität in der Kontrolle einen bestimmten Prozentsatz oder tritt bei der Positivkontrolle nicht der erwartete Effekt auf, wird der Test als ungültig gewertet und muss wiederholt werden. Unter Positivkontrollen versteht man die Untersuchung von definierten Referenzsubstanzen von denen der Effekt, den sie in der Zelle bzw. im Organismus auslösen, bekannt ist. Beispiele hierfür sind eine 20 - 80%ige Hemmung des Wachstums von einzelligen Grünalgen, oder eine Aktivierung des Östrogenrezeptors im Hefezellöstrogentest. Diese Positivkontrollen werden bei Biotests in regelmäßigen Abständen zur Qualitätskontrolle untersucht.

Für eine Standardisierung müssen die Biotests eine strenge Prüfung durchlaufen. Die Reproduzierbarkeit und Variabilität der Verfahren wird in Ringtests mit mehreren internationalen Laboratorien geprüft. Hierfür untersuchen alle Labore die gleichen Proben mit dem gleichen Testsystem. Basierend auf den Ergebnissen wird die Richtlinie fertig ausgearbeitet und die Validitätskriterien definiert.



### 3 Biotestbasierte Erhebungs- und Beurteilungsmethoden

#### 3.1 In der Regulatorik verwendete Methoden

Biotests werden in einigen Ländern (z.B. Deutschland, Österreich, den USA und teilweise auch der Schweiz) bereits zur Bewertung der Giftigkeit von Abwässern, Oberflächengewässern oder Sedimenten eingesetzt. Hierfür werden vor allem *in vivo*-Biotestbatterien mit Testorganismen verschiedener trophischer Stufen angewendet. *In vitro*-Biotests werden gegenwärtig kaum eingesetzt: In Schweden wird ein *in vitro*-Biotest zur Bestimmung östrogen-aktiver Stoffe für die Abwasserprüfung verwendet und in Deutschland wird ein Test zur Ermittlung von Gentoxizität (Umu-Test) hierfür eingesetzt (siehe Tab. 2).

Die biologische Prüfung von Abwasser mit explizierter Angabe der Testmethoden ist in einigen wenigen Ländern schon in der nationalen Gesetzgebung reguliert (Deutschland, Kanada, USA). In den übrigen untersuchten Ländern sind die Gesetzestexte offener formuliert und die Prüfung von Abwässern wird in Richtlinien der Umweltbehörden geregelt. Tab. 2 und 3 geben einen Überblick über die in den EU-Ländern, den USA, Kanada und Australien/Neuseeland eingesetzten Testsysteme zur Überprüfung und Zulassung von industriellen und kommunalen Abwassereinleitungen. In Frankreich werden Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität verwendet. Allerdings sind bisher keine Tests gesetzlich vorgeschrieben und daher auch nicht in der Tabelle aufgeführt.

In der Schweiz sind bisher keine Biotests in der Gesetzgebung vorgeschrieben, allerdings werden (öko)toxikologische Wirkungen in einzelnen Richtlinien erwähnt. Laut der technischen Verordnung für Abfall (TVA) [28] ist nachzuweisen, dass bestimmte Eluate nicht toxisch auf Bakterien wirken (z.B. im Belebtschlamm- [29] oder Nitrifikantentest [30]). In der Altlastenverordnung [31] werden ökotoxikologische Untersuchungen ebenfalls erwähnt, allerdings werden sie nicht genauer spezifiziert. Laut Schweizerischer Gewässerschutzverordnung (GSchV, SR 814.201; Art. 1) [6] sollen ober- und unterirdische Gewässer vor nachteiligen Einwirkungen geschützt werden, ebenso soll eine nachhaltige Nutzung der Gewässer ermöglicht werden. Bei den ökologischen Zielen, die in Anhang 1 (Art. 1(3)) definiert sind, 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.



**Tab. 2: Überblick über in verschiedenen EU-Ländern in der Regulatorik verwendete Biotests.**

Ernährungsebene	Test	Belgien <sup>32</sup>	Deutschland <sup>33, 37</sup>	Frankreich	Irland <sup>32, 38</sup>	Litauen <sup>36</sup>	Niederlande <sup>32</sup>	Österreich <sup>34</sup>	Portugal <sup>32</sup>	Schweden <sup>32</sup>	Spanien <sup>32</sup>	England und Wales <sup>32, 35</sup>
Primärproduzenten	Akuter/Chronischer Wachstumshemmtest mit Algen											
	Akuter/Chronischer Wachstumshemmtest mit Wasserlinsen ( <i>Lemna</i> )											
Primärkonsumenten	Akuter Test mit Wasserflöhen ( <i>Daphnia</i> )											
	Chronischer Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen ( <i>Daphnia</i> )											
Sekundärkonsumenten	Akuter Fischttest											
	Tests mit Eiern/Embryonen/Larven von Fischen											
	Zweigenerationentest mit Zebrafischen											
Destruenten	Akuter Leuchtbakterientest											
	Wachstumstest mit Bakterien ( <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> )											
	Respirationshemmtest (OECD 209)											
	Nitrifikationshemmtest (ISO 9509)											
In vitro-Biotests	Umu-Test											
	Yeast Estrogen/Androgen Screen (YES/YAS)											

[32] OSPAR Commission; [33] Bundesministerium der Justiz; [34] Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft; [35] Environment Agency; [36] Cohiba; [37] Bundesministerium der Justiz; [38] Enterprise Ireland





**Tab. 3: Überblick über in Nicht-EU-Ländern in der Regulatorik verwendete Biotests.**

Ernährungsebene	Test	USA <sup>39</sup>	Kanada <sup>40-42</sup>	Australien <sup>43</sup>	Neuseeland <sup>44</sup>	Schweiz <sup>28</sup>
Primärproduzenten	Chronischer Wachstumshemmtest mit Algen	■	■		■	
	Chronischer Wachstumshemmtest mit Wasserlinsen ( <i>Lemna</i> )		■			
Primärkonsumenten	Akuter Test mit Wasserflöhen ( <i>Daphnia sp./ Ceriodaphnia dubia</i> )	■	■		■	
	Chronischer Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen ( <i>Daphnia sp./ Ceriodaphnia dubia</i> )	■	■			
	Akuter Test mit Flohkrebse (Amphipoden)				■	
Sekundärkonsumenten	Tests mit Eiern/Embryonen/Larven von Fischen	■	■			
	Akuter Fischtest	■	■		■	
Destruenten	Akuter Leuchtbakterientest			■		
	Respirationshemmtest (OECD 209)					■
	Nitrifikationshemmtest (ISO 9509)					■

[39] US EPA; [40-42] Canada; [43] ANZECC und ARMCANZ; [44] Hall und Golding; [28] Schweizerischer Bundesrat

Anhang 3 gibt einen Überblick über die Situation in einzelnen Ländern.



Im Folgenden werden die angewendeten Testsysteme im Überblick dargestellt und bezüglich ihrer Eigenschaften miteinander verglichen (Tab. 4 und Tab. 5).

**Tab. 4: In vitro-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Effektklasse	Test	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Testsysteme basierend auf spezifischen zellulären Mechanismen / <i>in vitro</i> -Biotests							
Gentoxizität	Umu-Test <sup>1</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentechnisch verändert)	Induktion der SOS-Antwort der Zelle	36 h	++		[45]
Östrogene und Androgene Effekte	Yeast Estrogen Screen (YES) <sup>1</sup>	Hefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) (gentechnisch verändert)	Östrogene Effekte (Rezeptorbindung)	96 h	++		[46]
	Yeast Androgen Screen (YAS) <sup>1</sup>	Hefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) (gentechnisch verändert)	Androgene Effekte (Rezeptorbindung)	96 h	++		[47]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 5: In vivo-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Organismen-Gruppe	Test	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Standardisierte Testsysteme / in vivo-Biotests im Labor							
Akute Tests							
Bakterien	Bakterien-Lumineszenzhemmtest (Leuchtbakterientest) (Microtox®, Lumistox®) <sup>1</sup>	Leuchtbakterien ( <i>Aliivibrio fischeri</i> )	Störung der ATP-Bildung (Hemmung der Biolumineszenz)	30 min	+		[48]
	Atmungshemmtest	Mikroorganismen aus Belebtschlamm	Atmungsrate / Sauerstoffaufnahme bei Oxidation von Kohlenstoff und Ammonium	30 min - 3 h	++		[29]
	Nitrifikationshemmtest	Mikroorganismen aus Belebtschlamm	Nitrifikationsaktivität	3 - 24 h	++		[30]
Krebstiere	Akute Daphnientests	<i>Daphnia magna</i> <sup>1</sup>	Immobilisierung (= Sterblichkeit)	24/48 h	++		[49], [50], [51]
		<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia pulex</i>	Immobilisierung	24 - 96 h	++	Erneuerung der Testlösungen alle 2 Tage verlangt	[52]
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Immobilisierung	24 - 96 h	++	Erneuerung der Testlösungen alle 2 Tage verlangt	[52]
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Immobilisierung	72 h	++	Statisch	[44]
	Akuter Amphipodentest	<i>Paracalliope fluviatilis</i>	Sterblichkeit	48 h	++	Statisch	[44]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 5 Fortsetzung: In vivo-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Organismen-Gruppe	Test	Organismus/Zelllinien	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Fische	Akute Fischtests	<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Lepomis macrochirus</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Oryzias latipes</i> , <i>Pimephales promelas</i> , <i>Poecilia reticulata</i>	Sterblichkeit	96 h	++	Statisch	[53-55]
		<i>Cyprinella leedsi</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Sterblichkeit	24 - 96 h	++	Erneuerung der Testlösungen alle 2 Tage verlangt	[52]
		<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salvelinus fontinalis</i>	Sterblichkeit	24 - 96 h	++		[52]
		<i>Gobiomorphus cotidianus</i>	Sterblichkeit	96 h	++	Statisch	[44]
Chronische Toxizität/Toxizität auf empfindliche Lebensstadien							
Bakterien	Zellvermehrungshemmtest	<i>Pseudomonas putida</i>	Wachstum ( <i>Optische Dichte</i> )	16 h	++	Statisch, eher unempfindlich	[56]
	Zellvermehrungshemmtest	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Wachstum ( <i>Optische Dichte</i> )	7 h	++	Statisch	[57]
Algen	Grünalgen-Wachstumstests <sup>1</sup>	<i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstum ( <i>Zellzahl</i> )	72 h	++	Statisch, für antibiotikabelastete Proben können auch Cyanobakterien verwendet werden	[58, 59]
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstum ( <i>Zelldichte</i> )	72 h	++	Statisch	[60]
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstum ( <i>Zellzahl</i> , <i>Biomasse</i> , <i>Chlorophyllgehalt</i> , <i>Optische Dichte</i> )	96 h	++	Statisch	[61]
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Wachstum ( <i>Zellzahl</i> , <i>Optische Dichte</i> )	72 h	++	Statisch, in Mikrotiterplatte	[44, 62]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 5 Fortsetzung: In vivo-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Organismen-Gruppe	Test	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Höhere Wasserpflanzen	Wasserlinsen-Wachstumstests	Kleine Wasserlinse ( <i>Lemna minor</i> )	Wachstum (Anzahl der Fronds/Blättchen und Biomasse)	7 d	++	statisch/semi-statisch	[63, 64]
Krebstiere	Chronische Daphnien-Fortpflanzungstests	Wasserfloh ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> )	Fortpflanzung, Sterblichkeit	7 d	+++		[65]
				max. 8 d	+++	tägliche Erneuerung der Testlösungen verlangt	[61, 66]
		Wasserfloh ( <i>Daphnia magna</i> )	Fortpflanzung, Sterblichkeit	21 d	+++(+)	Erneuerung der Testlösungen 3-mal wöchentlich	[67]
Fische	Fischartest	Zebrabärbling ( <i>Danio rerio</i> )	Sterblichkeit, letale Endpunkte	48 h	+	in Mikrotiterplatten	[68]
	Early Life Stage Toxicity Tests	<i>Danio rerio</i>	Sterblichkeit, Schlupfrate	10 - 14 d	+++	semi-statisch (täglich)	[69]
		<i>Pimephales promelas</i>	Sterblichkeit, Gewicht	7 d	+++	tägliche Erneuerung der Testlösungen verlangt	[61, 70]
		<i>Pimephales promelas</i>	Sterblichkeit, Deformationen	7 d	+++	tägliche Erneuerung der Testlösungen verlangt	[61]
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Sterblichkeit, Gewicht, Deformationen, Verhalten	7 - ~70 d	++++	semi-statisch oder im Durchfluss	[71]
	Fisch-Zweigenerationentest	<i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Oryzias latipes</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Befruchtung der Embryonen, Entwicklung, sexuelle Reifung, Wachstum, Fortpflanzung, Bestimmung gonadosomatischer Index, Histologie der Gonaden, Vitellogenin-Konzentration, Hormonkonzentrationen	min. 180 d	+++++	semi-statisch oder im Durchfluss	[72]



Um aus der Vielzahl der derzeit verfügbaren Tests diejenigen auszuwählen, die gegenwärtig für eine Beurteilung der Wasserqualität geeignet sind, wurden vom Oekotoxzentrum eine Expertenbefragung und ein Expertenworkshop durchgeführt. Detaillierte Informationen finden sich im zusammenfassenden Bericht zu den Ergebnissen der Expertenbefragung und des Expertenworkshops [3].

Bisher in der Regulatorik verwendete Biotests beziehen sich vor allem auf die Erfassung von **allgemeiner Toxizität**, sowie von **herbiziden und reproduktionstoxischen Wirkungen**. In diesem Bereich wurden insgesamt acht *in vivo*-Biotests als geeignet für die Beurteilung von Abwasser- und teilweise auch Gewässerqualität erachtet:

1. Algen-Wachstumshemmtest [73]
2. Algen-Photosynthesehemmtest [74, 75]
3. Wasserlinsen (*Lemna* sp.)-Wachstumshemmtest [63]
4. Akuter Test mit Wasserflöhen (*Daphnia* sp.) zur Beurteilung der Sterblichkeit [49]
5. Test mit Bachflohkrebsen (*Gammarus* sp.) zur Untersuchung von Frassaktivität [76]
6. Chronischer Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (*Ceriodaphnia dubia*) [65]
7. Fischei-Test mit Zebraärblingen (*Danio rerio*) [68]
8. *Fish early life stage toxicity* (FELST)-Test mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) [77]

**Gesamtbewertung:** Der Grossteil dieser Tests wurde bisher vor allem für die Beurteilung von Abwasser eingesetzt. Die Tests mit Algen, *C. dubia* und Regenbogenforellen wurden bereits bei Gewässerqualitätsbeurteilungen eingesetzt [78]. Vor allem beim Test mit Regenbogenforellen muss der Tierschutz beachtet werden. Genehmigungen für solche Tests werden nur mit einer sehr guten Begründung und einem Nachweis des Forschungsnutzens vom Veterinäramt genehmigt. Bachflohkrebstest und Algen-Photosynthesehemmtest werden derzeit noch nicht in der Regulatorik verwendet, sind jedoch aufgrund der zugehörigen Wirkmechanismen in diesem Kapitel aufgeführt. Ausser dem Algen-Photosynthesehemmtest und dem Test mit Bachflohkrebsen sind alle oben genannten Tests standardisiert und wurden in Bezug auf Interpretierbarkeit, Relevanz und vorausschauende Eigenschaften als gut bewertet.

**Probenvorbereitung:** Alle o.g. Tests sind auf Umweltproben anwendbar. In einzelnen Fällen kann eine Probenaufbereitung erforderlich sein, besonders wenn sich absetzende Feststoffe die Testergebnisse beeinflussen können. Das ist bei den Tests mit Grünalgen und Wasserflöhen oft der Fall. Bei zwei Tests, dem Algen-Wachstumshemmtest und dem Wasserlinsen-Wachstumshemmtest können gelegentlich wachstumsfördernde Effekte von Umweltproben beobachtet werden. Der Wasserlinsentest wurde als geeigneter für die Untersuchung gefärbter Proben erachtet als der Algen-Wachstumshemmtest, da der Algentest durch suspendierte Feststoffe und die Probenfärbung beeinflusst werden könnte. Dieser Test ist daher nach Ansicht der Experten gut geeignet für Abwässer der Papierindustrie. Es ist geplant, den Wasserlinsen-Wachstumshemmtest für diese Art von Proben in die Deutsche Abwasserordnung aufzunehmen. Für regulatorische Zwecke werden in der Abwasseruntersuchung beide, der Algen- und der Wasserlinsentest, oft parallel angewendet.

**Robustheit und Empfindlichkeit:** Sechs der acht diskutierten Testverfahren wurden als robust und als leicht für Routinezwecke und in Gewässerschutzlaboren einsetzbar beurteilt. Zwei Tests, der Wasserlinsentest und der Fischeitest, wurden als mässig empfindlich und mässig kosteneffizient beurteilt. Der nicht standardisierte Frassaktivitätstest mit Bachflohkrebsen wurde als vielversprechend angesehen, ebenso wie der *fish early life stage toxicity*-Test. Allerdings muss, wie oben erwähnt, beim Fischtest der Tierschutz beachtet werden.

**Zusätzliche Informationen:** Die Mehrzahl der Test wird im Labor durchgeführt. Für den Algen-Wachstumshemmtest, der gegenwärtig in Erlenmeyerkolben durchgeführt wird, ist eine DIN/ISO-Richtlinie für einen Mikrotiterplatten-Test in Arbeit mit einem optimierten Medium für Umweltproben.



Für den Algen-Photosynthesehemmtest werden mehr Messgeräte benötigt als für den Algen-Wachstumshemmtest.

Die folgende Tabelle (Tab. 6) zeigt die Beurteilung der vielversprechendsten *in vivo*-Biotests nach den in Kapitel 2.1 aufgeführten Beurteilungskriterien, basierend auf der Einschätzung der Experten. Aus Zeitgründen wurden der Frassaktivitätstest mit Bachflohkrebsen und der *FELST*-Test nicht im Detail diskutiert.



**Tab. 6: In vivo-Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität und von herbiziden Wirkungen: Beurteilung von (in der Regulatorik) verwendeten Tests basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot). n.d. nicht diskutiert

Kriterien	Test 1: Algen-Wachstumshemmtest	Test 2: Algen-Photosynthesehemmtest	Test 3: <i>Lemna</i> sp. Wachstumshemmtest	Test 4: Akuter <i>Daphnia</i> sp. Test	Test 5: <i>Gammarus</i> sp. Frassaktivitäts- Test	Test 6: Chronischer <i>Ceriodaphnia dubia</i> Fortpflanzungstest	Test 7: Fischeitest	Test 8: <i>Fish early life stage</i> toxicity-Test mit Regenbogenforellen
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>								
<b>In situ- oder Labortest?</b>	Labor	Labor	Labor	Labor	<i>in situ</i>	Labor	Labor	Labor
<b>In vitro / in vivo</b>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>
<b>Wirkmechanismus / Endpunkt</b>	Wachstumshemmung	Photosynthese- und Wachstumshemmung	Wachstumshemmung	Immobilität (= Sterblichkeit)	Frassaktivität, Sterblichkeit	Hemmung des Populationswachstums / der Fortpflanzung	Entwicklungsstörungen, Sterblichkeit	Entwicklungsstörungen, Effekte von hormonaktiven Stoffen, Sterblichkeit
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>								
<b>Interpretierbarkeit</b>	1	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.
<b>Relevanz</b>	1	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.
<b>Vorausschauend</b>	1	1	n.d.	1	n.d.	1	1	n.d.
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>								
<b>Anwendbar auf Umweltproben</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Proben-Vorbehandlung</b>	(Ja)	Ja	Nein	(Ja)	Nein	(Ja)	Nein	(Ja)
<b>Empfindlichkeit</b>	1	1	2	1-2	n.d.	1	2	n.d.
<b>Robustheit</b>	1	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.
<b>Grad der Validierung / Standardisierung</b>	1	2 (in Bearbeitung)	1	1	n.d.	1	1	n.d.
<b>Kosten / Kosteneffizienz</b>	1	1	2	1	n.d.	2	2	n.d.
<b>Gute routinemässige Anwendbarkeit</b>	1	1	2	1	n.d.	2	1	2
<b>Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren</b>	1	1	2	1	n.d.	2	1	n.d.

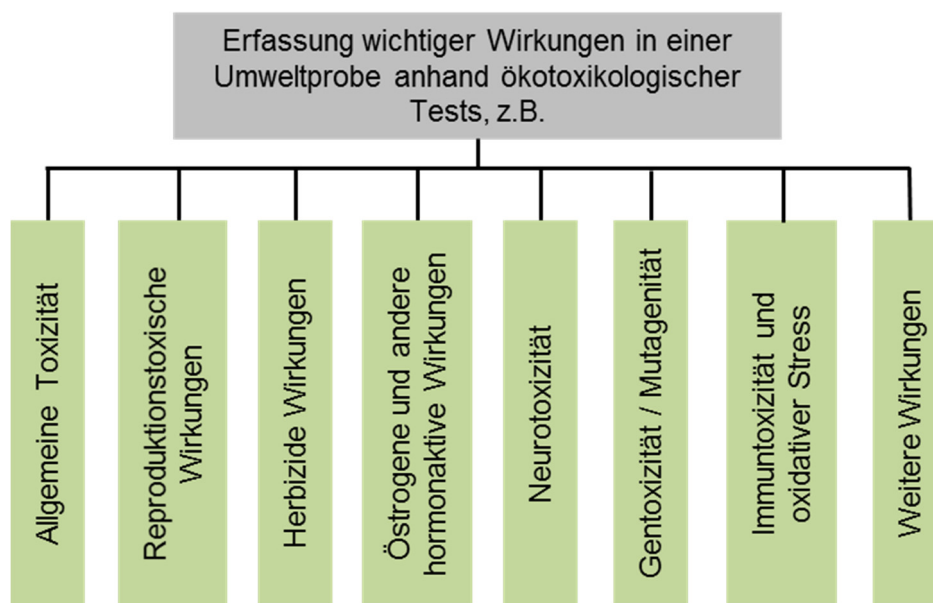




## 3.2 Vielfach angewendete Biotests und vielversprechende Methoden aus der Forschung

### 3.2.1 Überblick und Vergleich der Methoden

Eine Vielzahl von Biotests, die bereits jetzt zur Abwasser- und Gewässerbeurteilung eingesetzt werden, ist noch nicht regulatorisch festgeschrieben. Des Weiteren existieren bereits einige vielversprechende Methoden, die in der Forschung häufig eingesetzt werden. Tab. 7 und Tab. 8 geben einen Überblick über die derzeit verwendeten Tests. Die Gruppierung erfolgte nach den in Abb. 4 beschriebenen Wirkmechanismen, die im Rahmen der Expertenbefragung als besonders relevant identifiziert wurden.



**Abb. 4: Überblick über wichtige Wirkungen, die mit Biotests erfasst werden können.**

Einen Überblick über vereinzelt auf Umweltproben angewendete Tests geben Tab. 16 und Tab. 17 im Anhang 4.



**Tab. 7: In vitro-Biotests, die bereits häufig auf Abwasser und Oberflächengewässer angewendet wurden.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Effektklasse	Bezeichnung	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Allgemeine Toxizität							
Zytotoxizität	MTT-Test <sup>1</sup>	Permanente Zelllinien (z.B. aus Leberzellen (Hepatozyten) von Regenbogenforellen, RTL-W1) oder Primärkulturen von Leberzellen	Lebensfähigkeit von Zellen (kolorimetrische Messung der metabolischen Aktivität)	24 h	++	Messung der Bildung von Formazan (Umwandlungsprodukt von MTT-Tetrazoliumsalz)	[79]
	Kristallviolett-Färbung	Fisch- oder menschliche Zelllinien	Intensität der Proteinfärbung (korreliert mit Zahl der lebenden Zellen)	24 h	++		[80, 81]
	Neutralrot-Test (NRU) <sup>1</sup>	Fisch- oder menschliche Zelllinien	Lebensfähigkeit von Zellen (Aufnahmefähigkeit eines Farbstoffes in Lysosomen, kolorimetrische Messung)	<3 h	++		[82]
	Laktatdehydrogenase (LDH)-Test <sup>1</sup>	Menschliche Leberzellen	Lebensfähigkeit von Zellen (Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) über kolorimetrische (Farbstoff-) Messung des LDH-Verlusts von lysierten (aufgelösten) Zellen)	1 h	++		[83, 84]
	Kombinierbarer AlamarBlue-, CFDA-AM- und Neutralrot-Test	Leberzellen oder Kiemenzelllinie (RTgill-W1) der Regenbogenforelle	Lebensfähigkeit von Zellen (Messung von metabolischer Aktivität (AlamarBlue), Membranintegrität und lysosomaler Integrität (Neutralrot))	24 h	++		[85, 86]
Endokrine Wirkung							
Endokrine Aktivität (EA)	HEP-Vtg Assay <sup>1</sup>	Fischleberzellen	Östrogene Aktivität (Messung der Produktion von Vitellogenin (Vtg) mit ELISA)	96 h	+++		[87]
Gentoxizität und Mutagenität							
Mutagenität (Genmutationen)	Ames-Test <sup>1</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentechnisch verändert)	Anzahl an rückmutierten Kolonien (Anzahl Kolonien)	48 h	++	Frameshift- und Basenaustausch-Mutationen; Spezifität kann mit der Verwendung weiterer <i>S. typhimurium</i> -Linien erweitert werden	[88]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 7 Fortsetzung: In vitro-Biotests, die bereits häufig auf Abwasser und Oberflächengewässer angewendet wurden.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Effektklasse	Bezeichnung	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Gentoxizität und Mutagenität							
Mutagenität (Genmutationen)	Ames-Fluktuationstest <sup>1</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentechnisch verändert)	Anzahl an rückmutierten Kolonien (kolorimetrische Messung)	48 h	++	Mikrotiterplattenversion des klassischen Ames-Tests; hat diesem gegenüber Vorteile	[89]
	Mutatox Assay <sup>1</sup>	Leuchtbakterien ( <i>Aliivibrio fischeri</i> )	Anzahl an rückmutierten Kolonien (Messung der Biolumineszenz)	24 h	++		[90]
Gentoxizität (strukturelle DNA-Schäden)	Mikrokern-Test <sup>1</sup>	Zelllinie des Chinesischen Hamsters	Bildung von Mikrokernen (Mikronuklei) (mikroskopische Untersuchung)	3 d	+++	kann auch <i>in vivo</i> durchgeführt werden	[91]
	Comet-Assay <sup>1</sup>	Eukaryotische Zellen	DNA-Schäden (über Gel-Elektrophorese)	div.	++		[92]
Aktivität elektrophiler Schadstoffe	Keine Tests vorhanden, die bereits häufig auf Umweltproben angewendet wurden						
Dioxin-ähnliche Effekte							
Dioxin-ähnliche Wirkung	DR-CALUX®	<i>In vitro</i> : menschliche Zelllinie	Induktion des Arylhydrocarbon-Rezeptors durch Dioxin-ähnlich wirkende Stoffe	48 h	+++	Wird auch viel für Lebensmitteldiagnostik verwendet	[93]
Hepatotoxizität/ Detoxifizierung	EROD Assay	<i>In vivo</i> : Human-/Säugetier-/Fischzellen der Leber; <i>in vivo</i> : Fische	Cytochrom P450 1A1 Induktion als Antwort auf chlororganische Schadstoffe und PAHs (Fluoreszenzmessung)	≥24 h	+++	Wurde auch schon bei Amphibien verwendet	[94, 95], [96]
Neurotoxizität							
Neurotoxizität	Acetylcholin-esterase (AChE)-Hemmtest <sup>1</sup>	AChE (Enzym) von Zitteraal oder Honigbiene	Acetylcholinesterasehemmung durch Organophosphat- und Carbamatinsektizide (fluorometrische Messung)	Max. 24 h	++	Nachteil: keine Unterscheidung zwischen spezifischer und nicht-spezifischer Toxizität durch Abbau des Enzyms [11]	[97]
Immuntoxizität und oxidativer Stress							
Immuntoxizität	Keine Tests vorhanden, die bereits häufig auf Umweltproben angewendet wurden						
Oxidativer Stress	Nrf2-Aktivierung	Säugetierzelllinien (gentechnisch verändert)	Produktion von Luziferase durch oxidativen Stress (Fluoreszenzmessung)		++		[98]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 8: In vivo-Biotests, die bereits häufig auf Abwasser und Oberflächengewässer angewendet wurden.**

Aufwand: + gering ++ mittel +++ hoch ++++ sehr hoch

Organismen- Test gruppe	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Allgemeine Toxizität und herbizide Wirkungen						
Protozoen	Akuter Protozoentest <sup>1</sup>	<i>Tetrahymena thermophila/pyriformis</i>	Wachstumshemmung	24 h	++	[99]
Rotiferen	Test mit Rädertierchen <sup>1</sup>	Wappen-Rädertier ( <i>Brachionus calyciflorus</i> )	Sterblichkeit und Fortpflanzung	24/48 h	++	[100]
Algen	Imaging-PAM Assay	Einzellige Grünalgen (z.B. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	Hemmung der Photosynthese ( <i>Quantenausbeute gemessen mit IPAM-Gerät</i> )	4.5 h	++	[101]
	Kombinierter Algentest	Einzellige Grünalgen ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	a) Hemmung der Photosynthese nach 2 h (Herbizide Wirkung) ( <i>Quantenausbeute der Photosynthese</i> ) b) unspezifische Wachstumshemmung nach 24 h ( <i>kolorimetrische Messung</i> )	24 h	++	[102]
Krebstiere	Akuter Test mit Bieberschwanzfeenkrebs <sup>1</sup>	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Sublethale Endpunkte (1 h), Sterblichkeit (24 h)	1/24 h	++	[103]
	Sterblichkeitstest mit Salzkrebschen <sup>1</sup>	<i>Artemia franciscana</i>	Sterblichkeit	48 h	++	Salz wird zu Süßwasserproben hinzugefügt
Insekten	Akuter Chironomidentest	<i>Chironomus</i> sp.	Sterblichkeit	48 h	++	[105]
	Chronischer Chironomidentest	<i>Chironomus</i> sp.	Larven: <i>Überleben, Wachstum</i> Adulte Mücken: <i>Zeit zum Schlupf, Anzahl geschlüpfte Mücken</i>	28 d	++++	[106, 107]
Gentoxizität und Mutagenität						
Amphibien	Mikrokern-Test mit Amphibienlarven	<i>Xenopus laevis</i> oder <i>Pleurodeles waltl</i>	Wie <i>in vitro</i> , aber Organismen <i>in vivo</i> exponiert	> 7 d	++++	[108]
Endokrine Wirkungen						
Fische	Vitellogenin Assay mit Fischen	Blutproben von Fischen	Wie <i>in vitro</i> , aber Organismen <i>in vivo</i> exponiert		++++	Wild gefangene Fische oder Labortests

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



### 3.2.2 Auswahl und Beurteilung der Biotests

Für die Auswahl und Beurteilung der vielfach angewendeten Tests wurden ebenfalls die Ergebnisse von Expertenbefragung und Expertenworkshop herangezogen. Im Folgenden werden die dort vorgeschlagenen und diskutierten Tests in Bezug auf die Auswahlkriterien verglichen. Die Aufteilung erfolgt anhand der in Abb. 4 aufgeführten wichtigsten Wirkmechanismen.

#### 3.2.2.1 Östrogene und andere hormonaktive Wirkungen (endokrine Effekte)

In Bezug auf endokrine Effekte wurden sowohl Tests für Wirbeltiere als auch für Wirbellose diskutiert, jedoch sollte, nach Meinung der Experten, die Untersuchung von endokrinen Effekten bei Wirbeltieren derzeit bevorzugt werden. Für Wirbellose sind noch nicht genügend Biotests verfügbar.

Insgesamt wurden drei Biotests mit mehr oder weniger gleicher Priorität diskutiert:

- Yeast Estrogen Screen (YES) (*in vitro*) zur Untersuchung von östrogenen Aktivität [46]
- Verschiedene Tests mit menschlichen Zelllinien (*in vitro*) zur Untersuchung von endokrinen Aktivitäten [93]
- Vitellogenin als Biomarker für östrogene Effekte in männlichen Fischen (*in vivo/in situ*) [109]

Der YES wurde als der gegenwärtig geeignetste Test für die Beurteilung von östrogenen Effekten, vor allem in Abwasserextrakten, eingeschätzt, da er relativ einfach durchgeführt werden kann. Er wird zurzeit ISO-standardisiert und vereinzelt auch bereits in der Regulatorik eingesetzt [32]. Forschungslücken bestehen noch bezüglich der Validierung der SPE-Prozedur. Auch Tests mit menschlichen Zelllinien wurden als sehr vielversprechend eingestuft, obwohl deren Durchführung etwas aufwändiger ist. Derzeit werden solche Tests ebenfalls im Rahmen der ISO standardisiert. Aufgrund des umfangreichen Wissens um die Effekte von östrogen-aktiven Substanzen von der molekularen bis hin zur Organismenebene, kann bei beiden Testtypen eine Verknüpfung zu Effekten auf Fische hergestellt werden [8]. Um die Interpretierbarkeit der Tests zu verbessern, werden Umweltqualitätskriterien basierend auf Äquivalenzkonzentrationen benötigt.

Die Verwendung von Biomarkern für östrogene Effekte, wie die Induktion von Vitellogenin in juvenilen oder männlichen Fischen, ist nach Meinung der Experten höchst relevant. Allerdings können solche Biomarker, vor allem aufgrund der hohen Kosten zur Gewinnung von Gewebeproben (Blut, Gonaden und/oder Leber), oft nicht für Routinezwecke in Betracht gezogen werden. Zudem fehlen Hintergrunddaten für Vitellogenin-Werte in der Umwelt und auch Analysemethoden für viele Arten, wodurch derzeit eine robuste Interpretation verhindert wird.

Tab. 18 im Anhang 5 zeigt die Beurteilung der vielversprechendsten Biotests nach den oben aufgeführten Auswahlkriterien basierend auf der Einschätzung der Experten.



### 3.2.2.2 Gentoxizität und Mutagenität

Zur Untersuchung von Gentoxizität und Mutagenität wurden vier gut etablierte Biotests ausgewählt. Alle vier Tests werden im Labor durchgeführt.

Die Diskussion erfolgte mit folgender Priorisierung:

1. Ames-Fluktuationstest (*in vitro*) zur Untersuchung von Mutagenität (DNA-Schädigung/Mutationen) [89]
2. Mikrokern-Test zur Untersuchung von Gentoxizität (Chromosomen-Veränderungen) (*in vitro* oder *in vivo* mit im Freiland gesammelten Organismen) [91, 108]
3. Umu-Test mit *Salmonella typhimurium* (*in vitro*) zur Untersuchung von Gentoxizität (Induktion von DNA-Reparatur) [45]
4. Comet-Assay zur Untersuchung von Gentoxizität (DNA-Schädigung) (*in vivo* mit im Freiland gesammelten Organismen) [110]

**Gesamtbeurteilung:** Der Ames-Fluktuationstest ebenso wie der Mikrokern-Test wurden durch die Experten als gut interpretierbar beurteilt. Beim Umu-Test gingen die Meinungen auseinander. Dieser ist der einzige Test für Gentoxizität, der bereits in der Regulatorik angewendet wird [33]. Alle drei Tests sind standardisiert und wurden als robust beurteilt. Der Comet-Assay wurde als mässig interpretierbar, relevant und robust beurteilt. Dieser Test ist noch nicht standardisiert.

**Relevanz und vorausschauende Eigenschaften:** Bei allen Tests zum Nachweis von Gentoxizität und Mutagenität muss berücksichtigt werden, dass positive Ergebnisse in den Tests relativ schwierig zu kommunizieren sind. Vor allem, da bisher keine Verbindungen der Testergebnisse zu Effekten auf höheren biologischen Organisationsebenen oder im Ökosystem hergestellt werden konnte. Die Tests können jedoch als Frühwarnsystem für mögliche Effekte auf Individuen dienen.

**Anwendbarkeit für Umweltproben:** Alle Tests sind auf Umweltproben anwendbar.

**Proben-Vorbehandlung:** Eine Probenvorbehandlung wurde für die Untersuchung von Oberflächen-gewässer-Proben im Ames-Fluktuationstest als notwendig erachtet. Geeignete Methoden hierfür sind jedoch verfügbar, wie z.B. eine Festphasenextraktion mit Oasis HLB-Kartuschen [93]. Ein wichtiger zu berücksichtigender Punkt bei aufkonzentrierten Proben ist eine mögliche Zytotoxizität, die Effekte in allen drei Tests verdecken kann.

**Empfindlichkeit:** Nur der Ames-Fluktuationstest wurde von den Experten als empfindlich genug für die Beurteilung der Wasserqualität beurteilt.

**Weitere Anmerkungen:** Der Ames-Fluktuationstest wurde als gut geeignet für Screening-Zwecke angesehen, wohingegen der Mikrokern-Test für ein vertieftes Umweltmonitoring empfohlen wird. Beide Tests sollten komplementär verwendet werden. Der Ames-Fluktuationstest wurde als besser geeignet bewertet als der Umu-Test. Er sollte jedoch für Screening-Zwecke jeweils mit und ohne S9-Aktivierung (Zugabe von Stoffwechsellenzymen in einem Leberhomogenat) durchgeführt werden. Auch sollten verschiedene Bakterien-Stränge, mit der Fähigkeit zum Nachweis unterschiedlicher Genveränderungen (z.B. Punktmutationen), für unterschiedliche Substanzen verwendet werden. Allerdings kann es durch Substanz- und Strang-abhängige Faktoren zu Unterschieden in der Testempfindlichkeit von bis zu einer Grössenordnung kommen.

Alle weiteren in der Expertenbefragung genannten Testmethoden wurden nur für die Untersuchung von Detailaspekten als geeignet erachtet, nicht aber für Routinezwecke. Weitere diskutierte Tests waren der Comet-Assay [111], der FCMN(M)N-Test [112], der Mutatox-Test [113], der Schwester-Chromatid-Austausch (SCE)-Test [114] und der p53-CALUX® [115].

Das fehlende Wissen über die Umweltrelevanz von Gentoxizität / Mutagenität, ebenso wie mögliche Einflüsse von im Test vorhandenem Histidin, wurden als wichtiger Forschungsbedarf identifiziert. Tab. 19 im Anhang 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Beurteilung.



### 3.2.2.3 Neurotoxizität

Zur Untersuchung von Neurotoxizität wurden fünf Testsysteme diskutiert:

1. Acetylcholinesterase (AChE)-Hemmung [116, 117]
2. Verhalten von Zebraabblings (*Danio rerio*)-Embryonen und Larven (z.B. [118-120])
3. Beeinträchtigung des Geruchsinns von Fischen (*D. rerio*, Salmoniden) [121]
4. Akute und chronische Biotests mit *Ceriodaphnia dubia* und *Hyaella azteca* [65, 66, 122]
5. Zytotoxizitätstests mit Nervenzellen (Neuroblasten (Stammzellen der Nervenzellen), SH-SY5Y Zellen, MTT-Test)

**Gesamtbeurteilung:** Alle Biotests wurden als mässig bis gut in Bezug auf ihre Interpretierbarkeit und vorausschauende Eigenschaften beurteilt. Tests mit Embryonen und Larven des Zebraabblings zur Untersuchung von Neurotoxizität durch Verhaltens- und Enzymanalysen sind vielversprechende Testmethoden (z.B. [118-120]), die sich jedoch noch in der Entwicklung befinden. Zum Beispiel werden solche Verhaltenstests mit Zebraabblingsembryonen gerade im Rahmen des DANTOX-Projektes an der Technischen Hochschule Aachen (D) entwickelt (<http://www.bio5.rwth-aachen.de/DanTox/>).

Die Krebstiere *C. dubia* und *H. azteca* reagieren besonders empfindlich auf neurotoxische Stoffe. Daher sind Tests mit diesen Arten gut für eine Untersuchung neurotoxischer Effekte geeignet, auch wenn die Test-Endpunkte nicht Wirkmechanismus-spezifisch sind.

Die Messung der Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase ist derzeit die einzige standardisierte Methode unter den diskutierten Testverfahren [97]. Es sind Methoden verfügbar um die AChE-Aktivität in Mikrotiterplatten [116] ebenso wie in Organismen/Gewebeproben zu messen (z.B. [117, 123]).

**Relevanz:** Mit Ausnahme der Tests mit *C. dubia* und *H. azteca* wurden die o.g. Tests als mässig relevant beurteilt. Der AChE-Test ist gut geeignet wenn Organophosphat- und Carbamat-Insektizide die zu betrachteten Stoffe sind, da sie spezifisch die Acetylcholinesterase hemmen.

**Anwendbarkeit auf Umweltproben, Empfindlichkeit und Robustheit:** Alle Tests sind auf Umweltproben anwendbar. Für die *in vivo*-Biotests mit Fischen und Krebstieren (Tests 2 - 4) ist keine Probenaufkonzentrierung nötig. Die Empfindlichkeit der Tests ebenso wie ihre Robustheit wurden grösstenteils als gut beurteilt. Jedoch sind die Tests 2, 3 und 5 noch nicht standardisiert.

Die **Kosten / Kosteneffizienz** des AChE-Tests und der Tests mit *C. dubia* und *H. azteca* wurde als gut bis mässig beurteilt. Diese Tests sind gut für Routinezwecke einsetzbar und können in Gewässerschutzlaboren und privaten Auftragslaboren gut durchgeführt werden.

**Weitere Anmerkungen:** Testmethoden zu Untersuchung von Genexpression (qPCR Arrays mit Analyse von gezielten Mechanismus-spezifischen Genen) wurden als eine vielversprechende zukünftige Methode erwähnt (z.B. [124]); hier besteht allerdings noch viel Forschungsbedarf.

Tab. 20 im Anhang 5 gibt einen Überblick über die Beurteilung dieser Tests.



#### 3.2.2.4 Dioxin-ähnliche Wirkungen

Zur Untersuchung Dioxin-ähnlicher Effekte wurden nur zwei Biotests als für eine Gewässerbeurteilung potentiell geeignet erachtet. Hierzu gehören Tests mit H4IIE-Zellen (Zelllinie aus Leberkrebszellen) (*in vitro*) [125] und die Untersuchung des Enzyms EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase), das eine wichtige Rolle im Abbau von Dioxin-ähnlich wirkenden Schadstoffen spielt. Diese Tests werden überwiegend bei Fischen (*in vivo*) [126] und in Fischzelllinien (Leberzellen von Regenbogenforellen, *rainbow trout liver cells*, RTL-W1) (*in vitro*) [95] eingesetzt.

**Gesamtbeurteilung:** Beide Biotests wurden als gut bis mässig beurteilt. Ihre Interpretierbarkeit und ihre Relevanz wurden als gut bewertet, ebenso wie die Anwendbarkeit auf Umweltproben, ihre Empfindlichkeit und Robustheit. Eine Vorbehandlung der Proben ist nötig. Methoden hierfür sind verfügbar. Der Grad der Validierung/Standardisierung der Tests ist gut bis mässig. Bei einigen Tests die H4IIE-Zellen verwenden sollten Ringtests durchgeführt werden. Vergleiche zwischen verschiedenen Laboren sind für einen Teil der Tests verfügbar. Beide Tests sind mässig gut in Gewässerschutzlaboren oder privaten Laboren anwendbar. Es sind Zellkultur-Einrichtungen notwendig.

**Weitere Anmerkungen:** Zur Diskussion von Tests mit H4IIE-Zelllinien [125] wurden alle verfügbaren Tests, wie z.B. DR-CALUX® [127], Cyp1A-Test [128], H4IIE-luc [125] und EROD [95], einbezogen, da die Experten keine deutlichen Hinweise darauf sahen, dass ein Biotests besser als die Anderen ist. Die Hauptunterschiede sind augenscheinlich höhere Kosten in Bezug auf Biotests für die eine Lizenz nötig ist, wie z.B. der DR-CALUX®. Tests mit H4IIE-Zellen werden für Screening-Zwecke als geeignet erachtet; der EROD-Test mit Fischen ist für das Umweltmonitoring anwendbar. Beide Tests sind in ihrer Aussagekraft komplementär. Nach Ansicht der Experten ist weitere Forschung in Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse aus diesen Tests nötig.

Tab. 21 im Anhang 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Bewertung.





### 3.2.2.5 Immuntoxizität und oxidativer Stress

Zur Untersuchung von immuntoxischen Wirkungen und oxidativem Stress wurden fünf Biotests ausgewählt und diskutiert:

1. Phagozytose-Aktivität in Muschel-Hämatocyten (*ex vivo*) (z.B. [129, 130]) oder Säuger-Zelllinien (*in vitro*)
2. Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) (*in vitro/ex vivo*) zur Untersuchung von oxidativem Stress, Katalase-Aktivität / *lipid peroxidation* [131-133]
3. *Disease challenge*-Tests zur Untersuchung der Anfälligkeit für Krankheiten [134]
4. Immunpathologie zur Untersuchung von verschiedenen klassischen Immunparametern wie z.B. B-Zellen, Makrophagen, Proliferation (starke Vermehrung) von Lymphozyten etc. (e.g. [135])
5. Tests mit Säuger-Zelllinien z.B. Beas-2B-Zelllinien zur Untersuchung der Ausschüttung/Abgabe von Cytokinen (gemessen durch ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [136].

Immuntoxizität und oxidativer Stress hängen eng zusammen, da beispielsweise Schädigungen des Immunsystems durch oxidativen Stress hervorgerufen werden können. Auch spielen reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Singulett-Sauerstoff, eine wichtige Rolle in der Immunantwort selbst (z.B. [137]).

In dieser Testgruppe wurden *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Biotests einbezogen. Alle Tests werden im Labor durchgeführt. Die Phagozytose-Aktivität kann auch bei im Freiland gesammelten oder *in situ* exponierten Organismen untersucht werden.

Die **Interpretierbarkeit** der aufgeführten Tests wurde als mässig bis schlecht beurteilt, ihre **Relevanz** und **vorausschauenden Eigenschaften** als mässig. Ausnahmen stellen hier der *disease challenge*-Test und der immunpathologische Ansatz dar, die beide als gut beurteilt wurden.

**Anwendbarkeit auf Umweltproben und Probenvorbehandlung:** Alle Biotests sind auf Umweltproben anwendbar. Eine Probenvorbehandlung ist nicht nötig.

**Empfindlichkeit und Robustheit** der Tests wurden grösstenteils nicht diskutiert oder als fragwürdig angesehen. Einzig der Phagozytose-Test wurde als gut bis mässig sensitiv eingestuft.

**Standardisierung:** Tests zur Untersuchung von Immuntoxizität sind nicht standardisiert. Einzig ein Test zur Messung der Bildung von ROS ist kommerziell verfügbar (OxiSelect™ ROS Assay Kit). Diese Art von Stress kann zu Zelltod/-nekrose führen und steht mit Immuntoxizität in Verbindung. Der ROS-Bildungstest [138] kann auch die Toxizität von einigen Nanomaterialien bestimmen.

**Kosten und Kosteneffizienz:** Alle Tests wurden als relativ teuer eingestuft; teilweise waren die Kosten auch nicht bekannt. Der Phagozytose-Test erfordert beispielsweise eine zweiwöchige Exposition im Labor. Das verhindert eine leichte **Anwendung für Routinezwecke**. Einzig Tests mit Säuger-Zelllinien wurden in Bezug darauf als gut beurteilt. Daher wurde die **Anwendbarkeit** dieser Tests **in Gewässerschutzlaboren und/oder privaten Laboren** als mässig bis schlecht oder unbekannt eingestuft.

**Zusätzliche Informationen/Kommentare:** Die Experten waren sich einig, dass weitere Forschung nötig ist, um Biotests für die Messung von Immuntoxizität und oxidativem Stress zu entwickeln. Für alle diskutierten Tests besteht noch deutlicher Forschungsbedarf. Beispielsweise ist beim Phagozytose-Test ein Vergleich der Ergebnisse zu denen des *disease challenge*-Tests nötig. Die Phagozytose-Aktivität kann mit Muschel-Haematocyten (Blutkörperchen) (Arten: *Mytilus edulis* oder *Anodonta* sp.) oder Säuger-Zelllinien durchgeführt werden. Die *ex vivo*-Empfindlichkeit dieses Tests ist ungefähr drei Grössenordnungen höher als die Empfindlichkeit *in vitro*. Zusammenfassend wurde der *disease challenge*-Test als der vielversprechendste Test zur Untersuchung von Immuntoxizität beurteilt, jedoch ist auch hier noch mehr Forschung nötig. Derzeit kann dieser Test nur in Forschungsprojekten angewendet werden.



Insgesamt besteht in diesem Bereich noch erheblicher Forschungsbedarf. Verschiedene Mechanismen der Immunantwort können sich gegenseitig beeinflussen, daher ist es für eine Untersuchung der Immuntoxizität notwendig, mehrere Endpunkte zu messen. Vielversprechende Ansätze wurden durch das National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) in den Niederlanden [139, 140] und dem National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) in den Vereinigten Staaten von Amerika [141] entwickelt. *In situ*-Expositionen verbunden mit Genexpressionsanalyse und der Erfassung von klassischen Endpunkten, ebenso wie (Art-spezifische) *disease challenge*-Tests wurden als die vielversprechendsten Ansätze identifiziert. Geeignete Organismen zur Untersuchung von Immuntoxizität sind Muscheln, Fische und grosse Krebstiere wie z.B. Hummer. Tab. 22 im Anhang 5 gibt einen Überblick über die Beurteilung.



## 4 Empfehlung von Biotests zur Beurteilung der Wasserqualität

Um die Wasserqualität anhand von Biotests beurteilen zu können, werden empfindliche, robuste, standardisierte und möglichst kosteneffiziente Biotests benötigt. Im folgenden Kapitel wird eine Empfehlung gegeben, welche Biotests bereits so weit entwickelt sind, dass sie zur Gewässerbewertung eingesetzt werden können. Aus der Vielfalt der vorhandenen Testsysteme wurden hierfür diejenigen ausgewählt, die das grösste Potential haben, bereits jetzt oder in naher Zukunft für eine Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt zu werden. Die Auswahl basiert auf der in Kapitel 3 dargestellten Beschreibung und Beurteilung der Testsysteme.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse von Expertenbefragung und -workshop, dass die Methoden, je nach Wirkmechanismus und zugehörigen Biotests, unterschiedlich weit entwickelt sind. So sind Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität und von herbiziden Wirkungen am weitesten fortgeschritten, wohingegen bei Biotests zur Erfassung von Neurotoxizität und Immuntoxizität noch am meisten Entwicklungsbedarf besteht.

Folgende Biotests für die verschiedenen Wirkmechanismen werden empfohlen:

- **Allgemeine Toxizität und herbizide Effekte:** Der Algen-Wachstumshemmtest ebenso wie der Algen-Photosynthese-Hemmtest wurden als derzeit am besten geeignet erachtet. Diese Tests bieten den grössten Nutzen bei relativ geringem Aufwand. Alle weiteren Tests in diesem Bereich sind deutlich aufwändiger. Der Algen-Photosynthese-Hemmtest muss allerdings noch standardisiert werden.
- Bei **endokrinen Wirkungen** wurden Biotests zur Erfassung östrogenen Effekte in Wirbeltieren als am Wichtigsten erachtet. *In vitro*-Biotests, wie der Hefezellöstrogentest (*Yeast Estrogen Screen*) mit menschlichem Rezeptor und Tests mit menschlichen Zelllinien wurden priorisiert, ebenso wie Vitellogenin als Biomarker für die Erfassung östrogenen Effekte in Fischen. Derzeit werden der Hefezellöstrogentest und Tests mit menschlichen Zelllinien zur Erfassung östrogenen Effekte ISO-standardisiert. Für die Erfassung von Vitellogenin besteht noch weiterer Forschungsbedarf. Informationen über Vitellogenin und weitere (ähnliche) Biomarker können im Rahmen von Probenahmekampagnen für andere Zwecke (z.B. Monitoring ohne Fokus auf endokrine Effekte) über die Entnahme von Blutproben bei Fischen gewonnen werden.
- **Gentoxizität und Mutagenität:** Hier wurden vor allem bereits standardisierte Tests wie der Ames-Fluktuationstest und der Mikrokern-Test als geeignet erachtet, wobei der Erste als Screening-Methode und der Zweite für ein vertieftes Umweltmonitoring eingesetzt werden sollte. Beide Tests sind als komplementär zu betrachten, da sie unterschiedliche Mechanismen untersuchen. Bisher wurden noch keine Verbindungen von Testergebnissen zu Effekten auf höheren Organisationsebenen hergestellt.
- **Neurotoxizität:** Gegenwärtig gibt es nur einen bewährten und standardisierten *in vitro*-Biotest zur Messung einer neurotoxischen Wirkung, den Acetylcholinesterase-Enzymhemmtest. Dieser zeigt jedoch ausschliesslich die Wirkung von Organosphosphat- und Carbamat-Insektiziden an. Verhaltenstests mit Fischen oder Krebstieren sind zwar höchst relevant, aber noch im Entwicklungsstadium. Die Messung der Genexpression wurde ebenfalls als vielversprechender Endpunkt angesehen. Auch hier besteht noch Forschungsbedarf.
- **Dioxin-ähnliche Wirkung:** Zur Erfassung dieser Wirkung wurden zwei geeignete Tests identifiziert, die die Aktivierung des Arylhydrocarbon (Ah)-Rezeptors messen: Tests mit H4IIE-Zellen ebenso wie ein Test zur Messung der Enzymaktivität von Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in Fischen oder Fischzelllinien. Auch hier können Tests mit H4IIE-Zellen für ein Screening herangezogen werden, wohingegen die EROD-Messung in Fischen eher für das Umweltmonitoring geeignet ist. Beide Tests sollten als komplementär betrachtet werden.



- **Immuntoxizität und oxidativer Stress:** Zur Erfassung von Immuntoxizität gibt es keine geeigneten Tests für die Routineanwendung. Obwohl einige vielversprechende Untersuchungsmethoden identifiziert wurden, wie z.B. der *disease challenge*-Test oder immunpathologische Untersuchungen mit Fischen, sind diese gegenwärtig nur in ausgewählten Projekten anwendbar. Einzelne Tests zur Erfassung von oxidativem Stress sind verfügbar.

Ergänzend zu *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Biotests können *in situ*-Biotests direkt Effekte im Gewässer zeigen, z.B. Einflüsse auf die Bildung von Vitellogenin in männlichen oder juvenilen Fischen oder auf die Frassaktivität von Bachflohkrebsen.

Für eine Anwendung im Modul Ökotoxikologie sind, in einem ersten Schritt, Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität und von herbiziden Wirkungen, ebenso wie für die Erfassung endokriner Effekte und von Genotoxizität / Mutagenität am besten geeignet. Biotests zur Messung von dioxin-ähnlichen Effekten und teilweise auch Neurotoxizität könnten in näherer Zukunft einbezogen werden, wohingegen Biotests zur Messung von Immuntoxizität und oxidativem Stress noch deutlich weiter entwickelt werden müssen.

Tab. 9 fasst die Informationen zu den praxistauglichen Tests zusammen.



**Tab. 9: Zusammenfassung der für eine Anwendung zur Gewässerbeurteilung geeigneten Biotests, Testorganismen und messbaren Effekte.**

Aufwand + gering ++ mittel +++ hoch

Effektklasse	Test	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Aufwand	Bemerkungen	Richtlinie oder Referenz
Testsysteme basierend auf spezifischen zellulären Mechanismen / <i>in vitro</i> -Biotests							
Allgemeine Toxizität und herbizide Wirkung	Grünalgen-Wachstumstest	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i>	Wachstum (Zellzahl)	72 h	++	statisch	[58]
	Kombinierter Algentest	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	a) Hemmung der Photosynthese nach 2 h (Herbizide Wirkung) ( <i>Quantenausbeute der Photosynthese</i> ) b) unspezifische Wachstumshemmung nach 24 h ( <i>kolorimetrische Messung</i> )	24	++	statisch	[102]
Östrogene Effekte	Yeast Estrogen Screen (YES) <sup>1</sup>	Hefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) (gentechnisch verändert)	Östrogene Effekte ( <i>Rezeptorbindung</i> )	96 h	++		[46]
	Reportergentests mit menschlichen Zelllinien	Menschliche Zelllinie (gentechnisch verändert)	Östrogene Aktivität ( <i>Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz</i> )	48-72 h	++		Reviews: [142, 143]
Genotoxizität und Mutagenität	Ames Fluktuationstest <sup>1</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (gentechnisch verändert)	Anzahl an rückmutierten Kolonien ( <i>kolorimetrische Messung</i> )	48 h	++		[89]
	Mikrokern-Test	Zelllinie des Chinesischen Hamsters	Bildung von Mikrokernen (Mikronuklei) ( <i>mikroskopische Untersuchung</i> )	3 d	+++	kann auch <i>in vivo</i> durchgeführt werden	[91]
Dioxin-ähnliche Wirkung	Tests mit H4IIE-Zelllinien z.B. DR-CALUX®	<i>In vitro</i> : Menschliche Zelllinie	Induktion des Arylhydrocarbon-Rezeptors durch Dioxin-ähnlich wirkende Stoffe	48 h	++		[93, 125]
	EROD Assay	<i>In vitro</i> : Human-/Säugetier-/Fischzellen der Leber; <i>in vivo</i> : Fische	Cytochrom P450 1A1 Induktion als Antwort auf chlororganische Schadstoffe und PAHs ( <i>Fluoreszenzmessung</i> )	≥ 24 h	+++		[94], [95], [96]
Neurotoxizität	Acetylcholinesterase (AChE)-Hemmtest	AChE (Enzym) von Zitteraal oder Honigbiene oder Messung <i>in vivo</i>	Acetylcholinesterasehemmung durch Organophosphat- und Carbamatinsektizide ( <i>fluorometrische Messung</i> )	Max. 24 h	++	Nachteil bei DIN-Test: keine Unterscheidung zwischen spezifischer und nicht-spezifischer Toxizität durch Abbau des Enzyms möglich [11]	[97, 116] [117, 123].

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



## 5 Handlungsbedarf für Validierung, Forschung und Entwicklung

Im Folgenden wird, ausgehend von den Erkenntnissen aus den vorhergehenden Kapiteln, aufgezeigt, welcher Handlungsbedarf für die weitere Validierung vielversprechender Tests besteht.

Die derzeit in der Regulatorik angewendeten Tests untersuchen grösstenteils akute oder chronische Auswirkungen von Umweltchemikalien auf Gewässerlebewesen. Tests für spezifische Wirkungen stellen immer noch die Minderheit der verwendeten Tests dar. Zum Nachweis von Wirkungen bestimmter Stoffklassen mit dem gleichen Wirkmechanismus sind (*in vitro*-)Biotests für spezifische Wirkmechanismen notwendig. Ein Grund für die fehlende regulatorische Anwendung solcher Tests ist deren, immer noch ungenügende, Standardisierung. Bisher wurden nur Tests zur Untersuchung von Gentoxizität und Mutagenität standardisiert [45, 88, 89, 91, 108]. Tests für die Ermittlung von östrogenen Aktivität befinden sich derzeit in einem ISO-Standardisierungsverfahren. Für die Erfassung herbizider Wirkungen sind zwar standardisierte Algentests vorhanden, allerdings werden hier nur Wachstumseffekte untersucht und keine spezifischen Effekte wie z.B. eine Hemmung der Photosynthese. Dieser und weitere wichtige Wirkmechanismen wie z.B. andere endokrine Wirkungen (androgene Aktivität, progesterone Aktivität etc.), dioxin-ähnliche Wirkungen, ebenso wie Neurotoxizität, Immuntoxizität und oxidativer Stress, fehlen bisher völlig.

Für einige dieser Wirkmechanismen besteht, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, noch Forschungsbedarf (Neurotoxizität (zum Teil), Immuntoxizität und oxidativer Stress), so dass hier eine baldige Standardisierung von Biotests und eine darauffolgende Anwendung in der Regulatorik nicht zu erwarten sind. Dahingegen sind bei endokrinen, herbiziden und Dioxin-ähnlichen Wirkungen bereits vielversprechende Methoden vorhanden, die nach Standardisierung erfolgreich in der Regulatorik eingesetzt werden könnten. Ein Fokus sollte hier vor allem auf die Standardisierung von *in vitro*-Biotests für östrogene und weitere hormonaktive Wirkungen (basierend auf Hefezellen oder menschlichen Zelllinien) gesetzt werden, sowie auf eine Standardisierung des kombinierten Algentests zur Ermittlung von Photosystem II-hemmenden Herbiziden. In einem weiteren Schritt kann auf die Standardisierung von Biotests für Dioxin-ähnliche Wirkungen und für neurotoxische Wirkungen hingearbeitet werden.

Für eine erfolgreiche Standardisierung sind, neben einer ausführlichen Arbeitsanleitung, vor allem Informationen zur Variabilität und Reproduzierbarkeit der Biotests notwendig. Sind die Ergebnisse vielversprechend, müssen Ringtests zur Ermittlung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren durchgeführt werden. Eine Standardisierung im Rahmen der ISO, die das Standardisierungsorgan für Biotests mit Umweltproben ist, dauert bis zu 4 Jahre. Das Oekotoxzentrum ist aktiv in die relevanten Gruppen für aquatische Biotests der ISO eingebunden und hat die Möglichkeit, Vorschläge für Biotests einzubringen. Validierungen für den Hefezellöstrogentest und den kombinierten Algentest wurden am Oekotoxzentrum bereits durchgeführt. Die Variabilität dieser Tests hat sich mit 7-26% als relativ gering erwiesen [144]. Ringtests sind für beide Testverfahren noch ausstehend. Auch der ER-CALUX<sup>®</sup>, der kommerziell erhältlich ist, ist in den Niederlanden bereits weitgehend validiert. Bei den übrigen oben erwähnten Tests muss noch zusätzliche Validierungsarbeit geleistet werden.

Um in Zukunft eine möglichst gute Beurteilung der Wasserqualität zu ermöglichen, sollte darauf hingearbeitet werden, dass vielversprechende Biotests baldmöglichst standardisiert werden. Vor allem in Bezug auf Biotests für Immuntoxizität, Neurotoxizität und oxidativen Stress sollte noch weiter geforscht werden. Hier sind vor allem einfache und möglichst kosteneffiziente Methoden für eine Routineanwendung nötig. Auch sollte das Potential von Genexpressionsstudien für die Beurteilung der Wasserqualität weiter untersucht und durch aussagekräftige Fallstudien u.a. auch im Vergleich mit „klassischen“ (wie z.B. dem Wasserfloh- oder Fischeitest) und „spezifischen“ Biotests (wie z.B. dem Hefezellöstrogentest), evaluiert werden.



## 6 Schlussfolgerungen

Insgesamt hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass eine Vielfalt von Biotests vorhanden ist, die bereits für die Beurteilung von Abwasser und Gewässerproben eingesetzt wurde. Allerdings ist es keine einfache Aufgabe aus dieser Vielfalt Biotests auszuwählen, die bereits jetzt für eine routinemässige Beurteilung der Wasserqualität eingesetzt werden können.

In der Regulatorik werden bisher hauptsächlich *in vivo*-Biotests eingesetzt, wobei viel Erfahrung mit solchen Tests in den USA, Kanada, Australien und der EU besteht. *In vitro*-Biotests fehlen bisher weitestgehend (mit Ausnahme von Tests für Genotoxizität / Mutagenität und vereinzelt östrogene Aktivität). *In vitro*-Biotests sind oft spezifischer als *in vivo*-Biotests und durch eine Aufkonzentrierung der Proben (z.B. mit einer Festphasenextraktion) sind niedrigere Detektionslimite möglich. Einige dieser Tests, wie z.B. der Hefezellöstrogentest (YES) oder der kombinierte Algentest, können bereits jetzt routinemässig angewendet werden. Bei weiteren Tests besteht noch Validierungsbedarf. Auch eine ISO-Standardisierung ist für die meisten Tests entweder ausstehend oder (für wenige) gerade laufend. Neben den Biotests selbst sind auch Probenahme und Probenaufbereitung sehr wichtige Punkte, die ebenfalls in eine Standardisierung einbezogen werden müssen. Insgesamt zeigen verschiedene Bestrebungen in der EU und weltweit, dass eine Tendenz zu einer grösseren Akzeptanz von *in vitro*-Biotests als kosteneffiziente Screening-Methoden besteht.

Abschliessend ist sehr wichtig zu beachten, dass es nicht den *einen* Biotest gibt, mit dem man eine Beurteilung der Wasserqualität vornehmen kann. Für eine gute Beurteilung verschiedener Aspekte der Wasserqualität sollten nach Möglichkeit immer mehrere Biotests angewendet werden.



## 7 Referenzen

1. Götz, C.W., R. Kase, and J. Hollender, *Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser*, in *Studie im Auftrag des BAFU*. 2011, Eawag, Dübendorf. p. 108.
2. Wittmer, I., et al., *Mikroverunreinigungen – Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus diffusen Einträgen*. *Studie im Auftrag des BAFU*. Eawag, Dübendorf. 2014.
3. Kienle, C., E. Vermeirssen, and I. Werner, *Applicability of Bioassays for Surface Water Quality Assessment: Summary Results of an Expert Consultation and Workshop (Draft)*. 2015, Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
4. Escher, B. and N. Chèvre, *Ökotoxikologische Untersuchung von Wasserproben aus der Glatt, April bis Oktober 2004 - Eine Untersuchung im Rahmen des Modulstufenkonzepts, Modul Ökotoxikologie*. 2004, Eawag, Dübendorf.
5. Kienle, C., et al., *Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließgewässern*. *Studie im Auftrag des BAFU*. . 2012, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Eawag-EPFL, Dübendorf.
6. Schweigert, N., et al., *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz - Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie*. 2001, Eawag, Dübendorf. p. 29.
7. Fent, K., *Ökotoxikologie, Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*. 4 ed. 2013, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 377.
8. Connon, R.E., J. Geist, and I. Werner, *Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment*. *Sensors*, 2012. **12**(9): p. 12741-71.
9. EG, *RICHTLINIE 2000/60/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik*, in *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*. 2000, Europäisches Parlament und Rat der europäischen Union.
10. EU, *Chemicals and the Water Framework Directive: Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards. Draft 2010. Draft version 6.0, 23 February 2010*. 2010.
11. Escher, B. and F. Leusch, *Bioanalytical tools in water quality assessment*. 2012: International Water Association.
12. Kunz, P.Y., et al., *In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015(0).
13. Liechti, P., et al., *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz, Modul-Stufen-Konzept*, in *Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr. 26*. 1998, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern.
14. Hürlimann, J. and P. Niederhauser, *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Kieselalgen Stufe F (flächendeckend)*, in *Umwelt-Vollzug*. 2007, Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. p. 43.
15. Stucki, P., *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Makrozoobenthos Stufe F*, in *Umwelt-Vollzug*. 2010, Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 61.





16. Känel, B., W. Göggel, and C. Weber, *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Wasserpflanzen: Anleitung zur Probenahme*. 2009, Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 60.
17. Schager, E. and A. Peter, *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Fische Stufe F (flächendeckend)*, in *Vollzug Umwelt. Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr. 44*. 2004, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft BUWAL, Bern. p. 65.
18. Liechti, P., *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Chemisch-Physikalische Erhebungen, Nährstoffe*, in *Umwelt-Vollzug*. 2010, Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. p. 44.
19. Liess, M., R.B. Schafer, and C.A. Schriever, *The footprint of pesticide stress in communities-Species traits reveal community effects of toxicants*. *Science of The Total Environment*, 2008. **406**(3): p. 484-490.
20. Kienle, C., R. Kase, and I. Werner, *Evaluation of Bioassays and Wastewater Quality - In vitro and in vivo Bioassays for the Performance review in the Project "Strategy Micropoll"*. 2011, Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
21. Burton Jr, G.A., et al., *In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation*. *Environmental Pollution*, 2005. **134**(1): p. 133-144.
22. Tribskorn, R., et al., *Establishing causality between pollution and effects at different levels of biological organization: The VALIMAR project*. *Hum Ecol Risk Assess*, 2003. **9**(1): p. 171-194.
23. Huggett, R., et al., *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Boca Raton, FL: Lewis, 1992.
24. Roesijadi, G. and W. Robinson, *Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release*. *Aquat Toxicol*, 1994. **102**: p. 125-133.
25. Karr, J.R., *Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management*. *Ecological Applications*, 1991. **1**(1): p. 66-84.
26. Escher, B.I., P.A. Neale, and F.D.L. Leusch, *Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values*. *Water Res*, 2015. **81**: p. 137-148.
27. Escher, B.I., et al., *Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples*. *J Environ Monit*, 2008. **10**(5): p. 612-621.
28. Schweizerischer Bundesrat, *Technische Verordnung über Abfälle (TVA) vom 10. Dezember 1990 (Stand am 1. Juli 2011)*. 1990. p. 36.
29. OECD, *OECD Guidelines for the testing of chemicals 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)*. 2010. p. 18.
30. International Organization for Standardization, *Water quality -- Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms. ISO 9509:2006*. 2006.
31. Schweizerischer Bundesrat, *Verordnung über die Sanierung von belasteten Standorten (Altlasten-Verordnung, AltIV) vom 26. August 1998 (Stand am 1. August 2011)*. 1998. p. 20.



32. OSPAR Commission, *Practical Guidance Document on Whole Effluent Assessment*. 2007.
33. Bundesministerium der Justiz, *Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV)*. 1997.
34. Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft, 186. *Verordnung des Bundesministers für Land- und Forstwirtschaft über die allgemeine Begrenzung von Abwasseremissionen in Fließgewässer und öffentliche Kanalisationen (AAEV)*. 1996.
35. Environment Agency, *Integrated Pollution Prevention & Control (IPPC). Guidance on the use of Direct Toxicity Assessment in PPC Impact Assessments*. Environment Agency, England. 2006.
36. Cohiba, *Whole Effluent Assessment (WEA). Proposed Recommendations for the Use of toxicity Limits*. Finnish Environment Institute, Helsinki, Finland. 2010.
37. Bundesministerium der Justiz, *Gesetz über Abgaben für das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserabgabengesetz - AbwAG)*. . 1976.
38. Enterprise Ireland, *Aquatic Toxicity Testing in Ireland*. Shannon Aquatic Toxicity Laboratory, Shannon, Irland. 2011.
39. US EPA, *Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Whole Effluent Toxicity Test Methods; Final Rule*. 40 CFR Part 136. US Government Printing Office, Washington DC. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2002-11-19/pdf/02-29072.pdf>. 2002.
40. Kanada, *Meat and Poultry Products Plant Liquid Effluent Regulations*. C.R.C., c. 818. Published by the Minister of Justice. [http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,\\_c.\\_818.pdf](http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._818.pdf). 2013.
41. Minister of Justice Canada, *Metal Mining Effluent Regulations*. SOR/2002-222. Published by the Minister of Justice. <http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-2002-222.pdf>. 2013.
42. Minister of Justice Canada, *Pulp and Paper Effluent Regulations*. SOR/92-269. Published by the Minister of Justice. <http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-92-269.pdf>. 2013.
43. ANZECC und ARMCANZ, *Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. Volume 2: Aquatic Ecosystems — Rationale and Background Information*. Australian Water Association, Artarmon, AU. 2000.
44. Hall, J.A. and L. Golding, *Standard Methods for Whole Effluent Toxicity Testing: Development and Application*. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd, Hamilton, NZ. 1998.
45. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test*. EN ISO 13829 (2000) and 38415-3 (1996). 2000.
46. Routledge, E.J. and J.P. Sumpter, *Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen*. Environ Toxicol Chem, 1996. **15**(3): p. 241-248.
47. Paul, M., F. Dela Cruz, and S. Chen, *A yeast screen system for aromatase inhibitors and ligands for androgen receptor: Yeast cells transformed with aromatase and androgen receptor*. Environ Health Perspect, 1999. **107**(11): p. 855-860.



48. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test)*. ISO 11348. 2007.
49. International Organization for Standardization, *Wasserbeschaffenheit –Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitätstest (ISO 6341:2012)*. 2012.
50. Environment Agency, *The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the juvenile Daphnia magna immobilisation test*. Environment Agency, England. 2007.
51. Environment Canada, *Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to 'Daphnia magna'*. EPS1/RM/14. Environment Canada, Ottawa, CA. 2000.
52. US EPA, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. 2002.
53. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 203: Fish, Acute Toxicity Test*. 1992.
54. APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Edition*. American Public Health Association. 1975.
55. Environment Canada, *Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout*. EPS1/RM/13. Environment Canada, Ottawa, CA. 2000.
56. International Organization for Standardization, *Wasserbeschaffenheit - Pseudomonas putida Wachstumshemmtest (Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest)*. ISO 10712. 1995.
57. Deutsches Institut für Normung, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (Photobacterium phosphoreum; Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37)*. DIN 38412-L37. 1999.
58. International Organization for Standardization, *Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae*. ISO 8692:2004. 2004. p. 15.
59. OECD, *OECD Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. 2006.
60. Environment Agency, *The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the Pseudokirchneriella subcapitata freshwater algal growth inhibition test*. Environment Agency, England. 2008.
61. US EPA, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*. EPA-821-R-02-013. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. 2002.
62. Environment Canada, *Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using a Freshwater Alga*. EPS1/RM/25. Environment Canada, Ottawa, CA. 2007.
63. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (Lemna minor) -- Duckweed growth inhibition test*. ISO 20079:2005. 2005.



64. Environment Canada, *Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor*. EPS1/RM/37. Environment Canada, Ottawa, Ca. 2007.
65. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia*. ISO 20665:2008. 2008.
66. Environment Canada, *Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran Ceriodaphnia dubia*. EPS 1/RM/21. Environment Canada, Ottawa, CA. 2007.
67. International Organization for Standardization, *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Langzeit-Toxizität von Stoffen gegenüber Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. ISO 10706. 2000.
68. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)*. ISO 15088:2007. 2007.
69. International Organization for Standardization, *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Toxizität von Embryos und Larven eines Süßwasserfisches - Halbstatisches Verfahren*. ISO 12890. 1999.
70. Environment Canada, *Biological Test Method: Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows*. EPS 1/RM/22. Environment Canada, Ottawa, CA. 2011.
71. Environment Canada, *Biological Test Method: Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout)*. EPS1/RM/28. Environment Canada, Ottawa, CA. 1998.
72. OECD, *Draft Proposal for a new guideline: Fish two-generation test guideline*. 2002.
73. International Organization for Standardization, *Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae*. ISO 8692:2012. 2012.
74. Escher, B.I., et al., *Passive sampling of herbicides combined with effect analysis in algae using a novel high-throughput phytotoxicity assay (Maxi-Imaging-PAM)*. J Environ Monit, 2006. **8**(4): p. 456-64.
75. Schreiber, U., et al., *Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging*. Biosens Bioelectron, 2007. **22**(11): p. 2554-63.
76. Maltby, L., et al., *Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance*. Environ Toxicol Chem, 2002. **21**(2): p. 361-368.
77. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. 2013.
78. U.S. Environmental Protection Agency, *Technical Support Document For Water Quality-based Toxics Control*. 1991: Washington, DC.
79. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
80. Ahne, W., *Studies on the use of fish tissue cultures for toxicity tests in order to reduce and replace the fishtests (Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für Toxizitätsbestimmungen zur Einschränkung und Ersatz des Fischtests)*. Zentralblatt für



- Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene - Abt. 1 Orig. B. Hygiene, 1985. **180**(5-6): p. 480-504.
81. Segner, H. and D. Lenz, *Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line*. Toxicol In Vitro, 1993. **7**(4): p. 537-540.
82. Zhang, S.Z., et al., *Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes*. Cell Biol Toxicol, 1990. **6**(2): p. 219-34.
83. Nachlas, M.M., et al., *The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt*. Anal Biochem, 1960. **1**(4-5): p. 317-26.
84. Weisshaar, D., E. Gossrau, and B. Faderl, *Normal ranges of  $\alpha$ -HBDH, LDH, AP and LAP determined by optimized standard methods (Normbereiche von  $\alpha$ -HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substratoptimierten Testansätzen)*. Medizinische Welt, 1975. **26**(9): p. 387-390.
85. Schirmer, K., et al., *Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture*. Toxicology in Vitro, 1997. **11**(1-2): p. 107-119.
86. Schirmer, K., et al., *Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill*. Toxicology, 1998. **127**(1-3): p. 143-155.
87. Tollefsen, K.E., R. Mathisen, and J. Stenersen, *Induction of vitellogenin synthesis in an Atlantic salmon (Salmo salar) hepatocyte culture: a sensitive in vitro bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals*. Biomarkers, 2003. **8**(5): p. 394-407.
88. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome test (Ames test)*. ISO 16240:2005. 2005. p. 20.
89. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)*. ISO 11350. 2012.
90. Ulitzur, S., I. Weiser, and S. Yannai, *A new, sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds*. Mutat Res, 1980. **74**(2): p. 113-24.
91. International Organization for Standardization, *Water quality -- Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei -- Part 2: Mixed population method using the cell line V79*. ISO 21427-2:2006. 2006. p. 20.
92. Frenzilli, G., M. Nigro, and B.P. Lyons, *The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments*. Mutat Res, 2009. **681**(1): p. 80-92.
93. Van der Linden, S.C., et al., *Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays*. Environ Sci Technol, 2008. **42**(15): p. 5814-5820.
94. Gauthier, L., et al., *Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian Xenopus laevis*. Sci Total Environ, 2004. **323**(1-3): p. 47-61.
95. International Organization for Standardization, *Water quality -- Biochemical and physiological measurements on fish -- Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)*. ISO 23893-2. 2007.



96. Ganassin, R.C., K. Schirmer, and N.C. Bols, *Experimental Models: Cell/Tissue Cultures - Methods for the use of fish cell and tissue culture as model systems in basic and toxicology research*, in "The Handbook of Experimental Animals" G. Bullock and T.E. Bunton (eds in chief) – "Laboratory Fish" G. Ostrander (ed), Chapter 38, Academic Press, San Diego, CA. 2000.
97. Deutsches Institut für Normung, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1 : Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest) (T 1). DIN 38415-1. 1995.*
98. Wang, Z., et al., *Development of a Molecular Assay for Rapid Screening of Chemopreventive Compounds Targeting Nrf2*. Journal of the Association for Laboratory Automation, 2008. **13**(4): p. 243-248.
99. Latif, M. and E. Licek, *Toxicity assessment of wastewaters, river waters, and sediments in Austria using cost-effective microbiotests*. Environ Toxicol, 2004. **19**(4): p. 302-9.
100. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h. ISO 20666. 2008.*
101. RIVM, *Toxicity measurements in concentrated water samples. RIVM, Bilthove, Niederlande. 2010.*
102. Quayle, P., S. Rutishauser, and B. Escher, *Standard Operation Procedure (SOP): Combined Algae Test, Determination of photosynthesis inhibition by means of algae chlorophyll fluorescence with the Maxi-Imaging-PAM and growth inhibition by means of OD measurement in a microtiter plate. 2008, Eawag Aquatic Research.*
103. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the acute toxicity to Thamnocephalus platyurus (Crustacea, Anostraca). ISO 14380. 2011.*
104. Meyer, B.N., et al., *Brine Shrimp - a Convenient General Bioassay for Active-Plant Constituents*. Planta Med, 1982. **45**(1): p. 31-34.
105. OECD, *OECD Guidelines for the testing of chemicals 235, Chironomus sp., Acute Immobilisation Test. 2011. p. 17.*
106. OECD, *OECD Guidelines for the testing of chemicals 218, Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. 2004.*
107. OECD, *OECD Guidelines for the testing of chemicals 219, Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. 2004.*
108. International Organization for Standardization, *Water quality -- Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei -- Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. ISO 21427-1. 2006.*
109. International Organization for Standardization, *Water quality — Biochemical and physiological measurements on fish — Part 3: Determination of vitellogenin. ISO 23893-3 (Draft). 2012.*
110. Da Rocha, C.A.M., et al., *Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review*. Reviews in Fisheries Science, 2009. **17**(2): p. 170-173.



111. Mitchelmore, C.L. and J.K. Chipman, *DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring*. *Mutat Res*, 1998. **399**(2): p. 135-147.
112. Laingam, S., S.M. Frosco, and A.R. Humpage, *Flow-cytometric analysis of in vitro micronucleus formation: comparative studies with WIL2-NS human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines*. *Mutat Res*, 2008. **656**(1-2): p. 19-26.
113. Kwan, K.K., et al., *Mutatox test: A new test for monitoring environmental genotoxic agents*. *Environmental Pollution*, 1990. **65**(4): p. 323-332.
114. Perry, P. and S. Wolff, *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. *Nature*, 1974. **251**(5471): p. 156-8.
115. Van der Linden, S.C., et al., *Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress*. *Mutat Res*, 2014. **760**: p. 23-32.
116. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochem Pharmacol*, 1961. **7**(2): p. 88-95.
117. Fulton, M.H. and P.B. Key, *Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects*. *Environ Toxicol Chem*, 2001. **20**(1): p. 37-45.
118. Cario, C.L., et al., *Automated measurement of zebrafish larval movement*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 15): p. 3703-8.
119. Froehlicher, M., et al., *Zebrafish (Danio rerio) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies*. *Aquat Toxicol*, 2009. **95**(4): p. 307-19.
120. Kienle, C., H.R. Kohler, and A. Gerhardt, *Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (Danio rerio) embryos and larvae*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009. **72**(6): p. 1740-7.
121. Baatrup, E., K.B. Doving, and S. Winberg, *Differential effects of mercurial compounds on the electroolfactogram (EOG) of salmon (Salmo salar L.)*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1990. **20**(3): p. 269-276.
122. Environment Canada, *Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment and Water Using the Freshwater Amphipod Hyalella azteca*. 2013: EPS 1/RM/33 Second Edition - January 2013. p. 150.
123. Xuereb, B., et al., *Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration*. *Aquat Toxicol*, 2009. **94**(2): p. 114-22.
124. Biales, A.D., et al., *A quantitative real-time polymerase chain reaction method for the analysis of vitellogenin transcripts in model and nonmodel fish species*. *Environ Toxicol Chem*, 2007. **26**(12): p. 2679-86.
125. Whyte, J.J., C.J. Schmitt, and D.E. Tillitt, *The H4IIE cell bioassay as an indicator of dioxin-like chemicals in wildlife and the environment*. *Crit Rev Toxicol*, 2004. **34**(1): p. 1-83.
126. Noury, P., et al., *Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: Development and application*. *Environ Toxicol*, 2006. **21**(4): p. 324-331.



127. Murk, A.J., et al., *Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water*. *Fundam Appl Toxicol*, 1996. **33**(1): p. 149-60.
128. Hahn, M.E., et al., *Cytochrome-P4501a Induction and Inhibition by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl in an Ah Receptor-Containing Fish Hepatoma-Cell Line (Plhc-1)*. *Aquat Toxicol*, 1993. **26**(3-4): p. 185-208.
129. Auffret, M., et al., *A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006. **63**(3): p. 393-405.
130. Blaise, C., et al., *Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay*. *Environ Toxicol*, 2002. **17**(3): p. 160-169.
131. Fernández, B., et al., *Antioxidant responses in gills of mussel (Mytilus galloprovincialis) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast*. *Aquatic Toxicology*, 2010. **99**(2): p. 186-197.
132. Hellou, J., N.W. Ross, and T.W. Moon, *Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012. **19**(6): p. 2007-2023.
133. Vlahogianni, T., et al., *Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels Mytilus galloprovincialis for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece*. *Marine Pollution Bulletin*, 2007. **54**(9): p. 1361-1371.
134. Bravo, C.F., et al., *Biomarker responses and disease susceptibility in juvenile rainbow trout Oncorhynchus mykiss fed a high molecular weight PAH mixture*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011. **30**(3): p. 704-714.
135. Broeg, K., et al., *The "bioeffect assessment index" (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach*. *Marine Pollution Bulletin*, 2005. **50**(5): p. 495-503.
136. Ulrich, K., et al., *Extractable organic matter of standard reference material 1649a influences immunological response induced by pathogen-associated molecular patterns*. *Environ Sci Pollut Res*, 2010. **17**(6): p. 1257-1267.
137. Olgun, S., *Immunotoxicity of pesticide mixtures and the role of oxidative stress*. 2004, Virginia Polytechnic Institute and State University. p. 184.
138. Livingstone, D.R., *Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms*. *Mar Pollut Bull*, 2001. **42**(8): p. 656-66.
139. RIVM. *WHO Collaborating Centre for Immunotoxicology and Allergic Hypersensitivity*. 2015 03.08.2015]; Available from: [http://www.rivm.nl/en/Topics/W/WHO\\_Collaborating\\_Centre\\_for\\_Immunotoxicology\\_and\\_Allergic\\_Hypersensitivity](http://www.rivm.nl/en/Topics/W/WHO_Collaborating_Centre_for_Immunotoxicology_and_Allergic_Hypersensitivity).
140. Krajnc-Franken, M.A.M., et al., *The immune system as a target for toxicity: a tiered approach to testing, with special emphasis on histopathology, in Immunotoxicity of metals and immunotoxicology*, A. Dayan, Editor. 1990, Plenum Press: New York. p. 241-264.
141. Germolec, D., *Explanation of Levels of Evidence for Immune System Toxicity*. 2009, National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services.





142. Gutendorf, B. and J. Westendorf, *Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens*. Toxicology, 2001. **166**(1-2): p. 79-89.
143. Kase, R., P. Kunz, and A. Gerhardt, *Identification of reliable test procedures to detect endocrine disruptive and reproduction toxic effects in aquatic ecosystems [Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen]*. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, 2009. **21**(4): p. 339-378.
144. Kienle, C., et al., *Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU 2015*, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Eawag-EPFL, Dübendorf.
145. EPA, U.S., *Universe of Chemicals and General Validation Principles*, in *U.S. Environmental Protection Agency Endocrine Disruptor Screening Program*. 2012.
146. Leusch, F., A. Hebert, and M. Schriks, *Bioanalytical tools to analyse hormonal activity in environmental waters - Review of the state-of-the-science*. 2012, Global Water Research Coalition, London, United Kingdom. p. 180.
147. Mons, M., *Monitoring and control of drinking water quality: Inventory and evaluation of monitoring technologies for key-parameters*, TECHNÉAU, Editor. 2008. p. 306.
148. OECD, *OECD Series on Testing and Assessment Number 34. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment*. ENV/JM/MONO(2005)14, 2005.
149. OECD, *OECD Series on Testing and Assessment Number 178. Detailed Review Paper on the State of the Science on Novel In Vitro and In Vivo Screening and Testing Methods and Endpoints for Evaluating Endocrine Disruptors*. ENV/JM/MONO(2012)23, 2012.
150. Thompson, K.C., K. Wadhia, and A.P. Loibner, *Environmental Toxicity Testing*. 2005: Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
151. International Organization for Standardization, *Water quality -- Sampling -- Part 10: Guidance on sampling of waste waters. ISO 5667-10:1992* 1992.
152. International Organization for Standardization, *Water quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. ISO 5667-3:2003* 2003.
153. Blumberg, R., *Liquid-liquid extraction*. 1988, London: Academic Press.
154. Liška, I., *Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - Historical development and overview*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**(1-2): p. 3-16.
155. Pedersen, F., A. Damborg, and P. Kristensen, *Guidance Document for Risk Assessment of Industrial Waste Water. Danish Environmental Protection Agency*. 1995.
156. Lesche, H., G. Sbieschni, and G. Kayser, *Wann gelten Starkverschmutzerzuschläge? Grenzwerte und Einflussgrößen berücksichtigen*. wwt Wasserwirtschaft Wassertechnik, 2010. **11/12**: p. 22-25.
157. Levet, D., *Guide pratique des Substances Toxiques dans les Eaux Douces et Littorales du Bassin Seine-Normandie*, E.S.N.e. Aquascop, Editor. 2008.
158. INERIS, *Perturbateurs endocriniens et biosurveillance des milieux aquatiques*. 2009.



159. INERIS, *Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique*. 2009.
160. EPA Ireland, *Integrated Pollution Prevention Control (IPPC) Licensing*. <http://www.epa.ie/whatwedo/licensing/ippc/> (zuletzt besucht am 14.02.2013). 2013.
161. EPA Ireland, *Wastewater Treatment Manuals: characterisation of Industrial Wastewaters*. EPA Ireland, Wexford, Irland. 1998.
162. Penders, E.J.M. and W. Hoogenboezem, *Evaluation of the Ames TA98, Umu and Comet Assay for Quality Monitoring Surface Water*. Association of River Waterworks (RIVA). 2003.
163. Durand, A., et al., *Toxicity measurements in concentrated water samples. Evaluation and validation*. 2009, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
164. Schriks, M., M.B. Heringa, and S.C. van der Linden, *Temporal Variation in Multiple Hormonal Activities of Surface Waters Located in the Dutch Part of the Rhine basin*. Association of Rhine Waterworks (RIVA). 2009.
165. Bingman, I., *Biologisk-kemisk karakterisering av industriavloppsvatten: Tillämpning vid prövning och tillsyn av miljöfarlig*. Allmänna råd 89:5 verksamhet. 1989, Naturvårdsverket: Solna.
166. Claesson, A., et al., *Mikrotest för inhibition av alg tillväxt. Rapport 3184, Bilaga 4*. 1986: Naturvårdsverket
167. Fiskesjö, G., *The Allium Test as a Standard in Environmental Monitoring*. Hereditas, 1985. **102**(1): p. 99-112.
168. Landahl, C.-C., *Växtbioassay med lins. En metodbeskrivning*. 1990: Institutet för vatten- och luftvårdsforskning.
169. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test*. 2004.
170. Swedish Standards Institute, *Vattenundersökningar - Bestämning av akut toxicitet för kräftdjuret Ceriodaphnia dubia - Statisk metod (Water quality - Determination of acute toxicity to the crustean Ceriodaphnia dubia - Static method)*. SS 28214. 1996. p. 14.
171. Mount, D.I. and T.J. Norberg, *A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test*. Environ Toxicol Chem, 1984. **3**(3): p. 425-434.
172. International Organization for Standardization, *Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]*. ISO 7346. 1996.
173. Swedish Standards Institute, *Vattenundersökningar - Bestämning av toxicitet för embryoner och yngel av sötvattenfisk - Semistatisk metod (Determination of embryo-larval toxicity to freshwater fish - Semistatic procedure)*. SS 28193. 1988. p. 12.
174. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study*. 1984. p. 9.
175. Norberg, T.J. and D.I. Mount, *A new fathead minnow (Pimephales promelas) subchronic toxicity test*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1985. **4**(5): p. 711-718.



176. Larsson, A., C. Haux, and M.-L. Sjöbäck, *Toxiska effekter av metaller på fisk. Prövning av fysiologisk testmetodik. Rapport 3166*. 1986: Naturvårdsverket. p. 68.
177. Landner, L., et al., *Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1985. **9**(3): p. 282-93.
178. Larsson, A., *Recipientkontroll vatten: Blodbild hos fisk. Rapport 3109, BIN NR26*. 1986: Naturvårdsverket.
179. Bengtsson, B.-E., *Recipientkontroll vatten: Rygggradsskador hos fisk. Rapport 3109, BIN NR24*. 1986: Naturvårdsverket.
180. Björklund, I., *Recipientkontroll vatten: Smak och lukt. Rapport 3075. Metodunderlag 8*. 1984: Naturvårdsverket.
181. Neuman, E., *Recipientkontroll vatten: Assymetrier hos fisk. Rapport 3109, BIN NR23*. 1986: Naturvårdsverket.
182. Neuman, E., *Recipientkontroll vatten: Yttre synliga sjukdomssymptom hos fisk. Rapport 3109. BIN NR27*. 1986: Naturvårdsverket.
183. Blanck, H., *A Simple, Community Level, Ecotoxicological Test System Using Samples of Periphyton*. *Hydrobiologia*, 1985. **124**(3): p. 251-261.
184. Becker van Sloten, K., D. Rossel, and J. Tarradellas, *Altlasten, Gefährdungsabschätzung: Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren auf Sickerwasser und Eluate von belasteten Standorten*. 1999, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, BUWAL. p. 45.
185. Power, E.A. and R.S. Boumphrey, *International trends in bioassay use for effluent management*. *Ecotoxicology*, 2004. **13**(5): p. 377-398.
186. Minister of Justice Canada, *Meat and Poultry Products Plant Liquid Effluent Regulations. C.R.C., c. 818. Published by the Minister of Justice. [http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,\\_c.\\_818.pdf](http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._818.pdf)*. 2013.
187. Schirmer, K., et al., *Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture*. *Toxicol In Vitro*, 1997. **11**(1-2): p. 107-19.
188. Plewa, M.J., et al., *Development of quantitative comparative cytotoxicity and genotoxicity assays for environmental hazardous chemicals*. 2000, Int Water Assoc: Shiga, Jpn. p. 109-116.
189. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
190. Heresztyn, T. and B.C. Nicholson, *Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay*. *Water Res*, 2001. **35**(13): p. 3049-3056.
191. Kaur, K., N. Mathur, and P. Bhatnagar, *Comparative Study of Usage of Microbial Strains for Monitoring Waste Water Treatment Plants*. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2012. **2**(2): p. 26-37.
192. Zimmermann, F.K., R. Kern, and H. Rasenberger, *A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation*. *Mutat Res*, 1975. **28**(3): p. 381-388.



193. Quillardet, P., et al., *SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 5971-5.
194. Kienzler, A., et al., *Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(3): p. 500-10.
195. Perrodin, Y., et al., *A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital*. Chemosphere, 2013. **90**(3): p. 1037-46.
196. Miloshev, G., I. Mihaylov, and B. Anachkova, *Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells*. 2002. **513**(1-2): p. 69-74.
197. Cahill, P.A., et al., *The GreenScreen® genotoxicity assay: A screening validation programme*. Mutagenesis, 2004. **19**(2): p. 105-119.
198. Hastwell, P.W., et al., *High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay*. Mutat Res, 2006. **607**(2): p. 160-75.
199. Aleem, A. and A. Malik, *Genotoxicity of water extracts from the River Yamuna at Mathura, India*. Environ Toxicol, 2003. **18**(2): p. 69-77.
200. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
201. Hissin, P.J. and R. Hilf, *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Anal Biochem, 1976. **74**(1): p. 214-26.
202. Baker, M.A., G.J. Cerniglia, and A. Zaman, *Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples*. Anal Biochem, 1990. **190**(2): p. 360-5.
203. Tang, J.Y., et al., *In vitro bioassay for reactive toxicity towards proteins implemented for water quality monitoring*. J Environ Monit, 2012. **14**(3): p. 1073-81.
204. Farmen, E., et al., *Produced water extracts from North Sea oil production platforms result in cellular oxidative stress in a rainbow trout in vitro bioassay*. Mar Pollut Bull, 2010. **60**(7): p. 1092-8.
205. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radical Bio Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-616.
206. Flohe, L. and W.A. Gunzler, *Assays of glutathione peroxidase*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 114-21.
207. Yagi, K., *Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma*. Methods Mol Biol, 1998. **108**: p. 101-6.
208. Bolger, R., et al., *Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(9): p. 551-7.
209. Checovich, W.J., R.E. Bolger, and T. Burke, *Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 254-256.



210. Seifert, M., S. Haindl, and B. Hock, *Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens*. *Anal Chim Acta*, 1999. **386**(3): p. 191-199.
211. Ackermann, G.E., E. Brombacher, and K. Fent, *Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents*. *Environ Toxicol Chem*, 2002. **21**(9): p. 1864-75.
212. Rutishauser, B.V., et al., *Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids*. *Environ Toxicol Chem*, 2004. **23**(4): p. 857-64.
213. Gracia, T., et al., *The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2006. **65**(3): p. 293-305.
214. Körner, W., et al., *Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien*, in *Projekt Umwelt und Gesundheit PUG U 95 004*. 1999. p. 104.
215. Soto, A.M., et al., *The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants*. *Environmental Health Perspectives*, 1995. **103**(SUPPL. 7): p. 113-122.
216. Kanayama, T., et al., *Basis of a high-throughput method for nuclear receptor ligands*. *J Biochem*, 2003. **133**(6): p. 791-7.
217. Fine, T., et al., *Luminescent yeast cells entrapped in hydrogels for estrogenic endocrine disrupting chemical biodetection*. *Biosens Bioelectron*, 2006. **21**(12): p. 2263-9.
218. Murata, T. and K. Yamauchi, *3,3',5-Triiodo-L-thyronine-like activity in effluents from domestic sewage treatment plants detected by in vitro and in vivo bioassays*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **226**(3): p. 309-17.
219. Gutleb, A.C., et al., *T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005. **19**(2): p. 231-8.
220. Schoff, P.K. and G.T. Ankley, *Inhibition of retinoid activity by components of a paper mill effluent*. *Environ Pollut*, 2002. **119**(1): p. 1-4.
221. Inoue, D., et al., *Screening of agonistic activities against four nuclear receptors in wastewater treatment plants in Japan using a yeast two-hybrid assay*. *J Environ Sci-China*, 2011. **23**(1): p. 125-132.
222. NWC, *A national approach to health risk assessment, risk communication and management of chemical hazards from recycled water. Waterlines Report Series No 48. National Water Commission, Canberra, Australien*. 2011.
223. Kontana, A., et al., *Effectiveness of ozonation and chlorination on municipal wastewater treatment evaluated by a battery of bioassays and biomarkers*. *Water Sci Technol*, 2009. **60**(6): p. 1497-505.
224. Manger, R.L., et al., *Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins*. *Anal Biochem*, 1993. **214**(1): p. 190-4.
225. Nagy, S.R., et al., *Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of ah receptor agonists*. *Toxicol Sci*, 2002. **65**(2): p. 200-10.



226. Ulitzur, S., T. Lahav, and N. Ulitzur, *A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity*. Environ Toxicol, 2002. **17**(3): p. 291-6.
227. Wadhia, K., T. Dando, and K.C. Thompson, *Intra-laboratory evaluation of Microbial Assay for Risk Assessment (MARA) for potential application in the implementation of the Water Framework Directive (WFD)*. J Environ Monit, 2007. **9**(9): p. 953-8.
228. Nielsen, M.H. and J. Rank, *Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the Allium test*. Hereditas, 1994. **121**(3): p. 249-254.
229. Wang, W.C., *Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants*. Environ Toxicol Chem, 1987. **6**(5): p. 409-414.
230. Janssen, C.R. and G. Persoone, *Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1993. **12**(4): p. 711-717.
231. Bundschuh, M., J.P. Zubrod, and R. Schulz, *The functional and physiological status of Gammarus fossarum (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater*. Environmental Pollution, 2011. **159**(1): p. 244-249.
232. Migliore, L., et al., *Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia*. Water Res, 1997. **31**(7): p. 1801-1806.
233. Lowell, R.B. and J.M. Culp, *Cumulative effects of multiple effluent and low dissolved oxygen stressors on mayflies at cold temperatures*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1999. **56**(9): p. 1624-1630.
234. Duft, M., et al., *Entwicklung eines Sedimentbiotests mit der Zwergdeckelschnecke Potamopyrgus antipodarum (Gastropoda: Prosobranchia)*. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, 2002. **14**(1): p. 12-17.
235. Farcy, E., et al., *An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel Mytilus edulis L. in the Vilaine estuary, France*. Environ Sci Pollut Res Int, 2013. **20**(2): p. 630-50.
236. OECD, *OECD Guidelines for the testing of chemicals 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment*. 2007.
237. Carlsson, G., S. Orn, and D.G. Larsson, *Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates*. Environ Toxicol Chem, 2009. **28**(12): p. 2656-62.
238. ASTM, *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibian*. ASTM International. 2008.
239. Marques, S.M., F. Goncalves, and R. Pereira, *Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of Rana perezi Seoane*. Sci Total Environ, 2008. **402**(1): p. 29-35.
240. OECD, *OECD Guideline for testing of chemicals 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. 1992.
241. Muncke, J., *Der MolDarT - ein neuer Toxizitätstest*. 2008, Eawag: Dübendorf. p. 3.
242. Thorpe, K.L., et al., *Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Environ Toxicol Chem, 2000. **19**(11): p. 2812-2820.



243. Katsiadaki, I., et al., *Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens*. Environ Health Perspect, 2006. **114**: p. 115-121.
244. Lu, G.H., et al., *Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section)*. Chemosphere, 2010. **80**(9): p. 982-90.
245. Petala, M., et al., *Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents*. Water Res, 2009. **43**(20): p. 5063-74.
246. Brogdon, W.G., J.C. McAllister, and J. Vulule, *Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance*. J Am Mosq Control Assoc, 1997. **13**(3): p. 233-7.
247. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 407-21.
248. Fitzpatrick, P.J., et al., *Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L), as potential organic pollution biomarkers*. Biomarkers, 1997. **2**(1): p. 51-56.
249. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
250. Amiard, J.C., et al., *Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers*. Aquatic Toxicology, 2006. **76**(2): p. 160-202.
251. Scheuhammer, A.M. and M.G. Cherian, *Quantification of metallothionein by silver saturation*. Methods Enzymol, 1991. **205**: p. 78-83.



## 8 Glossar

AA-EQS	Chronisches Umweltqualitätskriterium (annual average environmental quality standard)
AAEV	Abwasseremissionsverordnung (Österreich)
AbwV	Abwasserverordnung (Deutschland)
AChE	Acetylcholinesterase
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ARA	Abwasserreinigungsanlage
Beas-2B	Zelllinie aus menschlichem Bronchial-Zellgewebe
BEQ	Bioanalytische Äquivalenzkonzentration ( <i>Bioanalytical equivalent concentration</i> )
CALUX	<i>Chemically activated luciferase gene expression</i>
CAFLUX	<i>Chemically activated fluorescent expression</i>
CFDA-AM	Carboxyfluorescein Diacetat, Acetoxymethyl Ester
CQK	Chronisches Qualitätskriterium (vergleichbar mit dem AA-EQS)
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cyp1a	Enzym aus der Cytochrom P450-Familie, das eine wichtige Rolle bei der Verstoffwechslung von Schadstoffen spielt
DEQ	Diuron-Äquivalenzkonzentration (diuron equivalent concentration)
DR	Dioxinrezeptor
DTA	<i>Direct Toxicity Assessment</i>
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EA	Endokrine Aktivität
EC	Effektkonzentration oder Wirkkonzentration
ECx	Konzentration bei welcher ein x%-iger Effekt induziert wird, wobei der Maximaleffekt des Standards 100% entspricht
EE2	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol
EEQ	17 $\beta$ -Estradiol-Äquivalenzkonzentration ( <i>17<math>\beta</math>-estradiol equivalent concentration</i> )
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
EQS	Umweltqualitätskriterium ( <i>environmental quality standard</i> )
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
FCMN(M)N	<i>flow cytometry-based micronucleus (FCMN) assay</i>
GPX	Glutathion-Peroxidase
GSchV	Gewässerschutzverordnung
GSH	Glutathion
H4IIE	Zelllinie aus Leberkrebszellen
H4IIE-luc	Zelllinie aus Leberkrebszellen mit eingebauten Reporter gen für das Enzym Luciferase
HEP	Leberzellen (Hepatozyten)
HLB	<i>hydrophilic lipophilic balance</i>
IL	Interleukin
IPPC	<i>Integrated Pollution Prevention Control</i>
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
LDH	Laktatdehydrogenase





LOD	Detektionslimite oder Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	Quantifizierungslimite oder Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantification</i> )
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion ( <i>Liquid liquid extraction</i> )
MSK	Modul-Stufen-Konzept
MTT	Dimethyl-Thiazolyl-Diphenyl-Tetrazolium-Salz
NPDES	<i>National Pollutant Discharge Elimination Systems</i>
NRL	<i>Nuclear receptor ligand</i>
NRU	Aufnahme von Neutralrot ( <i>Neutral Red Uptake</i> )
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
P53	Tumor-Protein p53
PAM	Pulsamplitudenmodulation
PI	Propidiumiodid
PSII	Photosystem II
PP2A	Proteinphosphatase
PR	Progesteron-Rezeptor
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion ( <i>real-time polymerase chain reaction</i> oder <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RIWA	<i>Association of River Waterworks</i>
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SCE	Schwesterchromatid-Austausch ( <i>sister chromatid exchange</i> )
SH-SY5Y	menschliche Neuroblastoma (Krebs)-Zelllinie
SOP	Standardarbeitsanweisung ( <i>standard operating procedure</i> )
SPE	Festphasenextraktion ( <i>solid phase extraction</i> )
TEQ	Toxische Äquivalenzkonzentration ( <i>toxic equivalent concentration</i> )
TR	Thyroidhormonrezeptor
TTR	Transthyretin
Vtg	Vitellogenin
WET	<i>Whole Effluent Toxicity</i>
YAS	<i>Yeast Androgen Screen</i> (Hefezellandrogentest)
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i> (Hefezellöstrogentest)
ZRP	<i>zona radiata proteins</i>



## 9 Verzeichnisse

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick über verschiedene biologische Ansätze zur Messung der Toxizität von Chemikalien und ihren Effekten in der aquatischen Umwelt (nach [8]).	2
Abb. 2: Überblick über Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität und die Struktur des Berichts.	6
Abb. 3: Beispiel einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit den Toxizitätsparametern NOEC, LOEC und EC <sub>50</sub> .	10
Abb. 4: Überblick über wichtige Wirkungen, die mit Biotests erfasst werden können.	21
Abb. 5: Überblick über das Vorgehen zur Probenahme und -aufbereitung.	57

### 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich von Möglichkeiten und Grenzen von Biotests im Vergleich zu chemischer Analytik (angepasst nach [11]).	3
Tab. 2: Überblick über in verschiedenen EU-Ländern in der Regulatorik verwendete Biotests.	12
Tab. 3: Überblick über in Nicht-EU-Ländern in der Regulatorik verwendete Biotests.	13
Tab. 4: In vitro-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.	14
Tab. 5: In vivo-Biotests: Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests, Testorganismen und messbare Effekte.	15
Tab. 6: In vivo-Biotests zur Erfassung von allgemeiner Toxizität und von herbiziden Wirkungen: Beurteilung von in der Regulatorik verwendeten Tests basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	20
Tab. 7: In vitro-Biotests, die bereits häufig auf Abwasser und Oberflächengewässer angewendet wurden.	22
Tab. 8: In vivo-Biotests, die bereits häufig auf Abwasser und Oberflächengewässer angewendet wurden.	24
Tab. 9: Zusammenfassung der für eine Anwendung zur Gewässerbeurteilung geeigneten Biotests, Testorganismen und messbaren Effekte.	33
Tab. 10: Überblick über in Deutschland regulatorisch verwendete Biotests.	58
Tab. 11: Überblick über in England und Wales regulatorisch verwendete Biotests.	59
Tab. 12: Überblick über in Schweden verwendete Biotests.	60
Tab. 13: Überblick über in den USA regulatorisch verwendete Biotests.	61
Tab. 14: Überblick über in Kanada regulatorisch verwendete Biotests.	62
Tab. 15: Überblick über in Australien und Neuseeland regulatorisch verwendete Biotests.	63
Tab. 16: In vitro-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).	64
Tab. 17: In vivo-Biotests die bereits auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden.	69
Tab. 18: Biotests zur Untersuchung von endokrinen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	72
Tab. 19: Biotests zur Untersuchung von Gentoxizität / Mutagenität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	73
Tab. 20: Biotests zur Untersuchung von neurotoxischen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	75
Tab. 21: Biotests zur Untersuchung von Dioxin-ähnlichen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	76
Tab. 22: Biotests zur Untersuchung von Immuntoxizität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.	77



## Anhang 1 Informationen zu den Auswahlkriterien

Für die Beurteilung der Biotests basierend auf den oben genannten Kriterien wurden, basierend auf den folgenden Referenzen [11, 145-150] weitere Details/Definitionen zu den einzelnen Punkten herangezogen:

1. **Anwendbarkeit für Umweltproben:** Hat sich die Methode als auf Umweltproben anwendbar erwiesen?

2. **Empfindlichkeit:**

**Empfindlichkeit (für kategorische (ja/nein) Ergebnisse):** Der Anteil aller positiven / aktiven Wirkstoffe, die durch den Test korrekt eingestuft werden.

**Empfindlichkeit (für kontinuierliche Ergebnisse):** Geringe Detektions- und Quantifizierungslimite (LOD bzw. LOQ).

**Nachweisgrenze (LOD):** Die minimale Menge an Aktivität im Biotest, die noch zuverlässig gemessen, aber nicht zwangsläufig quantifiziert werden kann (innerhalb der für Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit festgelegten Grenzen).

**Bestimmungsgrenze (LOQ):** Die minimale Menge an Aktivität im Biotest, die noch zuverlässig quantifiziert werden kann. Die Bestimmungsgrenze hat immer eine höhere Genauigkeit als die Nachweisgrenze.

Ist die Empfindlichkeit niedrig genug, so dass native Proben im Test untersucht werden können, oder ist eine Probenvorbehandlung notwendig? Falls eine Vorbehandlung nötig ist: Sind Methoden verfügbar und validiert um die aktiven Verbindungen aufkonzentrieren / extrahieren zu können?

3. **Robustheit**

**Robustheit:** Beschreibt die Empfindlichkeit eines Verfahrens in Bezug auf die Variabilität der Versuchsbedingungen und bewertet damit die Übertragbarkeit einer Methode auf andere Personen und Labore. Sie gibt einen Hinweis auf die Fähigkeit des Tests verlässliche Ergebnisse unter leicht variierenden Bedingungen zu produzieren. Der Wert für die Robustheit wird als Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen Laboren berechnet.

**Reproduzierbarkeit:** Die Übereinstimmung zwischen Ergebnissen, die bei der Prüfung des gleichen Stoffes mit dem gleichen Testprotokoll oder unter identischen Bedingungen erhalten wurden, jedoch durchgeführt von unterschiedlichen Personen, an unterschiedlichen Tagen und auch unterschiedlichen Orten. Dieser Parameter kann auf verschiedenen Ebenen untersucht werden: a) Reproduzierbarkeit / Variabilität zwischen Laboren; b) Reproduzierbarkeit / Variabilität innerhalb eines Labors.

**Genauigkeit:** Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Er ist ein Mass für die Leistungsfähigkeit der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz.

**Selektivität:** Dies ist ein Mass für die Wechselwirkung mit der Probenmatrix und charakterisiert, wie stark die Analyse durch die Anwesenheit anderer Verbindungen beeinflusst wird.

**Spezifität:** Der Anteil aller negativen / inaktiven Stoffe, die durch den Test korrekt eingestuft werden (d.h. das Fehlen von falsch-positiven Messwerten). Es ist ein Mass der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorischen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Relevanz einer Prüfmethode.



**4. Grad der Validierung / Standardisierung:**

**Validierung (Standardisierung)** bezieht sich auf Studien, die durchgeführt wurden, um die Zuverlässigkeit und Relevanz eines bestimmten Ansatzes, Verfahrens, Prozesses oder einer Beurteilung nachzuweisen.

**5. Kosteneffizienz und gute routinemässige Anwendbarkeit**

Kostenüberlegungen sollte beinhalten: Probenahme / Vorbehandlung, Investitionen (Geräte), Verbrauchsmaterialien und die Zeit, die für die Pflege, Vorbereitung und den Betrieb des Testverfahrens notwendig sind.

**6. Anwendbarkeit in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren**

Erfordern die Methoden hoch qualifiziertes Personal und teure Versuche oder spezielle Lizenzen für Labore, die die Tests durchführen?



## Anhang 2 Proben transport, -lagerung und -vorbereitung

Proben transport, -lagerung und -vorbereitung für die Biotests sind abhängig von der gewählten Methode. In Abb. 5 ist das Vorgehen von der Probenahme, -lagerung und -aufbereitung von Wasserproben bis hin zur Analyse im Biotest als Übersicht abgebildet.

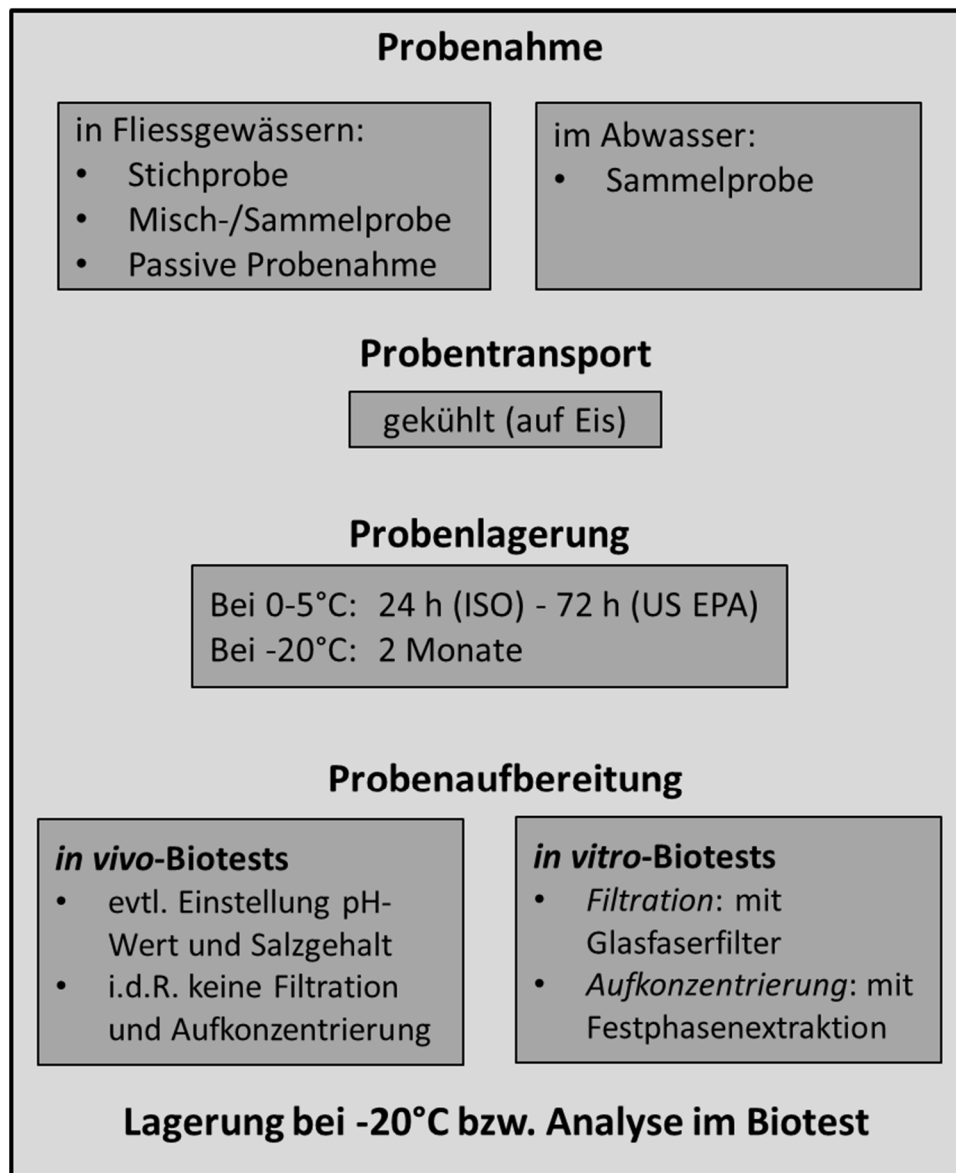


Abb. 5: Überblick über das Vorgehen zur Probenahme und -aufbereitung.

Detaillierte Informationen zur **Probenahme** finden sich in Götz et al. [1] und Wittmer et al. [2] und in der ISO-Richtlinie 5667-10 [151]. Geeignete Methoden und Hinweise für den **Transport und die Lagerung von Proben** sind in der ISO-Richtlinie 5667-3 [152] und in Götz et al. [1] beschrieben. Informationen zur **Probenaufbereitung** für *in vivo*-Biotests finden sich in den jeweiligen Testrichtlinien (z.B. ISO oder OECD). Einzelheiten zur Festphasenextraktion (*Solid phase extraction*, SPE) oder Flüssig-Flüssig-Extraktion (*Liquid liquid extraction*, LLE) für *in vitro*-Biotests finden sich in [153, 154].



## Anhang 3 Überblick über in der Regulatorik verwendete Biotests in einzelnen Ländern

### EU: Biotests zur Bewertung von Abwasser, Sedimenten und Altlasten

**Dänemark** wendet Toxizitätstest auf Abwässer von grösseren Industrieanlagen an [36]. Es existiert eine Richtlinie, die in einem ersten Schritt die Anwendung von akuten Biotests mit mindestens drei Arten empfiehlt (Leuchtbakterien, Algen, Krebstiere, Fische). In einem zweiten Schritt kann die biologische Prüfung des Abwassers auf chronische Tests und weitere Arten (Insekten, Mollusken, Pflanzen, Protozoen, Würmer) ausgeweitet werden [155].

In **Deutschland** sind in der Abwasserverordnung (AbwV) [33] Biotests mit Leuchtbakterien, Algen, Wasserflöhen und Fischembryonen vorgeschrieben (Tab. 10). Zur Untersuchung einer möglichen Gentoxizität von Abwasser der chemischen Industrie wird zusätzlich der Umu-Test mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* [45] eingesetzt. Mit diesen Biotests müssen Industriebetriebe, Kläranlagenbetreiber und sonstige Abwassereinleiter die Giftigkeit ihrer Abwässer prüfen. Für das Gesamt-abwasser sind Anforderungen festgelegt, die von den Einleitern eingehalten werden müssen. Die Toxizität des Abwassers geht, zusammen mit weiteren physikalisch-chemischen Parametern wie z.B. Gesamtphosphor, Gesamtstickstoff, chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) und Gehalt an absetzbaren Stoffen, in die Berechnung der Abwassergebühren ein, ggfs. werden Starkverschmutzerzuschläge erhoben [156].

Tab. 10: Überblick über in Deutschland regulatorisch verwendete Biotests.

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primärproduzenten	Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen (ISO 8692)	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	[73]
Primärkonsumenten	Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von <i>Daphnia magna</i> Straus ( <i>Cladocera, Crustacea</i> ) – Akuter Toxizitäts-Test (ISO 6341)	<i>Daphnia magna</i>	[49]
Sekundärkonsumenten	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (ISO 15088)	<i>Danio rerio</i>	[68]
Destruenten	Leuchtbakterientest (ISO 11348)	<i>Aliivibrio fischeri</i>	[48]
<i>In vitro</i> -Biotests	Umu-Test (ISO 13829)	<i>Salmonella typhimurium</i>	[45]



**England und Wales** wenden eigene, standardisierte biologische Testmethoden im Rahmen der Lizenzierung unter IPPC (*Integrated Pollution Prevention Control*) an [35] (Tab. 11). Das biologische Beurteilen von Abwässern wird „*Direct Toxicity Assessment (DTA)*“ genannt.

**Tab. 11: Überblick über in England und Wales regulatorisch verwendete Biotests.**

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primärproduzenten	The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> freshwater algal growth inhibition test	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	[60]
Primärkonsumenten	The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the juvenile <i>Daphnia magna</i> immobilisation test	<i>Daphnia magna</i>	[50]

In **Finnland** werden in einzelnen Fällen Toxizitätstests bei der Bewilligung von Industrieabwassereinleitungen angewendet. Es bestehen jedoch keine gesetzlichen Vorgaben zu Toxizitätslimiten und Reduktionsmassnahmen [36].

In **Frankreich** werden Biotests lokal zur Beurteilung von Abwässern und Oberflächengewässern angewendet (z.B. [157-159]). Es existieren keine gesetzlichen Vorgaben.

**Irland** wendet Biotests im Rahmen der Lizenzierung unter IPPC bei gewissen grossen Industrie- und Landwirtschaftsbetrieben und bei Abwasserreinigungsanlagen an [38, 160]. Für die anfängliche Prüfung des Abwassers wird eine Testbatterie von mindestens vier aquatischen Arten eingesetzt. Die zwei sensitivsten Arten werden danach für die weitere Überwachung verwendet [161]. Die Biotests werden nach standardisierten, internationalen Methoden durchgeführt [38].

In **Litauen** müssen Abwässer auf ihre akute Toxizität gegenüber *Daphnia magna* getestet werden [36].

In den **Niederlanden** sind Biotests zur Überwachung von Abwasser und der Oberflächengewässerqualität nicht gesetzlich vorgeschrieben. Es werden jedoch verschiedene Biotests zur Überwachung der Gewässerqualität eingesetzt. Beispielsweise wurde von 1987-2000 die Gentoxizität der Flüsse Rhein und Maas mit dem Ames T98-Test, dem Umu-Test und dem Comet-Assay durch die *Association of River Waterworks (RIWA)* überwacht [162], auch werden Biotests mit Leuchtbakterien, Algen und Krebstieren dort seit mehreren Jahren eingesetzt [163]. Hormonelle Aktivitäten wurden exemplarisch mit verschiedenen CALUX-Tests überwacht [164]. Kürzlich wurde ein Konzept zum „*Smart Monitoring*“ der Wasserqualität vorgeschlagen (van der Oost et al. 2012) bei dem sowohl chemische Messungen, als auch Biotests für akute und spezifische Toxizität eingesetzt werden sollen.

In **Österreich** werden gemäß Abwasseremissionsverordnung (AAEV) Leuchtbakterien, Algen, Wasserflöhe und ein akuter Fischtest zur Toxizitätsbeurteilung eingesetzt [34].

**Schweden** wendet seit 1989 biologische Testsysteme auf Abwässer bei der Zulassung von grösseren industriellen Anlagen an [36]. Das Verfahren ist abgestuft. Falls in einem ersten Schritt mit akuten Biotests nachteilige Effekte beobachtet werden, werden in einer nächsten Stufe weitere Biotests angewendet, usw. In [165] sind zahlreiche Tests für limnische Organismen aufgelistet (Tab. 12). Es ist unklar, welche dieser Tests tatsächlich für regulatorische Zwecke verwendet werden.



**Tab. 12: Überblick über in Schweden verwendete Biotests.**

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primär-produzenten	Algen-Wachstumshemmtest	<i>Selenastrum, Monoraphidium, Chlorella, Scenedesmus</i>	[59, 166]
	Wasserlinsen-Wachstumshemmtest	<i>Lemna minor</i>	[63]
	Allium-Mutagenitätstest	<i>Allium cepa</i>	[167]
	Linsen-Wachstumshemmtest	<i>Lens culinaris</i>	[168]
Primär-konsumenten	Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von <i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	[49, 169]
	Bestimmung von akuter Toxizität auf <i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[170]
	7-Tage Fortpflanzungstest mit <i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[171]
Sekundär-konsumenten	Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen auf Süßwasserfische	<i>Danio rerio, Pimephales promelas, Oncorhynchus mykiss</i>	[172]
	Determination of embryo-larval toxicity to freshwater fish	<i>Danio rerio</i>	[173]
	Fish Prolonged Toxicity Test	unbekannt	[174]
	A new fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> ) subchronic toxicity test	<i>Pimephales promelas</i>	[175]
	Toxische Effekte von Metallen auf Fische	Lachs, Forelle, Barsch	[176]
	Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair the reproductive success in fish	<i>Danio rerio</i>	[177]
	Physiologische Veränderungen: Einleiterkontrolle, Blutbild bei Fischen Morphologische Veränderungen: Einleiterkontrolle, Rückenschäden bei Fischen	Lachs, Forelle	[178, 179]
	Geschmacksveränderungen bei Fischen: Einleiterkontrolle, Geschmack und Geruch	Lachs, Forelle	[180]
	Morphologische Veränderungen: Asymmetrien bei Fischen / Aussenliegende sichtbare Krankheitssymptome bei Fischen	Lachs, Forelle	[181, 182]
Destruenten	Leuchtbakterientest	<i>Vibrio fischeri</i>	
<i>In vitro</i> -Biotests	Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test)	<i>Salmonella typhimurium</i>	[88]
Biotische Gemeinschaft	A simple, community level, ecotoxicological test system using samples of periphyton		[183]





### Schweiz: Biotests zur Bewertung von Abwasser, Sedimenten und Altlasten

In der Schweiz sind ökotoxikologische Testsysteme zur Bewertung von Abwasser oder Sedimenten bisher nicht gesetzlich vorgeschrieben. Biotests werden aber zur Bewertung von Sickerwasser und Eluaten von belasteten Standorten (z.B. Altlasten und Deponien) in einer Vollzugshilfe vorgeschlagen [184]. Diese empfiehlt die Anwendung einer Basis-Testreihe (Leuchtbakterien, Algen, Krustentiere) und in bestimmten Fällen ergänzende Untersuchungen zur Gentoxizität oder chronischen Toxizität.

### USA: Biotests zur Bewertung von Abwasser und Oberflächengewässern

In den USA müssen für die Zulassung von kommunalen und industriellen Abwasseranlagen (*National Pollutant Discharge Elimination Systems*, NPDES) die Abwässer auch biologisch geprüft werden. Die dafür zugelassenen Biotests sind von der US EPA [39] ratifiziert. Die regulatorische Anwendung der Tests umfasst auch die Beurteilung von Oberflächengewässern (*receiving waters*) [185]. In den USA wird die biologische Prüfung von Abwässern „*Whole Effluent Toxicity (WET) Testing*“ genannt. Folgende Biotests mit limnischen Organismen stehen dafür zur Verfügung und werden von Fall zu Fall durch die lokalen Behörden der Bundesländer vorgeschrieben (Tab. 13):

Tab. 13: Überblick über in den USA regulatorisch verwendete Biotests.

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primärproduzenten	Green alga, <i>Selenastrum capricornutum</i> , growth (1003.0)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	[61]
Primärkonsumenten	<i>Ceriodaphnia dubia</i> acute (2002.0)	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[52]
	<i>Daphnia pulex</i> and <i>Daphnia magna</i> acute (2021.0)	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia pulex</i>	[52]
	<i>Daphnia</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , survival and reproduction (1002.0)	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[61]
Sekundärkonsumenten	Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> , and Bannerfin shiner, <i>Cyprinella leedsi</i> , acute (2001.0)	<i>Cyprinella leedsi</i> , <i>Pimephales promelas</i>	[52]
	Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i> , and brook trout, <i>Salvelinus fontinalis</i> , acute (2019.0)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salvelinus fontinalis</i>	[52]
	Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> , larval survival and growth (1000.0)	<i>Pimephales promelas</i>	[61]
	Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> , embryo-larval survival and teratogenicity (1001.0)	<i>Pimephales promelas</i>	[61]

**Kanada: Biotests zur Bewertung von Abwasser und Oberflächengewässern**

In Kanada ist für einige Industriesektoren die biologische Prüfung der Abwässer/Oberflächengewässer gesetzlich vorgeschrieben [41, 42, 186] (Tab. 14). Die Methoden umfassen neben akuten und chronischen Biotests mit einzelnen Arten auch die Bestimmung von Toxinen im Fischgewebe sowie die Identifizierung der Fisch- und Invertebraten-Lebensgemeinschaft in Oberflächengewässern.

**Tab. 14: Überblick über in Kanada regulatorisch verwendete Biotests.**

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primär- produzenten	Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using a Freshwater Alga" (EPS 1/RM/25)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	[62]
	Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, <i>Lemna minor</i> (EPS1/RM/37)	<i>Lemna minor</i>	[64]
Primär- konsumenten	Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to <i>Daphnia magna</i> (EPS1/RM/14)	<i>Daphnia magna</i>	[51]
	Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran <i>Ceriodaphnia dubia</i> (EPS 1/RM/21)	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[66]
Sekundär- konsumenten	Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout (EPS1/RM/13)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	[54, 55]
	Test of Larval Growth and Survival Using Fathead Minnows (EPS 1/RM/22)	<i>Pimephales promelas</i>	[70]
	Biological Test Method: Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout) (EPS 1/RM/28),	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	[71]



### Australien und Neuseeland: Biotests zur Bewertung von Abwasser und Oberflächengewässern

Die biologische Beurteilung von Abwässern ist in Australien und Neuseeland nicht zwingend vorgeschrieben. Regionale Behörden setzen jedoch für die Prüfung und Lizenzierung von einzelnen Abwasseranlagen zusätzlich Biotests ein [185]. Die Umweltbehörde von New South Wales wendet zu diesem Zweck hauptsächlich den Microtox®-Test an, eine kommerzielle Version des Leuchtbakterientests [43]. Neuseeland hat bereits eine eigene Serie von Standardmethoden mit einheimischen Arten entwickelt [44] (Tab. 15).

**Tab. 15: Überblick über in Australien und Neuseeland regulatorisch verwendete Biotests.**

Ernährungs-ebene	Beschreibung	Art	Richtlinie oder Referenz
Primärproduzenten	Freshwater Algae ( <i>Selenastrum capricornutum</i> ) Chronic Toxicity Test	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	[44]
Primärkonsumenten	Freshwater Cladoceran ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> ) Acute Toxicity Test	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	[44]
	Freshwater Amphipod ( <i>Paracalliope fluviatilis</i> ) Acute Toxicity Test	<i>Paracalliope fluviatilis</i>	[44]
Sekundärkonsumenten	Freshwater Fish ( <i>Gobiomorphus cotidianus</i> ) Acute Toxicity Test	<i>Gobiomorphus cotidianus</i>	[44]
Destruenten	Leuchtbakterientest	<i>Vibrio fischeri</i>	Microtox®



## Anhang 4 Überblick über weitere Tests für Abwasser- und Oberflächengewässerproben

Tab. 16: *In vitro*-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).

Effektklasse	Testname	Organismus/Zelllinien	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Zytotoxizität	Alamar Blue Assay <sup>1</sup> (Resazurinreduktionsassay)	Fisch- oder menschliche Zelllinien	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>Messung der metabolischen Aktivität durch Fluoreszenz</i> )	1 - 3 d		[187]
	Neutralrot-Test (NRU) <sup>1</sup>	Fisch- oder menschliche Zelllinien	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>Aufnahmefähigkeit eines Farbstoffes in Lysosomen; kolorimetrische Messung</i> )	< 3 h		[82]
	CFDA-AM Assay <sup>1</sup>	Fischzelllinie	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>Messung der Membranstabilität durch Fluoreszenz</i> )	1 - 3 d		[187]
	LDH Zytotoxizitätsassay <sup>1</sup>	Menschliche Leberzellen	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>kolorimetrische Messung des LDH-Verlusts von lysierten Zellen</i> )	1 h	LDH = Laktatdehydrogenase	[83]
	MTT Assay <sup>1</sup>	div. menschliche und tierische Zelllinien	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>kolorimetrische Messung der metabolischen Aktivität</i> )	24 h		[79]
	Kombinierter Alamar blue/CFDA-AM Assay	Fischzelllinie	Lebensfähigkeit von Zellen ( <i>Messung der metabolischen Aktivität und Membranstabilität durch Fluoreszenz</i> )	1 - 3 d		[187]
	Zytotoxizitätsassay mit Säugetierzellen	Ovarzelllinie des Chinesischen Hamsters	Zellwachstumshemmung ( <i>kolorimetrische Messung der Zelldichte</i> )	72 h		[188]
	SRB Assay	Tumorzelllinie der Maus menschliche, fötale Lungenzelllinie	Zellwachstum, korreliert mit Proteingehalt ( <i>Proteinfärbung wird kolorimetrisch gemessen</i> )	1 h	SRB = Sulforhodamin B	[189]
Hepatotoxizität (Effekte auf Leberzellen)	PP2A Assay	Enzym aus Skelettmuskelzellen vom Hase	Hemmung der Proteinphosphatase (PP2A) ( <i>kolorimetrische Messung</i> )	1.5 h		[190]
Mutagenität (Genmutationen)	Ames-Test mit Bakterien <sup>1</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> (gentechnisch verändert)	Anzahl an rückmutierten Kolonien ( <i>Anzahl Kolonien oder kolorimetrische Messung</i> )	48 h	div. mutierte Stämme mit untersch. Spezifität; kommerzielle Kits verwenden Stammkombinationen (Xenomatrix)	[191]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 16 Fortsetzung: In vitro-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).**

Effektklasse	Testname	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Mutagenität (Genmutationen)	Alternative mutagenicity test	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7 diploid strain	Bildung von „mutagenspezifischen“ Kolonien auf selektiven Medien			[192]
	Sister chromatid exchange (SCE) induction	Lungenzellen des Chinesischen Hamsters	SCE Induktion (gemessen mit fluoreszierender Färbung)	48 h		[114]
Gentoxizität (strukturelle DNA-Schäden)	FCMN(M)N Assay	Menschliche Lymphoblastzellen	Bildung von Mikronuklei (Messung mit Durchflusszytometrie)	3 d		[112]
	SOS Chromotest <sup>1</sup>	<i>Escherichia coli</i>	Induktion der SOS Antwort der Zelle (kolorimetrische Messung)	3 h		[193]
	Fpg-modifizierter Comet-Assay	Fischzelllinien	DNA-Schäden (über Gel-Elektrophorese)	24 h		[194]; [195]
	Alkaline Yeast Comet	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Strukturelle Schädigung der DNA	div.	gleich wie Comet-Assay, scheint aber empfindlicher zu sein	[196]
	GreenScreen Assay <sup>1</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gentechnisch verändert)	DNA-Reparatur als Hinweis auf DNA-Strangbrüche (Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz)	16 - 20 h		[197]
	GreenScreen HC Assay	Menschliche Zelllinie (gentechnisch verändert)	DNA-Schädigung (Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz)	48 h	wahrscheinlich noch nicht auf Umweltproben angewandt	[198]
	Überleben von SOS defekten Bakterien	<i>Escherichia coli</i>	Wachstumshemmung durch DNA-Schädigung (Anzahl Kolonien)	24 h		[199]
Propidiumiodid (PI)-färbung	Säugetier/Fisch/menschliche Zelllinien	DNA-Fragmentierung (PI-Färbung der Fragmente wird mit Durchflusszytometrie gemessen)			[200]	

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 16 Fortsetzung: In vitro-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).**

Effektklasse	Testname	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Aktivität elektrophiler Schadstoffe	Glutathion (GSH) Assay <sup>1</sup>	Menschliche Leberzelllinie	Glutathionabbau (Fluoreszenzmessung)	5 min		[201]
	GSH reductase enzymatic recycling assay	Menschliche Zelllinie/ Fischzelllinie	Glutathionabbau (kolorimetrische Messung)	2 min	kann auch <i>in vivo</i> durchgeführt werden	[202]
	Differentieller Wachstums-hemmungsassay	<i>Escherichia coli</i> (gentechnisch verändert)	Wachstumshemmung (gentechnisch veränderte Bakterien haben eine höhere Empfindlichkeit als der Wildtyp)	3 h	spezifisch für reaktive Toxizität auf Proteine	[203]
Oxidativer Stress	ROS Assay	Menschliche Leberzelllinie/ Fischzelllinie	Bildung von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) (Oxidation von Substrat führt zu Fluoreszenz)	1 d	Mangel an Spezifität [11]	[204]; [205]
	Glutathion-Peroxidase (GPX) Assay <sup>1</sup>	Menschliche Leberzelllinie	Enzymaktivität (kolorimetrische Messung)	5 min	kann auch <i>in vivo</i> durchgeführt werden	[206]; [207]
Endokrine Aktivität	Rezeptorbindungs-assays	Isolierte Rezeptoren verschiedener Organismen inkl. des Menschen	Hormonaktivität (Dislokation von isotoopenmarkierten Liganden wird durch Szintillationszählung gemessen; alternativ mit Fluoreszenzpolarisation)	1 h	div. Assays	[208]; [209]; Review: [143]
	Enzyme-linked receptor assay	Östrogenrezeptor $\alpha$	Östrogene Aktivität (kolorimetrische Messung)	4 h		[210]
	CALUX10-Panel (ER $\alpha$ - + Anti-ER $\alpha$ -CALUX, AR- + Anti-AR-CALUX, GR- + Anti-GR-CALUX, PR- + Anti-PR-CALUX, PPAR $\gamma$ 1- + Anti-PPAR $\gamma$ 1-CALUX, TR $\beta$ -CALUX) <sup>1</sup>	Menschliche Zelllinie (gentechnisch verändert)	Aktivität verschiedener Hormone (Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz)	72 h		[93]
	Weitere Reporterassays mit menschlichen Zelllinien	Menschliche Zelllinie (gentechnisch verändert)	Östrogene und androgene Aktivität (Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz)		div. Assays	Reviews: [142]; [143]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab. 16 Fortsetzung: In vitro-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).**

Effektklasse	Testname	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Endokrine Aktivität	Östrogen-Reporter-Gen-Assay mit Fischzelllinie	Forellenzelllinie (gentechnisch verändert)	Östrogene Aktivität ( <i>ERα-Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz</i> )	48 h		[211]
	HEP-Zrp Assay	Fischzellen (Hepatozyten)	Östrogene Aktivität (Messung der Produktion von <i>Zona radiata</i> Proteinen (Zrp) mit ELISA)	72 h		[212]
	H295R Steroidogenesis Assay	Zelllinie aus menschlichen Nebennierenrinden-Krebszellen	Auswirkungen auf die Bildung von Steroidhormonen (Bildung von Estradiol und Testosteron)	72 h		[213]
	E-Screen	Menschliche Brustkrebszellen	Östrogen-abhängige Zellenvermehrung (Messung mit Alamar Blue/MTT Assay oder Durchflusszytometrie)	5 d		[214]; [215]
	Coactivator CoA-BAP/nuclear receptor ligand (NRL) assay	<i>Escherichia coli</i> (gentechnisch verändert)	Protein-Protein-Ligand (Schadstoff)-Interaktion (kolorimetrische Messung durch Alkaliphosphataseaktivität)	1 d		[216]
	Reporter-Gen-Assay mit immobilisierten Hefezellen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gentechnisch verändert)	Östrogene Aktivität ( <i>ERα-Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz</i> )	2.5 h		[217]
	TTR/TR Assay	Proteine (Transthyretin (TTR) und Thyroidhormonrezeptor (TR) von Frosch ( <i>Xenopus laevis</i> ))	Thyroidstörung (kompetitive Rezeptorbindung; durch Szintillationszählung gemessen)	1.5 h		[218]
	LUC Assay	Froschzelllinie ( <i>Xenopus laevis</i> ) (gentechnisch verändert)	Thyroidstörung (Fluoreszenz- und kolorimetrische Messung)	24 h		[218]
	T-Screen	Tumorzelllinie der Ratte	Thyroidstörung (Zellproliferation; gemessen mit Alamar Blue Assay)	96 h		[219]



**Tab. 16 Fortsetzung: In vitro-Biotests, die vereinzelt auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden (nach [11]).**

Effektklasse	Testname	Organismus/Zelllinie	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Entwicklungstoxizität	RAR/RXR Assay	Krebszellen von Mausembyro (gentechnisch verändert)	Retinoidaktivität (Rezeptorbindung an RAR führt zu Biolumineszenz)	24 - 48 h		[220]
	Yeast two-hybrid assays	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (gentechnisch verändert)	Retinoidsäureaktivität (Rezeptorbindung an RAR führt zu Biolumineszenz)	24 h		[221]
Immuntoxizität	Wachstumsassay mit Lymphoblastzellen (WIL2-NS TOX)	Menschliche Lymphoblastzellen	Lebensfähigkeit der Zellen (gemessen mit Alamar Blue Assay)	24 h		[222]
	Wachstumsassay mit Lymphozyten	Milzzellen der Maus	Zellvermehrung (radioaktive Markierung und Szintillationszählung)	72 h		[223]
	Interleukin-1 (IL-1) Produktionsassay	Thymozytenzellen der Ratte	Zellvermehrung (radioaktive Markierung und Szintillationszählung)	72 h		[223]
	Interleukin-2 (IL-2) Produktionsassay	Milzzellen der Maus	Zellvermehrung (radioaktive Markierung und Szintillationszählung)	90 h		[223]
	Cytokinproduktionsassay	Menschliche Leukämiezelllinie	Stimulation/Hemmung der Interleukin-Produktion (IL-1 $\beta$ ) (gemessen mit ELISA)	24 h		[222]
Neurotoxizität	Zytotoxizitätstest mit Neuroblastomazellen	Menschliche oder Maus-Neuroblastomazellen	Effekte auf Natriumkanäle (mit MTT Assay)	6 h		[224]
Reproduktions-toxizität	Zytotoxizitätsassays (MTT, LDH-Abfluss, u.a.)	Zellen der Geschlechtsorgane der Sprague-Dawley Ratte	Zellwachstum, Lebensfähigkeit der Zellen, LDH-Abfluss, Testosteronsekretion (Kolorimetrische/Fluoreszenzmessung)	variabel		Review: [11]
div.	AhR-CAFLUX	Tumorzelllinie der Ratte (gentechnisch verändert)	Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR)-spezifische Aktivität (Rezeptorbindung führt zu Biolumineszenz)	72 h		[225]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich





Tab. 17: In vivo-Biotests die bereits auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden.

Organismen- gruppe	Test	Organismus	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Bakterien	ToxScreen <sup>1</sup>	<i>Photobacterium leiognathi</i>	Störung der ATP-Bildung (Hemmung der Biolumineszenz)	1 h	Sensitiver als Microtox <sup>®</sup> -Test	[226]
Bakterien/Hefen	Mikrobieller Test für Risikobewertung (MARA)	Mehrere Arten (10 Bakterien, 1 Hefe)	Wachstumshemmung (kolorimetrische Messung)	18 h		[227]
Höhere Pflanzen	Test mit Kressesamen	Gartenkresse ( <i>Lepidium sativum</i> )	Wurzellänge	48 h		[99]
	Test mit Zwiebel	Zwiebel ( <i>Allium cepa</i> )	Wurzelwachstum und Chromosomenabberation (mikroskopisch)	120 h		[228]
	Test mit Gurken-, Kopfsalat- und Hirseseamen	Samen von Gurke ( <i>Cucumis sativus</i> ), Kopfsalat ( <i>Lactuca sativa</i> ), Hirse ( <i>Panicum miliaceum</i> )	Wurzelwachstum als Mass für Metalltoxizität	120 h		[229]
Krebstiere	<i>Daphnia magna</i> IQ Test	<i>Daphnia magna</i>	Hemmung einer Enzymreaktion (Fluoreszenzmessung)	2 h		[163, 230]
	Untersuchungen mit Bachflohkrebsen	Bachflohkrebs ( <i>Gammarus fossarum</i> )	Frassaktivität, Sterblichkeit	7 d		[231]
	Schlupfrate von Salzkrebschen	<i>Artemia franciscana</i>	Schlupfrate	48 h	Salz wird zu Süßwasserproben hinzugefügt	[232]
	Chydotox-Toxizitätstest	<i>Chydorus sphaericus</i>	Sterblichkeit	48 h		[101]
Insekten	Tests mit Eintagsfliegenlarven	z.B. <i>Baetis</i> sp.	Sterblichkeit, Wachstum, Frassaktivität, Schadstoffaufnahme	2 - 14 d		z.B. [21, 233]
Mollusken	Chronischer Schneckenreproduktionstest	Neuseeländische Sumpdeckelschnecke ( <i>Potamopyrgus antipodarum</i> )	Fortpflanzung, Sterblichkeit, Endokrine Disruption	28/56 d		[234]
	Benzo(a)pyren-Hydroxylase (BPH)-Aktivität	Verdauungsdrüsen von Miesmuscheln ( <i>Mytilus edulis</i> )	Benzo(a)pyren und verwandte PAHs (BPH-Aktivität durch Fluoreszenz)	wenige h	wild gefangene Individuen	[235]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab.17 Fortsetzung: In vivo-Biotests die bereits auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden.**

Organismen- gruppe	Test	Organismus	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Würmer	Lumbriculus-Reproduktionstest nach OECD Richtlinie 225	Glanzwurm ( <i>Lumbriculus variegatus</i> )	Fortpflanzung, Biomasse	28 d	im Durchfluss	[236]
Amphibien	Early Life Stage Test mit Fröschen	Krallenfrosch ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Sterblichkeit, Wachstum, Missbildungen	14 d		[237]
		Iberischer Wasserfrosch ( <i>Rana perezi</i> )	Sterblichkeit, Wachstum, Missbildungen, Verhalten, Pigmentierung	96 h		[238, 239]
	Genexpressionsassay mit Froschlarven	Krallenfrosch ( <i>Xenopus laevis</i> )	Thyroidstörung (Genexpression; RT-PCR)	48 h		[218]
Fische	Fish Early Life Stage Toxicity (FELST) Tests	Embryonen und Larven der Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Schlupfrate, Sterblichkeit, Missbildungen, Verhaltensveränderungen (Aufschwimmen der Larven), Wachstum (Länge und Gewicht), Vitellogenin	69 d	im Durchfluss	[240]
		Zebrabärblingsembryo ( <i>Danio rerio</i> )	Sterblichkeit, Pigmentierung, Bewegung, Herzrate, Schlupfzeit, Länge	6 d		[237]
	Molecular <i>Danio rerio</i> Teratogenicity (MolDarT) Assay	Zebrabärblingsembryo ( <i>Danio rerio</i> )	Sterblichkeit, Schlupfrate, Missbildungen, Vitellogenininduktion	120 h		[241]
	Test mit juvenilen Regenbogenforellen	Juvenile Regenbogenforelle ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Sterblichkeit, Wachstum, gonadosomatischer Index, hepasomatischer Index, Vitellogenin	21 d	Test mit Sedimenteluat	[242]
	Spiggin (Protein) Assay	Nierengewebe von Stichling ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )	Spiggin-Gehalt als Mass für androgene Aktivität (mit ELISA gemessen)	21 d		[243]
	E <sub>2</sub> Assay <sup>1</sup>	Blutproben von Goldfisch ( <i>Carassius auratus</i> )	E <sub>2</sub> -Konzentration als Mass für östrogene Aktivität (mit ELISA gemessen)	14 d		[244]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



**Tab.17 Fortsetzung: In vivo-Biotests die bereits auf Abwasser/Oberflächengewässer angewendet wurden.**

Organismen- gruppe	Test	Organismus	Messbarer Effekt (Endpunkt)	Testdauer	Bemerkung	Richtlinie oder Referenz
Fische	Glutathionperoxidaseassay <i>in vivo</i>	Leber und Nierenzellen der Regenbogenforelle ( <i>O. mykiss</i> )	Wie <i>in vitro</i> , aber Organismen <i>in vivo</i> exponiert (mit ELISA gemessen)	96 h		[245]
	Häm-Peroxidase-Aktivität	Leber und Nierenzellen der Regenbogenforelle ( <i>O. mykiss</i> )	Enzymaktivität gegen oxidativen Stress (kolorimetrische Messung)	96 h		[245, 246]
	Totaler Glutathiongehalt (GSH) <sup>1</sup>	Leber und Nierenzellen der Regenbogenforelle ( <i>O. mykiss</i> )	Glutathiongehalt als Mass für oxidativen Stress (kolorimetrische Messung)	96 h		[245]
	Lipidperoxidationssassay (LPO Assay) <sup>1</sup>	Leber und Nierenzellen der Regenbogenforelle ( <i>O. mykiss</i> )	Enzymaktivität als Mass für oxidativen Stress (kolorimetrische Messung)	96 h		[245, 247]
div.	Glutathion S-Transferase (GST) Aktivität <sup>1</sup>	Fische, Muscheln	Enzymaktivität zur Entfernung von elektrophilen Schadstoffen (kolorimetrische Messung)	96 h		[248], [249], [245]
Toxizität durch Metalle	Metallothioneinsynthese	Gewebe von Krebstiere, Mollusken, Würmern und Fischen	Metallothioneingehalt (gebundene Metalle werden durch Silber ersetzt; Silberkonzentration gemessen)	div.		[250] (review); [251]

<sup>1</sup> Kommerzielle Testkits erhältlich



## Anhang 5 Überblick über die Beurteilung der Biotests anhand der Auswahlkriterien

**Tab. 18: Biotests zur Untersuchung von endokrinen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot). Dazwischenliegende Ergebnisse: 1-2 hellgrün, 2-3 orange. n.d. nicht diskutiert

Kriterium	Test 1: Yeast Estrogen Screen (YES)	Test 2: In vitro-Biotests mit menschlichen Zelllinien (MELN, CALUX®-Tests, T47D KbluC)	Test 3: Vitellogenin-Induktion als Biomarker
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>			
<i>In situ</i> - oder Labortest?	Labor	Labor	<i>in situ</i> (männliche Fische)
<i>In vitro</i> / <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Wirkmechanismus / Endpunkt	Bindung an den Östrogen-Rezeptor (ER) und Aktivierung	Verschiedene Hormonrezeptoren zur Erfassung von Rezeptorbindung und -aktivierung	Hauptsächlich Östrogen-Rezeptor
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>			
Interpretierbarkeit	1	1	2
Relevanz	1	1	1
Vorausschauend	n.d.	Je nachdem	Je nachdem
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>			
Anwendbar auf Umweltproben	Ja	Ja	Ja
Proben-Vorbehandlung	Ja	Nein (für Abwasser) Ja (für Oberflächengewässer)	Nein
Empfindlichkeit	2	1	1
Robustheit	Offene Fragen zur Wiederholbarkeit Eher 1	1	2
Grad der Validierung / Standardisierung	2 (in Bearbeitung)	2 (in Bearbeitung)	1 (ELISA Methode) 3 (Freilandmethode)
Kosten / Kosteneffizienz	1	1-2	2-3
Gute routinemässige Anwendbarkeit	1	1-2	2-3
Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren	1	2	2



**Tab. 19: Biotests zur Untersuchung von Genotoxizität / Mutagenität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse: 1-2 hellgrün. n.d. nicht diskutiert

Bei den ersten drei Tests war die Beurteilung zwischen den beiden Diskussionsgruppen deutlich unterschiedlich. Daher sind in der Tabelle zwei Reihen für jeden Test aufgeführt.

Kriterium	Test 1: Ames-Fluktuations-Test		Test 2: Mikrokern-Test		Test 3: Umu-Test		Test 4: Comet-Assay
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>							
<i>In situ</i> - oder Labortest?	Labor		<i>in situ</i> -Biomarker		Labor		Beides
<i>In vitro</i> / <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		Beides		<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i> mit Freiland-Organismen (nicht-invasive Methode)
<b>Wirkmechanismus / Endpunkt</b>	Mutationen – DNA-Schädigung / Anzahl an rückmutierten Bakterienkolonien		Chromosomen-Aberrationen / Induktion von Mikrokernen		Induktion von DNA-Reparaturmechanismen (SOS-Antwort)		DNA-Schädigung (Elektrophorese), Biomarker für DNA-Reparatur und oxidativen Stress
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>							
<b>Interpretierbarkeit</b>	1		1		3	1	2
<b>Relevanz</b>	3	1	3	1	3	1	2
<b>Vorausschauend</b>	3	Kann als Frühwarnsystem verwendet werden	3	Kann als Frühwarnsystem verwendet werden	3	Kann als Frühwarnsystem verwendet werden	Kann als Frühwarnsystem verwendet werden
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>							
<b>Anwendbar auf Umweltproben</b>	1		1		3	1	1
<b>Proben-Vorbehandlung</b>	Ja (Oberflächengewässerproben) (Nein) (Abwasser)	Ja	Nein	Ja (für <i>in vitro</i> )	Ja		Nein



**Tab. 19 Fortsetzung: Biotests zur Untersuchung von Genotoxizität / Mutagenität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse: 1-2 hellgrün. n.d. nicht diskutiert

Bei den ersten drei Tests war die Beurteilung zwischen den beiden Diskussionsgruppen deutlich unterschiedlich. Daher sind in der Tabelle zwei Reihen für jeden Test aufgeführt.

Kriterium	Test 1: Ames-Fluktuations-Test		Test 2: Mikrokern-Test		Test 3: Umu-Test		Test 4: COMET Assay
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>							
<b>Empfindlichkeit</b>	Substanz- und Strang-abhängig	1 (Substanz- und Strang-abhängig)	Substanz- und Strang-abhängig	2	Substanz- und Strang-abhängig	2	2
<b>Robustheit</b>	1		2	1	1		2
<b>Grad der Validierung / Standardisierung</b>	1		1-2	1	1		3
<b>Kosten / Kosteneffizienz</b>	2	n.d.	1	n.d.	2	n.d.	n.d.
<b>Gute routinemässige Anwendbarkeit</b>	1		1	2	1		3
<b>Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren</b>	1		1-2	2	1		2



**Tab. 20: Biotests zur Untersuchung von neurotoxischen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse: 1-2 hellgrün, 2-3 orange. n.d. nicht diskutiert, i.E. in Entwicklung

Kriterium	Test 1: Acetylcholinesterase (AChE)-Hemmung	Test 2: <i>Danio rerio</i> Embryonen/Larven	Test 3: Olfactory bulb re- sponse ( <i>D. rerio</i> , Lachs)	Test 4: <i>Ceriodaphnia dubia</i> / <i>Hyalella azteca</i> akute und chronische Biotests	Test 5: Zytotoxizitätstests mit Nervenzellen (neuroblast, SHSY5Y cells, MTT)
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>					
<b>In situ- oder Labortest?</b>	Labor (nur mit Enzym), auch Analyse in im Freiland oder im Labor/ <i>in situ</i> exponierten Organismen möglich	Labor	Labor	Labor	Labor
<b>In vitro / in vivo</b>	Beides	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
<b>Wirkmechanismus / Endpunkt</b>	AChE-Aktivität	Verhalten (Schwimmverhalten, Reaktion auf Stimuli)	Vermeidungsverhalten (Fähigkeit auf Räuber zu reagieren)	Überleben, Fortpflanzungserfolg und Schwimmfähigkeit	Zellwachstum
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>					
<b>Interpretierbarkeit</b>	1-2	i.E. (vielversprechend)	1	2	2
<b>Relevanz</b>	2	2	2	1	2-3
<b>Vorausschauend</b>	2	i.E. (vielversprechend)	1	1	n.d.
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>					
<b>Anwendbar auf Umweltproben</b>	1	1	1	1	n.d.
<b>Proben-Vorbehandlung</b>	n.d.	Nein	Nein	Nein	n.d.
<b>Empfindlichkeit</b>	1-2	i.E. (vielversprechend)	1	1	n.d.
<b>Robustheit</b>	1-2	i.E. (vielversprechend)	1	1	n.d.
<b>Grad der Validierung / Standardisierung</b>	1	i.E. (vielversprechend)	3	1	3
<b>Kosten / Kosteneffizienz</b>	1-2	n.d.	n.d.	2	n.d.
<b>Gute routinemässige Anwendbarkeit</b>	1	n.d.	n.d.	1	n.d.
<b>Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren</b>	1	i.E. (vielversprechend)	Für spezifische Projekte	1	n.d.



**Tab. 21: Biotests zur Untersuchung von Dioxin-ähnlichen Wirkungen: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse: 1-2 hellgrün. n.d. nicht diskutiert

Wo sich die Beurteilung zwischen den beiden Diskussionsgruppen deutlich unterschied sind zwei Reihen für den jeweiligen Test aufgeführt.

Kriterium	Test 1: H4IIE Assay		Test 2a: EROD bei Fischen		Test 2b: EROD in RTL-W1 Zellen (Rainbow trout liver cells)
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>					
<i>In situ</i> - oder Labortest?	Labor		<i>In situ</i> -Biomarker		Labor
<i>In vitro</i> / <i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>
Wirkmechanismus / Endpunkt	Aktivierung des Dioxin-responsiven Elements (Aryhydrocarbon-Rezeptor, AhR)		Aktivität des Enzyms Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)		Aktivierung des Dioxin-responsiven Elements (Aryhydrocarbon-Rezeptor, AhR)
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>					
Interpretierbarkeit	1 (substanzspezifisch)		1		1 (substanzspezifisch)
Relevanz	1		1		1
Vorausschauend	2	1	1-2	1	1
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>					
Anwendbar auf Umweltproben	1		1		1
Proben-Vorbehandlung	Ja		Nein	Ja	Ja
Empfindlichkeit	1		1		1
Robustheit	1		1		1
Grad der Validierung / Standardisierung	2		2	1	1
Kosten / Kosteneffizienz	1		1	n.d.	n.d.
Gute routinemässige Anwendbarkeit	1		1		1
Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren	2		2		2





**Tab. 22: Biotests zur Untersuchung von Immuntoxizität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse 1-2 hellgrün, 2-3 orange. n.d. nicht diskutiert, i.E. in Entwicklung

Kriterium	Test 1: Phagozytose-Aktivität	Test 2: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS)	Test 3: Disease challenge- Tests	Test 4: Immunopathologie	Test 5: Tests mit Säuger-Zelllinien, z.B. Beas-2B-Zelllinie	
<b>Allgemeine Informationen zum Test</b>						
<b>In situ- oder Labortest?</b>	Labor (kann bei im Freiland gesammelten oder <i>in situ</i> exponierten Organismen analysiert werden)	Labor	<i>In situ</i> (Exposition) und Labor (Challenge)	Labor (kann bei im Freiland gesammelten Organismen oder bei <i>in situ</i> exponierten Organismen gemessen werden)	Labor	
<b>In vitro / in vivo</b>	<i>ex vivo</i>	<i>in vitro / ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vitro</i>	
<b>Wirkmechanismus / Endpunkt</b>	Phagozytoseaktivität durch Fluoreszenz gemessen	Oxidativer Stress, Katalase-Aktivität, Lipid-Peroxidation	Anfälligkeit von Organismen für Krankheiten	Beinhaltet eine Reihe von klassischen Parametern: B-Zellen, Makrophagen, Lymphozyten-Proliferation (alkali-labeled P), oxidative burst capacity.	Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) gemessen durch ELISA	
<b>Allgemeine Überlegungen in Bezug auf die Auswahl von Biotests</b>						
<b>Interpretierbarkeit</b>	2	3	1	2	3	
<b>Relevanz</b>	2	3	1-2	1	2-3	3
<b>Vorausschauend</b>	n.d.	2	1	1	n.d.	
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>						
<b>Anwendbar auf Umweltproben</b>	1	1	1	1	1	
<b>Proben-Vorbehandlung</b>	Nein	Nein	Nein	Nein	n.d.	
<b>Empfindlichkeit</b>	1	2	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>Robustheit</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	



**Tab. 22 Fortsetzung: Biotests zur Untersuchung von Immuntoxizität: Beurteilung basierend auf verschiedenen Auswahlkriterien.**

1 = gut (in grün), 2 = mässig (in gelb), 3 = schlecht (in rot), dazwischen liegende Ergebnisse 1-2 hellgrün, 2-3 orange. n.d. nicht diskutiert, i.E. in Entwicklung

Kriterium	Test 1: Phagozytose-Aktivität	Test 2: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS)	Test 3: Disease challenge- Tests	Test 4: Immunopathologie	Test 5: Tests mit Säuger-Zelllinien, z.B. Beas-2B Zelllinie	
<b>Evaluation der Biotests in Bezug auf die Auswahlkriterien</b>						
<b>Grad der Validierung / Standardisierung</b>	3	Kommerzieller Test verfügbar	3	2-3	3	
<b>Kosten / Kosteneffizienz</b>	2	n.d.	3	2	n.d.	
<b>Gute routinemässige Anwendbarkeit</b>	2	n.d.	2-3	2-3	1	
<b>Anwendbar in Gewässerschutzlaboren und privaten Laboren</b>	3	n.d.	2-3	Nur in spezifischen Projekten	2	n.d.