



## Effektbasierte Wirkungskontrolle der Dünnern vor und nach Ausbau der ARA Falkenstein – Untersuchungen vor Ausbau

**Abschlussbericht 31.05.2024**



# Impressum

## Herausgeber

Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, 8600 Dübendorf

## Im Auftrag von

Kanton Solothurn, Amt für Umwelt, Werkhofstrasse 5, 4509 Solothurn

## Autoren

Cornelia Kienle, Nadine Bramaz, Andrea Schifferli, Régis Vivien, Etienne Vermeirssen, Benoit Ferrari

Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie

Kristin Schirmer, Melanie Fischer, Nicole Okoniewski

Eawag, Abteilung Umwelttoxikologie

Helmut Bürgmann, Denise Wälchli, Karin Beck

Eawag, Abteilung Oberflächengewässer

Verena Christen, Dominik Züger, Miriam Langer

Fachhochschule Nordwestschweiz

## Fachliche Begleitung

Lukas Egloff, Veronica Lozano

Amt für Umwelt, Kanton Solothurn

Sergio Santiago

Soluval Santiago

## Kontakt

Cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch

## Zitiervorschlag

Kienle, C., Bramaz, N. Bürgmann, H., Christen, V., Fischer, M., Langer, M., Okoniewski, N., Schifferli, A., Schirmer, K., Vivien, R., Wälchli, D., Züger, D., Vermeirssen, E., Ferrari, B.: Effektbasierte Wirkungskontrolle der Dünnern vor und nach Ausbau der ARA Falkenstein – Untersuchungen vor Ausbau. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Dübendorf.

**Titelfoto:** Wasserprobenahme in der Dünnern durch Helmut Bürgmann und Karin Beck, Bild: Cornelia Kienle, Oekotoxzentrum

Oekotoxzentrum | Eawag | Überlandstrasse 133 | 8600 Dübendorf | Schweiz  
T +41 (0)58 765 55 62 | [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 | [info@centrecotox.ch](mailto:info@centrecotox.ch) | [www.centrecotox.ch](http://www.centrecotox.ch)



## Zusammenfassung

Im Rahmen der Wirkungskontrolle des Ausbaus der ARA Falkenstein in der Dünnern werden basierend auf dem Untersuchungskonzept für den Ausbau der ARA Falkenstein Untersuchungen der Fischpopulationen und des Makrozoobenthos durchgeführt. Diese Methoden ermöglichen eine Aussage über den Zustand der Lebensgemeinschaften von Wasserwirbellosen und Fischen. Zusätzlich werden ausgewählte chemische Untersuchungen durchgeführt. Werden hierbei auch Umweltschadstoffe gemessen (z.B. basierend auf dem NAWA-Programm), ermöglichen chemische Untersuchungen eine Erfassung der Stoffkonzentrationen in Gewässern und eine Abschätzung des damit verbundenen Risikos für Auswirkungen auf Wasserlebewesen. Um eine möglichst aussagekräftige Beurteilung zu ermöglichen, sind jedoch zusätzlich ökotoxikologische Untersuchungen empfehlenswert, da chemische Stoffe, wie Herbizide, Insektizide und Pharmazeutika Wasserorganismen auf verschiedenen biologischen Skalen, vom Individuum bis zur Gemeinschaft, beeinträchtigen können.

Für eine effektbasierte Wirkungskontrolle der Dünnern vor und nach Ausbau der ARA Falkenstein wurden folgende Methoden angewendet:

- Effektbasierte Biotests zur Erfassung von östrogenen Aktivität, von Auswirkungen auf die Photosynthese und das Wachstum von einzelligen Grünalgen, ebenso wie von Effekten auf die Fortpflanzung und das Überleben von Wasserflöhen (Ökotoxzentrum und Soluval Santiago).
- Molekulare Untersuchungen mit Bachflohkrebsen (FHNW) und Fischzelllinien (Eawag, Abteilung Umwelttoxikologie) um die Auswirkungen von Mikroverunreinigungen auf die Genexpression zu bewerten.
- Untersuchung der Lebensgemeinschaft von Oligochaeten, um Auswirkungen auf Sedimentorganismen abzuschätzen («functional trait approach») und Informationen über die Auswirkungen von im Sediment vorhandenen Schadstoffen zu erhalten (Ökotoxzentrum).
- Evaluation des Vorkommens von Antibiotikaresistenzen in der Dünnern und der Auswirkung der ARA darauf mit molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden (Eawag, Abteilung Oberflächengewässer).

Diese Untersuchungen sollen eine möglichst umfassende Beurteilung des Zustands der Dünnern vor ARA-Ausbau ermöglichen. Beprobt wurden der ARA-Ablauf sowie mehrere Probenahmestellen in der Dünnern (eine Stelle oberhalb der Abwassereinleitungsstelle und ein bis zwei Stellen unterhalb). An der zweiten Stelle unterhalb wurden nur Antibiotikaresistenzen und die Oligochaetengemeinschaft untersucht.

Die Untersuchungen vor ARA-Ausbau haben folgende Erkenntnisse ergeben:

- Die ökotoxikologischen Biotests haben gezeigt, dass die im ERα-CALUX® gemessene östrogene Aktivität im ARA-Ablauf mit 0.41 ng 17β-Östradiol-Äquivalenten (EEQ)/L relativ gering war. In der Dünnern konnte keine Unterschiede in der östrogenen Aktivität zwischen oberhalb und unterhalb der Abwassereinleitung festgestellt werden. Die Werte lagen bei 0.18 ng EEQ/L, der effektbasierte Schwellenwert (EBS), d.h. der Wert, unterhalb dessen für den untersuchten Effekt keine negativen Effekte auf Organismen im Gewässer zu erwarten sind, von 0.4 ng EEQ/L wurde nicht überschritten. Insgesamt war die Wasserqualität für diesen Parameter an beiden Standorten gut.
- Der kombinierte Algentest ergab Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) von 230 ng/L für die Photosynthesehemmung (PSII) und 1'250 ng/L für die Wachstumshemmung im ARA-Ablauf und damit eine geringe bzw. mittlere PSII- und Wachstumshemmung in dieser Probe. In der Dünnern oberhalb der Abwassereinleitung war die Wasserqualität für beide Parameter sehr gut. Mit 0.5 ng DEQ/L (PSII-Hemmung) und 32 ng DEQ/L (Wachstumshemmung) lagen die Werte unterhalb der jeweiligen EBS (PSII-Hemmung: 70 ng/L, Wachstumshemmung: 130 ng/L). Die DEQ-Werte stiegen durch die Abwassereinleitung am Standort unterhalb der



ARA leicht an (PSII-Hemmung: 19 ng DEQ/L, Wachstumshemmung: 120 ng DEQ/L), lagen aber immer noch im Bereich für gute Wasserqualität.

- Der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen zeigte in allen Proben eine signifikante Verringerung des Populationswachstums im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle. Insgesamt wurde jedoch in keiner Probe der EBS-Wert von 30 % Wachstumshemmung überschritten, d.h. die Proben weisen nicht auf eine hohe Toxizität für Wasserflöhe hin. Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmestellen festgestellt.
- Bei den Bachflohkrebsen wurden Unterschiede in der Genexpression in der Dünnern unterhalb ARA-Einleitung im Vergleich zu oberhalb gemessen. Hier ist eine detaillierte Analyse erst nach dem ARA-Ausbau möglich.
- Die Untersuchungen mit Fischzelllinien haben zunächst keine akute Toxizität der Proben auf die Zellen der Kiemenzelllinie gezeigt. Die Genexpression zeigte jedoch klare Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten auf. So waren im ARA-Ablauf Gene für Biotransformation, allgemeinen Stress, die Regulation des Zellzyklus und Immunantwort im Vergleich zum Standort in der Dünnern oberhalb der ARA signifikant reguliert. Am Standort unterhalb des ARA-Ablaufs ergab sich ebenfalls eine erhöhte Regulation dieser Gene im Vergleich zum Standort oberhalb. Des Weiteren gab die Genexpression am Standort unterhalb Hinweise auf eine Metallbelastung und einen Einfluss auf die Neurotransmission. Ergebnisse der beiden Zelllinien (Kieme und Darm) waren bis auf kleinere Unterschiede vergleichbar, wobei diese in der unterschiedlichen Funktion dieser Zellen für die Schadstoffregulation liegen könnten (Kiemenzellen: Eingangspforte für Schadstoffe aus dem Wasser, Darmzellen: Eingangspforte für Schadstoffe aus der Nahrung).
- Die Analyse der Oligochaetengemeinschaft hat einen Unterschied in der Artzusammensetzung in den Sedimenten der Dünnern von oberhalb zu unterhalb aufgezeigt. Am Standort oberhalb der Abwassereinleitung zeigte sich eine mässig veränderte Funktion, am ersten Standort unterhalb der Abwassereinleitung eine stark veränderte Funktion und beim zweiten Standort eine veränderte Funktion. Das heisst, dass an dieser Stelle eine gewisse Erholung der Oligochaetengemeinschaft im Vergleich zum ersten Standort unterhalb beobachtet wurde.
- Insgesamt war der Eintrag von antimikrobiellen Resistenzen, d.h. antibiotikaresistenten Bakterien und antibiotikaresistenten Genen, durch die ARA in die Dünnern klar nachweisbar. Unterhalb der ARA wurden deutlich erhöhte absolute und relative Abundanzen von Antibiotika-Resistenzgenen und resistenten Bakterien gemessen. Die Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die ARA war ebenfalls klar nachweisbar. Die Bakteriengemeinschaft in der Dünnern unterhalb der Abwassereinleitung wurde durch den Eintrag von Abwasserbakterien zum Teil deutlich verändert. Die wiederholte Beprobung zeigte eine deutliche zeitliche Variabilität und einen Einfluss der Niederschlagsintensität.

Es ist geplant im Jahr 2028/2029 eine Wirkungskontrolle nach ARA-Ausbau mit denselben Methoden durchzuführen. Basierend auf den Ergebnissen der aktuellen Studie soll eine Veränderung der Situation durch den ARA-Ausbau nachvollzogen werden.



## Inhaltsverzeichnis

|       |                                                                                                            |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung.....                                                                                            | 1  |
| 2     | Material und Methoden.....                                                                                 | 3  |
| 2.1   | Probenahme und Transport.....                                                                              | 3  |
| 2.1.1 | Probenahmestellen und Probenahme.....                                                                      | 3  |
| 2.1.2 | Ökotoxikologische Biotests und Genexpression in Fischzelllinien .....                                      | 4  |
| 2.1.3 | Genexpression in Bachflohkrebsen (Gammariden) .....                                                        | 4  |
| 2.1.4 | Oligochaeten-Index .....                                                                                   | 5  |
| 2.1.5 | Probenahmekampagnen zur Untersuchung von Antibiotikaresistenzen .....                                      | 5  |
| 2.2   | Auswahl und Überblick der Untersuchungsmethoden .....                                                      | 6  |
| 2.2.1 | <i>In vitro</i> -Biotests.....                                                                             | 7  |
| 2.2.2 | Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> ).....                                     | 8  |
| 2.2.3 | Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien .....                                                       | 9  |
| 2.2.4 | Genexpression in Bachflohkrebsen .....                                                                     | 9  |
| 2.2.5 | Oligochaeten-Index .....                                                                                   | 9  |
| 2.2.6 | Nachweis und Quantifizierung von mikrobieller Kontamination und Indikatoren für Antibiotikaresistenz ..... | 9  |
| 2.3   | Vergleich der Biotestergebnisse mit den Ergebnissen der chemischen Analytik .....                          | 11 |
| 3     | Ergebnisse .....                                                                                           | 12 |
| 3.1   | Kombinierter Algentest .....                                                                               | 12 |
| 3.2   | ER $\alpha$ -CALUX®.....                                                                                   | 13 |
| 3.3   | Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> ) .....                                    | 14 |
| 3.4   | Vergleich der Biotestergebnisse mit den Ergebnissen der chemischen Analytik .....                          | 15 |
| 3.5   | Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien.....                                                        | 16 |
| 3.5.1 | Akute Toxizität der Wasserproben nach ISO 21115.....                                                       | 16 |
| 3.5.2 | Regulierung der Expression von Biomarkergenen .....                                                        | 18 |
| 3.6   | Genexpression in Bachflohkrebsen.....                                                                      | 21 |
| 3.6.1 | Abiotische Daten .....                                                                                     | 21 |
| 3.6.2 | Heatmap und Expressionscounts .....                                                                        | 22 |
| 3.7   | Oligochaeten-Index .....                                                                                   | 24 |
| 3.8   | Mikrobiologische Untersuchung und Indikatoren für Antibiotikaresistenz .....                               | 25 |
| 3.8.1 | Durchflusszytometrie - Häufigkeit und Charakterisierung von Mikroorganismen .....                          | 25 |
| 3.8.2 | Zusammensetzung und Diversität der Mikrobengemeinschaften .....                                            | 27 |
| 3.8.3 | Kultivierbare antibiotikaresistente Bakterien (ARB) .....                                                  | 29 |
| 3.8.4 | Häufigkeit von Markergenen für Antibiotikaresistenz mit quantitativer PCR (qPCR) .....                     | 30 |
| 3.8.5 | Metagenomische Charakterisierung des Resistoms an ausgewählten Proben... ..                                | 33 |
| 3.8.6 | Gesamtbeurteilung der mikrobiellen Wasserqualität und der Belastung mit Antibiotikaresistenzen .....       | 35 |



|          |                                                                                                                                                        |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4        | Diskussion und Gesamtbeurteilung .....                                                                                                                 | 36 |
| 5        | Schlussfolgerungen und Ausblick .....                                                                                                                  | 39 |
| 6        | Referenzen .....                                                                                                                                       | 40 |
| 7        | Glossar .....                                                                                                                                          | 44 |
| 8        | Verzeichnisse .....                                                                                                                                    | 45 |
| 8.1      | Abbildungsverzeichnis .....                                                                                                                            | 45 |
| 8.2      | Tabellenverzeichnis .....                                                                                                                              | 47 |
| Anhang 1 | Probenahme und -aufbereitung: Ergänzende Informationen .....                                                                                           | 48 |
|          | Probenahme-Standorte .....                                                                                                                             | 48 |
|          | Probenahmedauer .....                                                                                                                                  | 50 |
|          | Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion .....                                                                                                  | 51 |
| Anhang 2 | Angewendete Untersuchungsmethoden: Ergänzende Informationen .....                                                                                      | 52 |
|          | Kombinierter Algentest .....                                                                                                                           | 52 |
|          | ER $\alpha$ -CALUX® .....                                                                                                                              | 52 |
|          | Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen .....                                                                                                              | 53 |
|          | Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien .....                                                                                                   | 54 |
|          | Genexpression in Bachflohkrebsen .....                                                                                                                 | 58 |
|          | Oligochaeten-Index .....                                                                                                                               | 59 |
|          | Untersuchung von Antibiotikaresistenzen: Nachweis und Quantifizierung von mikrobieller<br>Kontamination und Indikatoren für Antibiotikaresistenz ..... | 59 |
| Anhang 3 | Ergebnisse: Ergänzende Informationen .....                                                                                                             | 65 |
|          | Kombinierter Algentest .....                                                                                                                           | 65 |
|          | ER $\alpha$ -CALUX® .....                                                                                                                              | 66 |
|          | Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (Kurzbericht) .....                                                                                                | 67 |
|          | Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien .....                                                                                                   | 68 |



## 1 Einleitung

Die ARA Falkenstein in Oensingen ist seit 1976 in Betrieb. Sie reinigt die Abwässer von 10 Verbandsgemeinden ebenso wie vorbehandelte Abwässer der Grosseinleiter Bell Schweiz AG und Swiss Quality Paper. In den Jahren 2023 bis 2027 erfolgt eine umfassende Erneuerung der ARA. Dabei werden die mechanische und biologische Reinigungsstufe umgebaut und die ARA mit einer Stufe zur Elimination von Mikroverunreinigungen (Pulveraktivkohle & Membranfiltration) erweitert (Fumasoli et al., 2022). Die ARA Falkenstein leitet ihr Abwasser in die Dünnern ein, einen Nebenfluss der Aare mit einem Einzugsgebiet von 234 km<sup>2</sup>. Um die Wirkung des Ausbaus der ARA Falkenstein auf die Wasserqualität in der Dünnern zu untersuchen ist eine Wirkungskontrolle mit Untersuchungen vor und nach dem ARA-Ausbau geplant (Fumasoli et al., 2022).

Im Rahmen der Wirkungskontrolle des Ausbaus der ARA Falkenstein werden in der Dünnern Untersuchungen der Fischpopulationen und des Makrozoobenthos durchgeführt. Diese Methoden ermöglichen eine Aussage über den Zustand der Lebensgemeinschaften von Wasserwirbellosen und Fischen. Zusätzlich werden ausgewählte chemische Untersuchungen durchgeführt einschliesslich der Messung von Umweltschadstoffen (z.B. basierend auf dem NAWA-Programm). Diese chemischen Untersuchungen ermöglichen eine Erfassung der Stoffkonzentrationen in Gewässern und eine Abschätzung des damit verbundenen Risikos für Auswirkungen auf Wasserlebewesen. Um eine möglichst aussagekräftige Beurteilung zu ermöglichen, sind zusätzlich ökotoxikologische Untersuchungen empfehlenswert, da Chemikalien wie Pestizide und Arzneimittel Wasserorganismen auf verschiedenen biologischen Ebenen, vom Individuum bis zur Gemeinschaft, beeinflussen können. Gemäss VSA-Merkblatt können bisher keine weitergehenden Methoden in einem standardisierten Testverfahren empfohlen werden. Das Amt für Umwelt des Kt. Solothurn und der Abwasserverband ZAF haben sich dennoch dazu entschlossen, weitergehende Untersuchungen durchzuführen, um die Auswirkungen des ARA-Ausbaus auf die Dünnern möglichst umfassend zu untersuchen und zu beurteilen.

Ökotoxikologische Biotests stellen eine wichtige Brücke zwischen den gemessenen Chemikalien, d.h. der Exposition und dem damit verbundenen Risiko für Wasserlebewesen und Effekten auf Organismen dar. Es sind Analysemethoden, die lebende Zellen, Organismen oder Gemeinschaften in definierter Art und Anzahl einsetzen, um deren Reaktion auf eine Exposition mit Schadstoffen in Umweltproben zu messen (Fent, 2013). Man unterscheidet hier zwischen Biotests, bei denen spezifische Auswirkungen auf einzellige Organismen oder Zelllinien untersucht werden (*In-vitro*-Biotests), Tests mit ganzen, mehrzelligen Organismen (*In-vivo*-Biotests) und Untersuchungen mit Organismen im Freiland (*In-situ*-Biotests) (Connon et al., 2012; Kienle et al., 2015). In der Vergangenheit haben mehrere Studien gezeigt, dass der Einsatz von ökotoxikologischen Biotests im Umweltmonitoring wertvolle Informationen liefert. Studien, die im Rahmen von NAWA SPEZ in der Schweiz durchgeführt wurden, zeigten hohe berechnete ökotoxikologische Risiken in kleinen und mittleren Fließgewässern durch chemische Messungen auf (Doppler et al., 2017; Spycher et al., 2018; Wittmer, 2014), die durch *In-vitro*- und *In-vivo*-Biotests im Labor bestätigt werden konnten. Ebenso traten Auswirkungen auf Organismen direkt im Freiland auf (Junghans et al., 2019; Langer et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass ökotoxikologische Biotests als Screening-Werkzeuge und/oder Frühindikatoren für Effekte im Freiland dienen können.

Im Rahmen der Wirkungskontrolle wurden verschiedene Wirkmechanismen und Organismen verschiedener Ernährungsebenen wie Algen, Wasserwirbellose und Fische einbezogen. Angewendet wurden ein Test mit menschlichen Zelllinien zur Erfassung von östrogenen Aktivität (ERα-CALUX®) (International Organization for Standardization, 2018), ein Test mit einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) zur Erfassung von Auswirkungen auf die Photosynthese und das Wachstum der Algen (Kienle et al., 2015), ebenso wie ein Test mit Wasserflöhen zur Erfassung von Auswirkungen auf das Wachstum und die Fortpflanzung dieser Organismen. Die ersten bei-



den Biotests werden im Rahmen eines Expertenberichts für das Modulstufenkonzept als geeignete Methoden für die Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern vorgeschlagen (Kienle et al., 2018). Wasserflöhe, als Vertreter der Wasserwirbellosen, haben sich als sehr empfindlich gegenüber organischen Schadstoffen erwiesen. Diese Methoden wurden durch molekulare Untersuchungen an Bachflohkrebsen und an zwei Fischzelllinien (von Kieme und Darm) ergänzt. Damit können die Auswirkungen von Mikroverunreinigungen auf die Genexpression in verschiedenen Organismen bewertet werden und auch molekulare Wirkmechanismen von Mikroverunreinigungen aufgeklärt werden.

Um Auswirkungen auf Ebene der Lebensgemeinschaften auch auf Sedimentorganismen abzuschätzen, wurden die Lebensgemeinschaften von Oligochaeten mit einem «functional trait approach» untersucht (Vivien et al., 2019). Diese Methode liefert Informationen über die biologische Qualität der Matrix (d.h. über die Auswirkungen der in der Matrix vorhandenen Schadstoffe) und über die Dynamik des hydrologischen Austauschs zwischen Oberflächen- und Grundwasser (d.h. über die Fähigkeit des Flusses zur Selbstreinigung und die Anfälligkeit des Grundwassers für Verschmutzung durch Oberflächenwasser) (Vivien et al., 2019).

Des Weiteren wurden im Rahmen der Wirkungskontrolle auch das Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in der Dünnern und die diesbezügliche Auswirkung der ARA evaluiert. Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene können über geklärte Abwässer in Oberflächengewässer eingetragen werden. Solche Einträge von Antibiotikaresistenzen in die Umwelt werden zunehmend als biologische Umweltkontamination betrachtet, da sie die Ausbreitung und Neuentstehung von Antibiotikaresistenzen begünstigen, die ein ernstes und zunehmendes Problem für die öffentliche Gesundheit darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass gereinigte Abwässer einen erheblichen Einfluss auf die Häufigkeit und Art dieser Bakterien und Gene in den Vorflutern der Schweiz haben (Bürgmann et al., 2022). Diese Untersuchungen wurden durch Methoden zur allgemeinen Charakterisierung der mikrobiologischen Wasserqualität ergänzt.

Ziel dieses umfangreichen Untersuchungsprogramms ist es die Wirkungen des ARA-Ausbaus auf die Wasser- und Sedimentqualität der Dünnern möglichst umfassend zu beurteilen. Mit den aktuellen Untersuchungen wird der Zustand der Dünnern vor dem ARA-Ausbau beurteilt. Es ist geplant im Jahr 2028/2029 eine Wirkungskontrolle nach dem ARA-Ausbau mit denselben Methoden durchzuführen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probenahme und Transport

#### 2.1.1 Probenahmestellen und Probenahme

Im Zeitraum vom 03. bis zum 20.08. wurden durch das Amt für Umwelt des Kantons Solothurns Tagesmischproben mit automatischen Probenehmern an einem Standort oberhalb und an zwei Standorten unterhalb der ARA Falkenstein (nach vollständiger Durchmischung von ARA-Abwasser und Flusswasser) entnommen. Eine Probe wurde 255 m flussaufwärts von der Einleitungsstelle der ARA entnommen und zwei Proben wurden 161 m bzw. 1'540 m flussabwärts von der Einleitungsstelle entnommen. Zusätzlich wurden im gleichen Zeitraum durch die Betreiber der ARA Falkenstein Tagesmischproben des ARA-Ablaufs genommen.

Für die 2-Wochenmischproben wurden nur Trockenwettertage berücksichtigt, da dann besonders hohe Belastungen zu erwarten sind. Tab. 1 und Abb. 1 geben einen Überblick über die Probenahmestellen. Die Liste der Probenahmetage findet sich in Tab. 16 im Anhang 1.

**Tab. 1: Probenahmestellen in der Dünnern und dem Ablauf der ARA Falkenstein**

| No. | Messstellen         | Koordinaten         | Probenahme durch           | Probenahmeart       |
|-----|---------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| 1   | Oberhalb ARA (US)   | 2'622'814 1'237'859 | Amt für Umwelt             | zeitproportional    |
| 2   | Ablauf ARA (EFF)    | 2'623'005 1'237'981 | ARA Falkenstein            | abflussproportional |
| 3   | Unterhalb ARA (DS1) | 2'623'174 1'238'045 | Amt für Umwelt             | zeitproportional    |
| 4   | Unterhalb ARA (DS2) | 2'624'385 1'238'720 | Eawag (1 x 24h-Mischprobe) | zeitproportional    |



**Abb. 1: Probenahmestellen**

Die Proben wurden mit zwei WS Porti Autosamplern (WaterSam, Deutschland) und einem Probenehmer 6712 (Teledyne Isco Inc., USA) (0.4 - 0.8 L pro Stunde) entnommen. Die WS Porti-Autosampler waren mit sauberen, sterilen 12 x 0.9-Liter-Probenahmeflaschen ausgestattet und wurden für die Dauer der Probenahme mit einer Kompressorkühlung (eine im Batterie- und eine



im Netzbetrieb) auf ca. 4 °C gekühlt. Der Teledyne Isco Probenehmer war mit einer sauberen, sterilen 10-Liter-Flasche ausgestattet und mit Eis gekühlt.

### 2.1.2 Ökotoxikologische Biotests und Genexpression in Fischzelllinien

Die Tagesmischproben wurden gekühlt bei 2 - 8 °C gelagert und nach Abschluss der Probenahme zu einer 2-Wochenmischprobe zusammengeführt. Zusätzlich wurde ein *field blank* berücksichtigt. Pro Probenahmestelle wurden 2.6 L Wasser abgefüllt und bis zum Transport ans Ökotoxizentrum bei 2 - 8 °C gelagert.

Für die Zellinientests (Toxizität und Genexpression) wurden je ca. 250 mL Probe von US, EFF und DS1 eingefroren und bei - 20°C gelagert. Am Vorabend der Testdurchführung (29.01.2024) wurden die Proben bei 19 °C aufgetaut.

### 2.1.3 Genexpression in Bachflohkrebsen (Gammariden)

Die Standortwahl, Entnahme und das Einsetzen von Bachflohkrebsen (*Gammarus fossarum*) sowie die Probenahme nach einer einmonatigen Exposition in der Dünnern erfolgte durch Miriam Langer, Verena Christen und Studierende der FHNW. Lokal in der Dünneren gesammelte männliche Bachflohkrebsen wurden in Käfigen in der Dünnern jeweils oberhalb und direkt unterhalb des ARA-Ablaufs ausgebracht und nach vierwöchiger Exposition wieder entnommen. Die Bachflohkrebsen wurden direkt nach der Entnahme in RNAlater fixiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert. Die Bachflohkrebsen wurden als *G. fossarum* identifiziert, obwohl in der Region durchaus auch *G. pulex* verbreitet ist (Altermatt et al., 2014).

Im Detail wurden 160 männliche Bachflohkrebsen oberhalb des ARA-Ablaufs auf Höhe der ARA in der Dünneren gesammelt, nach Grösse selektiert und danach in modifizierte, wasserdurchlässige Tupperware-Boxen verteilt. Pro Box wurden 10 Bachflohkrebsen eingesetzt und reichlich in der Dünnern gesammelte Blätter als Futter dazugegeben. Jeweils 6 Boxen wurden oberhalb und direkt unterhalb des ARA-Ablaufs an Armierungseisen, welche im Gewässergrund eingeschlagen wurden, zusammen mit einem Datenlogger befestigt. Die Käfige wurden möglichst tief im Wasser platziert, um sicherzustellen, dass sie auch bei niedrigem Wasserstand im Wasser eingetaucht bleiben. Beim Standort in der Nähe des ARA-Ablaufs wurden die Käfige so platziert, dass sie sich in einigen Metern Entfernung des Ablaufs direkt in der Abwasserfahne befanden, was einen Worst-Case-Ansatz darstellt. Die Käfige wurden vom 05.04. bis zum 08.05.2023 in der Dünnern platziert. Die genauen Standorte der Bachflohkrebsentnahme und der Exposition sind in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2:** Die ARA Falkenstein in Oensingen SO in einem Luftbild (Swisstopo) S: Sammelstelle, US: Standort für die Bachflohkrebskäfige oberhalb des ARA-Ablaufs (upstream) ; DS Standort für die Bachflohkrebskäfige unterhalb des ARA-Ablaufs (downstream), X Markierung des ARA-Ablaufs.



#### 2.1.4 Oligochaeten-Index

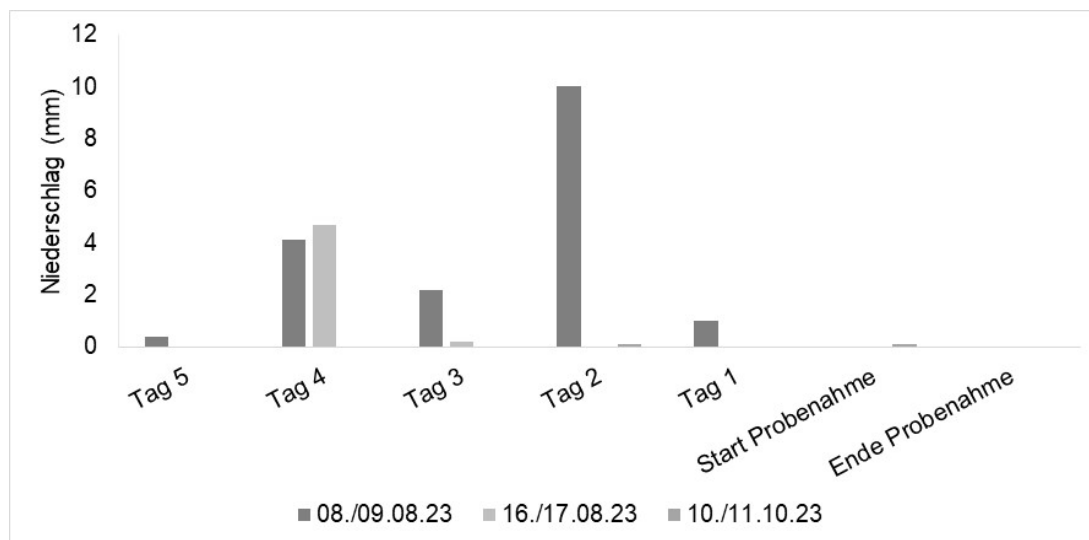
Die Probenahme erfolgte durch das Oekotoxzentrum. Eine Mischprobe aus grobem Oberflächensediment wurde mit einer Schaufel entnommen und dann mit neutral gepuffertem Formalin gemäss Vivien et al. (2019) fixiert.

#### 2.1.5 Probenahmekampagnen zur Untersuchung von Antibiotikaresistenzen

Die Probenahme erfolgte durch Helmut Bürgmann und sein Team in Abstimmung mit der Probenahme durch den Kanton für die Biotests (siehe Kapitel 2.1.1). Zusätzlich wurden das eingeleitete gereinigte Abwasser und, zur Erfassung der Dynamik im Gewässer, ein zusätzlicher Standort (DS2) weiter stromabwärts beprobt (Tab. 1).

Proben zur Durchführung der Analysen der antimikrobiellen Resistenzen (AMR) wurden in drei Kampagnen (1) 08./09.08.2023, 2) 16./17.08.2023, 3) 10./11.10.2023) in einer 24-stündigen integrierten Probenahme entnommen. Die integrierte Probenahme sollte kurzfristige oder tägliche Schwankungen ausgleichen, die Wiederholung der Kampagnen längerfristige Variabilität erfassen. Im Labor wurden alle Proben der integrierten 24-Stunden-Probenahme zur weiteren Filtration zusammengeführt. Die integrierten 24-Stunden-Proben des Ablaufs wurden durch die ARA-Mitarbeitenden aus dem Ablauf vor der Einleitung in den Fluss Dünnern entnommen (EFF). Für diese Proben wurde die Infrastruktur der ARA genutzt, gereinigte und sterilisierte Probenahmeflaschen wurden von der Eawag zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden während des Transports zum Labor und vor der Verarbeitung lichtgeschützt und auf Eis gelagert.

Abb. 3 gibt einen Überblick über die Niederschlagsmengen während der Beprobungen für Mikrobiologie und Antibiotikaresistenz Analysen.



**Abb. 3: Niederschlagsmengen vor und während der Probenahmekampagnen.**

Daten von MeteoSchweiz, der nächstgelegenen meteorologischen Station, Wynau. Die Station befindet sich 5.3 km (Luftlinie) von der ARA Falkenstein entfernt.



## 2.2 Auswahl und Überblick der Untersuchungsmethoden

Für die Beurteilung des Zustands der Dünnern vor dem ARA-Ausbau wurden Untersuchungsmethoden ausgewählt die Auswirkungen auf verschiedenen biologischen Organisationsebenen und auf verschiedene Organismen erfassen (Tab. 2). Die gemessenen Werte in den Biotests wurden mit effektbasierten Schwellenwerten (EBS) verglichen. Das sind Werte, unterhalb derer keine schädigenden Auswirkungen auf Organismen im Gewässer (bezüglich des gemessenen Effekts) zu erwarten sind. Für die weiteren Methoden wurden definierte Bewertungskriterien verwendet.

**Tab. 2 Durchgeführte Untersuchungen**

| Bereich                                                 | Testverfahren                                      | Mechanismus                                                                                                                       | Referenzsubstanz                     | Effekt-basierter Schwellenwert / Bewertungskriterien                                              |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Untersuchungen mit Wasserproben bzw. im Gewässer</b> |                                                    |                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                   |
| <b>Biotests mit Wasserproben</b>                        |                                                    |                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                   |
| <b>mit angereicherten Proben</b>                        | Kombinierter Algentest                             | Hemmung der Photosynthese, Wachstumshemmung                                                                                       | Diuron                               | 70 ng DEQ/L <sup>1</sup> (Photosystem II-Hemmung)<br>130 ng DEQ/L <sup>1</sup> (Wachstumshemmung) |
|                                                         | ERα CALUX® (U2OS) (ISO 19040-3; OECD 455)          | Östrogene Aktivität                                                                                                               | 17β-Estradiol                        | 0.28 (0.1 - 0.5) ng EEQ/L <sup>1,2,3</sup>                                                        |
| <b>mit nativen Proben</b>                               | Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen                | Mortalität, Fortpflanzung                                                                                                         | -                                    | ≤ 80% Überleben <sup>4,5</sup><br>≤ 70% Fortpflanzung <sup>4,5</sup>                              |
|                                                         | Toxizität in Fischkiemenzellen (RTgill-W1)         | Beeinträchtigung der Zellvitalität (metabolische Aktivität, Integrität der Zellmembran, Integrität der Lysosomen)                 | 3,4-Dichloranilin                    | -                                                                                                 |
| <b>Genexpressionsuntersuchungen</b>                     |                                                    |                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                   |
| <b>Mit Organismen aus der Dünnern</b>                   | Genexpression in Bachflohkrebsen                   | Untersuchung der Regulierung aller Gene                                                                                           | -                                    |                                                                                                   |
| <b>mit nativen Proben</b>                               | Genexpression in Fischzelllinien                   | Untersuchung der Regulierung von Biomarkergenen, die verschiedene Belastungen mit Mikroschadstoffen und Stressantworten anzeigen. | -                                    |                                                                                                   |
| <b>Untersuchungen von Antibiotikaresistenzen</b>        |                                                    |                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                   |
| <b>Mikrobiologische Methoden</b>                        | Durchflusszytometrie                               | Anfärbung von mikrobiellen Zellen mit SYBRgreen                                                                                   | -                                    | (signifikante Zunahme)                                                                            |
|                                                         | Kultivierung antibiotikaresistente Bakterien (ABR) | Wachstum in Gegenwart von Antibiotika                                                                                             | -                                    | (Detektion, signifikante Zunahme)                                                                 |
| <b>Molekulare Methoden</b>                              | quantitative PCR                                   | Detektion von ausgesuchten Antibiotika-Resistenzgenen                                                                             | Plasmide mit klonierten Gensequenzen | (Detektion, signifikante Zunahme)                                                                 |
|                                                         | 16S rRNA Gen Amplikon-Sequenzierung                | Sequenzierung eines phylogenetischen Markers                                                                                      | -                                    | (Veränderung der Artenzusammensetzung)                                                            |
|                                                         | Metagenomische Sequenzierung                       | Sequenzierung der Gesamt-DNA                                                                                                      | -                                    | (Veränderung oder Zunahme der Häufigkeit von Resistenzgenen)                                      |
| <b>Untersuchungen mit Sedimentproben</b>                |                                                    |                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                   |
| <b>Oligochaeten-Gemeinschaft</b>                        | Functional Trait (FTR) Approach                    | Analyse der Zusammensetzung der Gemeinschaft                                                                                      |                                      | Beurteilung der Sedimentqualität anhand des Vorkommens und der Häufigkeit bestimmter Arten        |

<sup>1</sup>(Escher et al., 2018), <sup>2</sup>(Brion et al., 2019), <sup>3</sup>(van der Oost et al., 2017), <sup>4</sup>ISO 17616:2019 (International Organization for Standardization, 2019a), <sup>5</sup>(Ferrari et al., 2017)



Im Folgenden wird ein Überblick über die angewendeten Methoden gegeben. Details finden sich in Anhang 2.

### 2.2.1 *In vitro*-Biotests

#### **Festphasenextraktion**

Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion (SPE) anhand einer Standardarbeitsanweisung (Ecotox Centre, 2023) angereichert. So wurden die Proben um einen Faktor 500 (Abwasser) bzw. 1000 (Flusswasser) angereichert.

#### **Kombinierter Algentest mit einzelligen Grünalgen zur Messung der Photosynthese- und Wachstumshemmung**

In diesem Test werden Proben auf spezifische Effekte auf die Photosynthese (spezifische Toxizität von Herbiziden auf das Photosystem II (PSII)) und nicht-spezifische Effekte auf das Wachstum der einzelligen Süßwasser-Grünalge *Raphidocelis subcapitata* untersucht (Escher et al., 2008; Glauch and Escher, 2020). Der Test umfasst zwei Parameter: die Hemmung der photosynthetischen Aktivität und die Hemmung der Wachstumsrate. Die Photosynthese-Hemmung ist ein Summen-Parameter für alle Herbizide mit dieser Wirkungsweise und deckt auch Mischungswirkungen ab. Die Hemmung des PSII tritt sehr schnell ein (einige Minuten nach der Exposition der Algen gegenüber einer aktiven Verbindung) und der Parameter wird zwei Stunden nach Beginn des Tests gemessen.

Die Anwendbarkeit und Eignung des Tests für die Bewertung der Wasserqualität wurde in mehreren Studien nachgewiesen. Er ermöglicht eine robuste Analyse von Mischungen, da die im Biotest gemessenen DEQ-Konzentrationen ( $DEQ_{bio}$ ) gut mit den DEQ-Werten korrelieren, die aus den gemessenen Konzentrationen von Diuron und anderen PSII-hemmenden Herbiziden wie Atrazin, Isoproturon, Simazin, Terbutryn und Terbutylazin unter Berücksichtigung ihrer relativen Wirkung im kombinierten Algentest im Vergleich zu Diuron berechnet wurden ( $DEQ_{chem}$ ) (Kienle et al., 2019; Vermeirssen et al., 2010). Der Test wird in 96-Well-Mikrotiterplatten mit konzentrierten Proben durchgeführt.

#### **ER $\alpha$ -CALUX® zur Erfassung von östrogen-wirksamen Stoffen**

Die CALUX® (Chemically Activated LUCiferase eXpression) Testsysteme basieren auf der Verwendung von Säugetierzelllinien, die so modifiziert wurden, dass sie bei einer Belastung mit Schadstoffen eine standardisierte und quantifizierbare Reaktion zeigen. Durch die Bindung eines Schadstoffs an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Aktivierung eines Reportergens für die Produktion des Enzyms Luziferase, das bei einer von ihm katalysierten Reaktion Licht erzeugt. Dieses Lichtsignal ist proportional zur Menge der biologisch aktiven Schadstoffe in der Probe.

Der ER $\alpha$ -CALUX® ist ein sehr empfindlicher Test und wird bereits seit vielen Jahren und in diversen Projekten für die Detektion von Östrogenen und östrogen-ähnlichen hormonell wirksamen Stoffen in Abwasser und Oberflächengewässern eingesetzt (Kienle et al., 2019; Könnemann et al., 2018; Murk et al., 2002). Der ER $\alpha$ -CALUX® ist ISO zertifiziert (ISO 19040-3) (International Organization for Standardization, 2018).

#### **Bewertung der Wasserqualität in fünf Zustandsklassen**

Für die Beurteilung einer Belastung der Oberflächengewässer mit Herbiziden, welche die Photosynthese und/oder das Wachstum von Algen beeinträchtigen und von östrogen-wirksamen Stoffen erfolgte anhand von effektbasierten Schwellenwerten. Aktuell liegen diese Werte für PSII-



Hemmung bei 70 ng DEQ<sub>bio</sub>/L (Escher et al., 2018; Kienle et al., 2018) und für Wachstumshemmung bei 130 ng DEQ<sub>bio</sub>/L (Escher et al., 2018)<sup>1</sup>. Für die Beurteilung der östrogenen Belastung wird das vom Oekotoxzentrum vorgeschlagene Qualitätskriterium für 17β-Östradiol (0.4 ng/L) herangezogen (Kienle et al., 2018; Simon et al., 2022)<sup>2</sup>.

In Kienle et al. (2018) und Kienle et al. (2023b) wird analog zu Götz et al. (2010) und in Anlehnung an das Modulstufenkonzept (Baumann and Langhans, 2010; Liechti et al., 1998) eine Einstufung der Wasserqualität für PSII-hemmende und östrogen-wirksame Stoffe anhand von fünf Beurteilungsklassen vorgeschlagen (Tab. 3).

**Tab. 3: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ)-Werte (ng/L) für Photosynthese- und Wachstumshemmung.**

| Beurteilung |                | PSII-Hemmung<br>Konzentration (ng/L) |         |     | Wachstums-Hemmung<br>Konzentration (ng/L) |         |      | Östrogene Aktivität<br>Konzentration (ng/L) |         |      | Einhaltung Zielvorgabe |
|-------------|----------------|--------------------------------------|---------|-----|-------------------------------------------|---------|------|---------------------------------------------|---------|------|------------------------|
|             | Sehr gut       |                                      | DEQ <   | 7   |                                           | DEQ <   | 13   |                                             | EEQ <   | 0.04 | Eingehalten            |
|             | Gut            | 7                                    | ≤ DEQ < | 70  | 13                                        | ≤ DEQ < | 130  | 0.04                                        | ≤ EEQ < | 0.4  |                        |
|             | Mässig         | 70                                   | ≤ DEQ < | 140 | 130                                       | ≤ DEQ < | 260  | 0.4                                         | ≤ EEQ < | 0.7  | Überschritten          |
|             | Unbefriedigend | 140                                  | ≤ DEQ < | 700 | 260                                       | ≤ DEQ < | 1300 | 0.8                                         | ≤ EEQ < | 4    |                        |
|             | Schlecht       |                                      | DEQ ≥   | 700 |                                           | DEQ ≥   | 1300 |                                             | EEQ ≥   | 4    |                        |

## 2.2.2 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (*Ceriodaphnia dubia*)

Im Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen werden Auswirkungen auf die Fortpflanzung und das Überleben von Wasserflöhen der Art *Ceriodaphnia dubia* über 8 Tage erfasst (International Organization for Standardization, 2008).

### Interpretation der Ergebnisse

Die ISO-Richtlinie ISO/CD 20665 (International Organization for Standardization, 2008) gibt keine Empfehlungen für die Interpretation von Ergebnissen. Daher wurden die Ergebnisse mit effektbasierten Schwellenwerten verglichen. Diese ermöglichen es die Toxizität für die untersuchten Endpunkte zu klassifizieren (siehe Tab. 4).

**Tab. 4: Interpretation der Ergebnisse des Fortpflanzungstests mit Wasserflöhen (angepasst von Ferrari et al. (2017))**

EBS = Effektbasierter Schwellenwert in % relative zur Kontrolle

| Kategorie | Toxizität                 | Überleben | Reproduktion |
|-----------|---------------------------|-----------|--------------|
| 1         | Nicht signifikant (< EBS) | <80%      | <70%         |
| 2         | Leicht                    | 60-80%    | 50-70%       |
| 3         | Mässig                    | 20-60%    | 25-50%       |
| 4         | Stark                     | <20%      | <25%         |

<sup>1</sup> Im Jahr 2020 wurde ein weiterer Wert veröffentlicht in den, neben Effektdaten von PSII-Hemmstoffen, auch Daten zu Industriechemikalien eingeflossen sind (Glauch und Escher, 2020). Um die Datenbasis weiter zu verbessern, wäre es sinnvoll Daten zu reinen Wachstumshemmstoffen zu erheben.

<sup>2</sup> Derzeit gibt es auch niedrigere effektbasierte Schwellenwerte für den ERα-CALUX®, z.B. 0.1 ng/L (Escher et al., 2018). Ein aktueller Entwurf der EU-Wasserrahmenrichtlinie (EC 2022) sieht reduzierte Wasserqualitätskriterien für steroidale Östrogene wie 17β-Östradiol vor ([https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-amending-water-directives\\_en](https://environment.ec.europa.eu/publications/proposal-amending-water-directives_en)). Diese niedrigeren Kriterien würden wiederum auch den effektbasierten Schwellenwert auf etwa 0.07 ng/L reduzieren.



### 2.2.3 Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien

Der RTgill-W1 Zelltest ermöglicht den Nachweis der akuten Toxizität von Chemikalien und Wasserproben (International Organization for Standardization, 2019b; OECD, 2021). Die Toxizität wird über die Reaktion der Zellen auf eine Kombination fluoreszierender Indikatorfarbstoffe ermittelt, anhand derer drei verschiedene Toxizitätsparameter aufgezeigt werden können. Hierbei werden AlamarBlue, CFDA-AM und Neutralrot zur Messung der Stoffwechselaktivität, der Integrität der Zellmembran und der Integrität der Lysosomenmembranen verwendet. Die Ergebnisse werden als prozentuale Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt.

Ein Aliquot jeder Wasserprobe wurde gemäss ISO 21115 (ohne Festphasenextraktion, also nativ) für die Zellexposition vorbereitet. Die Proben wurden zunächst auf ihre Zytotoxizität in den RTgill-W1-Zellen getestet. Anschliessend wurde eine nicht-toxische Konzentration der Wasserproben ausgewählt, um Zelllinien gegenüber den Wasserproben zu exponieren, die RNA zu extrahieren und die Regulation von Genen zu messen, die die Auswirkungen von Umweltproben anzeigen.

Für die Untersuchung der Expression verschiedener Biomarkergene wurden RTgill-W1 und RTgutGC (Darmzelllinie der Regenbogenforelle) Zellen für 24 h gegenüber den Wasserproben in Triplikaten (drei T25 Zellkulturflaschen pro Probe) exponiert. Anschliessend wurde die RNA extrahiert und die Regulation von 20 verschiedenen Biomarkergenen mittels qPCR gemessen. Die Biomarkergene spiegeln verschiedene zelluläre Antworten auf Umweltstress, wie allgemeinen Stress, Metall- und oxidativen Stress, Biotransformation, Immunregulation usw., wider. Die Funktionen der untersuchten Markergene werden im Ergebnisteil zur Genexpression erläutert (siehe Kapitel 3.5.2).

### 2.2.4 Genexpression in Bachflohkrebsen

Nach Exposition der Bachflohkrebsen oberhalb und unterhalb des ARA-Ablaufs in der Dünnern wurde die mRNA der gesammelten Bachflohkrebsen extrahiert und anschliessend mittels Next Generation Sequencing (NGS) analysiert. Anschliessend wurden die erhaltenen Daten im Hinblick auf Genexpressionsänderungen zwischen den Bachflohkrebsen der beiden Expositionsstandorte ausgewertet und interpretiert. Der Workflow für diese Schritte ist bereits etabliert.

### 2.2.5 Oligochaeten-Index

Der Oligochaeten-Index wurde am Oekotoxzentrum bestimmt. Das beinhaltet: Sieben, Sortieren, Aufbringen von Oligochaeten auf Objektträger, Identifizierung auf dem niedrigsten praktischen Niveau, Analyse der Daten. Weitere Details finden sich in Vivien and Ferrari (2023).

### 2.2.6 Nachweis und Quantifizierung von mikrobieller Kontamination und Indikatoren für Antibiotikaresistenz

Diese Untersuchungen umfassten: (i) die Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie, (ii) die Bestimmung von kultivierbaren mikrobiellen Zellen auf Agar-Platten mit und ohne Antibiotika, (iii) die molekularbiologische Quantifizierung ausgewählter Antibiotika-Resistenzgene und eines Marker-Gens für Multiresistenzen, (iv) die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft durch 16S rRNA-Gen-Amplikon Sequenzierung und (v) für ausgewählte Proben eine metagenomische Charakterisierung des Resistoms (Gesamtheit der Antibiotika-Resistenzgene).

#### Durchflusszytometrie

Die Gesamtzellzahl (TCC) und der Anteil von Zellen mit hohem und niedrigem Nukleinsäuregehalt in den Wasserproben wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Vorbereitung und die Messungen wurde die in der Schweiz akkreditierte Standardmethode 333.1 verwendet, die auf der Färbung mit SYBR Green basiert (Bundesamt für Gesundheit, 2012). Das Verfahren wurde gemäss einer früheren Veröffentlichung (Proctor et al., 2018) durchgeführt, jedoch unter Verwendung eines NovoCyt Advanteon Durchflusszytometers (Agilent, USA).



### **Kultivierbare antibiotikaresistente Bakterien (ARB)**

Die Abundanzen lebensfähiger antibiotikaresistenter Bakterien (ABR) (koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL) wurden durch Ausplattieren auf R2A-Agar bestimmt, der mit zwei verschiedenen Antibiotika-Kombinationen ergänzt wurde: i) Sulfamethoxazol (76 mg/L), Trimethoprim (4 mg/L) und Tetracyclin (16 mg/L) (STT) und ii) Clarithromycin (4 mg/L) und Tetracyclin (16 mg/L) (CT) sowie zum Vergleich auf nativem R2A-Agar ohne Antibiotika (Czekalski et al. (2014) und Lee et al. (2021)). Diese Methode wurde nur mit Wasserproben der Kampagne Nr. 3 durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.5).

### **Filtration der Biomasse und DNA-Extraktion**

Die Biomasse wurde durch Filtration der Wasserproben durch Express PLUS PES-Membranfilter mit 0.2 µm Porendurchmesser (Millipore, USA) aufkonzentriert. Die DNA wurde aus den Filtern mit dem DNeasy Power Water Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß dem mitgelieferten Extraktionsprotokoll extrahiert.

### **Bestimmung der Häufigkeit von Markergenen für Antibiotikaresistenz mit quantitativer PCR (qPCR)**

Die Häufigkeit von insgesamt acht Indikatorgenen für anthropogene Einträge von Antibiotika-Resistenzgenen (*sul1*, *sul2*, *ermB*, *tetM*, *tetW*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *qnrA* und das Klasse-1 Integron-Integrase-Gen *int1*) wurde mittels qPCR bestimmt. Zusätzlich wurde eine qPCR für das Housekeeping-Gen 16S rRNA durchgeführt, um die Gesamtzahl der in jeder Probe vorhandenen Bakterien zu ermitteln. Die verwendete Methode ist in (Czekalski et al., 2012; Czekalski et al., 2014) und Lee et al. (2021) beschrieben. Primer-Sequenzen, Primer-Konzentrationen, DNA-Menge und Zyklusbedingungen sind in Anhang 2 angegeben.

### **Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft via 16S rRNA-Genamplikon-Sequenzierung**

16S rRNA-Genamplikon-Sequenzierungen wurden auf der GridION-Sequenzierungsplattform (Oxford Nanopore Technologies, UK) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem PCR-cDNA-Barcoding-Kit SQK-PCB111.24 (Oxford Nanopore Technologies, UK) für die Sequenzierung auf MinION flow cells (R9.4.1) vorbereitet. Die Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Amplifikation wurden die Primer 341f und 806r für die Regionen V3 und V4 verwendet.

Die Häufigkeit der mikrobiellen Taxa aus den erhaltenen Sequenzierungsdaten wurde mit der EMU-Software (Version 3.4.5) in der MiniConda-Umgebung (Version 3) geschätzt. Die Analyse wurde anhand der durch den Sequenzierungslauf erzeugten FASTQ-Datei durchgeführt. Die taxonomische Klassifizierung erfolgte mit Hilfe der SILVA-Datenbank (Release 138, Ref NR 99).

### **Metagenomische Charakterisierung des Resistoms an ausgewählten Proben**

Metagenom-Analysen wurden auf der GridION Plattform von Oxford Nanopore (UK) mit dem Ligation Sequencing DNA V14 Kit (SQK-LSK114) gemäß Herstellerangaben sequenziert. Pro Metagenom wurde eine komplette MinION flow cell (R10.4.1) mit einer Laufzeit von ca. 48 h verwendet. Die Sequenzdaten wurden nach der Qualitätskontrolle mit der Software Epi2Me analysiert und mit einer Datenbank für Antibiotika-Resistenzgene abgeglichen. Weitere Informationen zur Methodik und Datenanalyse finden sich im Anhang 2.



## 2.3 Vergleich der Biotestergebnisse mit den Ergebnissen der chemischen Analytik

Um die Ergebnisse der ökotoxikologischen Biotests mit den Ergebnissen der chemischen Analytik zu vergleichen, wurde für beide Methoden eine Risikobeurteilung durchgeführt. Für die Biotests wurden effektbasierte Risikoquotienten ( $RQ_{bio}$ ) oder Effektquotienten ( $EQ_{bio}$ ) als das Verhältnis zwischen dem im Biotest gemessenen Wert und dem effektbasierten Schwellenwert (Toxizitätsschwelle) gemäss Gleichung 1 berechnet (Escher et al., 2021).

Gleichung 1 :

$$RQ_{bio} \text{ oder } EQ_{bio} = \frac{\text{gemessener Effekt}}{\text{effektbasierter Schwellenwert}}$$

Somit können *in-vitro*-Biotests, wie der kombinierte Algentest und der ER $\alpha$ -CALUX®, bei denen bioanalytische Äquivalenzkonzentrationen (BEQ) (ng/L) berechnet werden, und *in-vivo*-Biotests, wie der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen, bei denen Effektkonzentrationen (% der nativen Probe) bestimmt werden, in eine Gesamtbewertung einbezogen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass der maximale  $EQ_{bio}$  für *in-vivo*-Biotests 4 bis 5 beträgt, abhängig von den effektbasierten Schwellenwerten (siehe Tab. 4), während der  $RQ_{bio}$  für *in-vitro*-Biotests mit BEQ-Werten höher sein kann. Die Ergebnisse der Biotests wurden gemäss den folgenden RQ-Werten und Farbschemata klassifiziert (Tab. 5).

**Tab. 5: Einstufung der Wasserqualität, entsprechende Risikoquotienten (RQ) und Einhaltung des Schwellenwerts.**

| Qualität |            | Risikoquotient    | Schwellenwert |
|----------|------------|-------------------|---------------|
|          | Sehr gut   | $RQ < 0.1$        | Eingehalten   |
|          | Gut        | $0.1 \leq RQ < 1$ |               |
|          | Mässig     | $1 \leq RQ < 2$   | Überschritten |
|          | Ungenügend | $2 \leq RQ < 10$  |               |
|          | Schlecht   | $RQ \geq 10$      |               |

Um die Ergebnisse der Risikobeurteilung basierend auf den Biotestergebnissen mit jener basierend auf der chemischen Analytik zu vergleichen, wurden der  $RQ_{bio}$  oder  $EQ_{bio}$  für verschiedene Organismengruppen (Algen, Wirbellose und Fische) berechnet und mit den chemischen Risikoquotienten ( $RQ_{chem}$ ) verglichen.

Zusätzlich zur ökotoxikologischen Risikobewertung auf der Grundlage der Wirkungen wurde eine ökotoxikologische Risikobewertung auf der Grundlage der Ergebnisse der chemischen Analysen durchgeführt. Hierfür wurde ein Aliquot der Wasserproben, die auch in den Biotests untersucht wurden, mittels chemischer Analytik durch das Gewässer- und Bodenschutzlabor des Amts für Wasser und Abfall des Kantons Bern bestimmt. Die Daten wurden vom Kanton Solothurn zur Verfügung gestellt. Das chronische Risiko auf der Grundlage der chemischen Analyse ( $RQ_{chem}$ ) wurde berechnet, indem die gemessene Konzentration für jeden Stoff durch das entsprechende chronische Umweltqualitätskriterium (Doppler et al., 2020; Junghans et al., 2013) dividiert wurde. Für jeden Stoff wurden das Gesamtrisiko und das Risiko für die verschiedenen Organismengruppen berechnet, d.h. für Pflanzen ( $RQ_{chem P}$ ), für Wirbellose (Invertebraten) ( $RQ_{chem I}$ ) und für Wirbeltiere (Vertebraten) ( $RQ_{chem V}$ ). Für die Berechnung des Mischungsrisikos wurden die  $RQ_{chem}$  der verschiedenen Stoffe addiert ( $\sum RQ_{chem}$ ) (Gesamtrisiko und Risiko für die verschiedenen Organismengruppen).



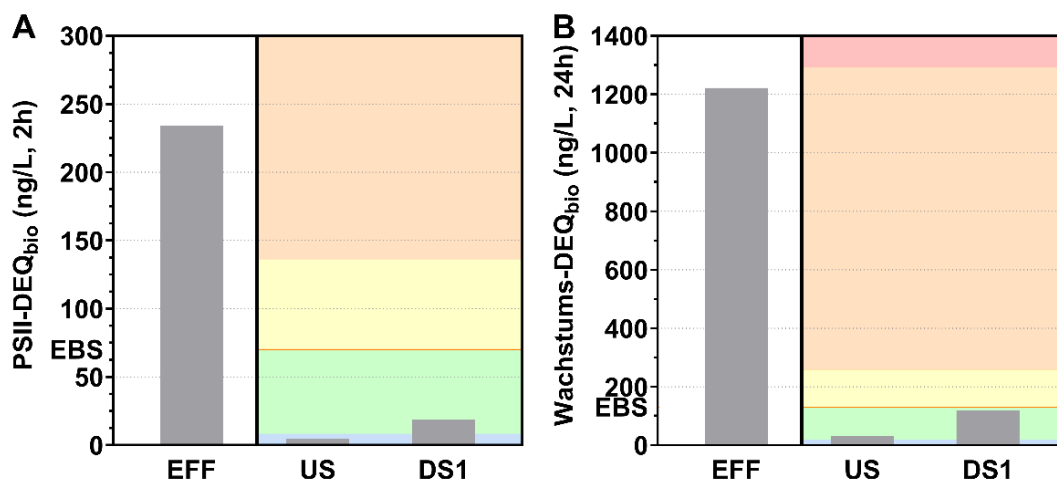
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kombiniertes Algentest

Im kombinierten Algentest konnte bei den Blanks keine Hemmung des Photosystems II über 10 % (entspricht 2-3 ng DEQ<sub>bio</sub>/L) gemessen werden und keine Hemmung des Wachstums über 20 % (entspricht 40 ng DEQ<sub>bio</sub>/L).

**Photosynthesehemmung nach 2 h:** Die DEQ<sub>bio</sub>-Werte für die Hemmung des Photosystems II lagen bei 234 ng/L im Abwasser der ARA Falkenstein und bei 5 und 19 ng/L in der Dünnern oberhalb und unterhalb des ARA-Ablaufs (Abb. 4A und Tab. 25 in Anhang 3). Die Werte in der Dünnern lagen somit deutlich unterhalb des effektbasierten Schwellenwerts für PSII-Hemmung von 70 ng DEQ<sub>bio</sub>/L.

**Wachstumshemmung nach 24 h:** Die DEQ<sub>bio</sub>-Werte für die Hemmung des Wachstums lagen bei 1'222 ng/L in der Probe der ARA Falkenstein und bei 32 und 120 ng/L in den Proben der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs (Abb. 4B und Tab. 25 in Anhang 3). Auch für diesen Parameter lagen die Werte unterhalb des effektbasierten Schwellenwertes für Wachstumshemmung von 130 ng DEQ<sub>bio</sub>/L.



**Abb. 4: Kombiniertes Algentest: Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ<sub>bio</sub>, ng/L) für die Hemmung der Photosynthese nach 2 h (A) und die Hemmung des Wachstums nach 24 h (B) in Probenextrakten aus dem Abwasser der ARA Falkenstein und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs.**

Mittelwert aus zwei Messungen. Die farbige Linie markiert den effektbasierten Schwellenwert (EBS) für die Photosynthesehemmung (70 ng DEQ<sub>bio</sub>/L) und für die Wachstumshemmung (130 ng DEQ<sub>bio</sub>/L). Bei Überschreitung dieser Werte kann das Risiko einer Wirkung auf Algen und andere Wasserpflanzen nicht ausgeschlossen werden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 0.59 ng PSII-DEQ<sub>bio</sub>/L und bei 11 ng Wachstums-DEQ<sub>bio</sub>/L. Farbige Bereiche: Wasserqualitätsklassen für Oberflächengewässer (blau: sehr gut, grün: gut, gelb: mässig, orange: unbefriedigend). US = upstream, Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 = downstream, Dünnern unterhalb ARA-Ablauf.

Beim Parameter Wachstumshemmung ist zu beachten, dass dieser deutlich weniger robust ist als der Parameter Photosynthesehemmung. Die Versuche wurden mit größtmöglicher Sorgfalt durchgeführt, da aber in den letzten Monaten am Oekotoxzentrum Probleme mit dem Parameter Wachstumshemmung aufgetreten sind, die noch nicht vollständig gelöst sind, sind diese Werte mit Vorsicht zu betrachten. Um möglichst aussagekräftige Werte zu erhalten wurde der Test mit den Proben zweimal durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl PSII- als auch Wachstums-DEQ-Werte gut reproduzierbar und damit für diesen Datensatz robust sind (siehe Tab. 25 und Abb. 25 im Anhang 3).

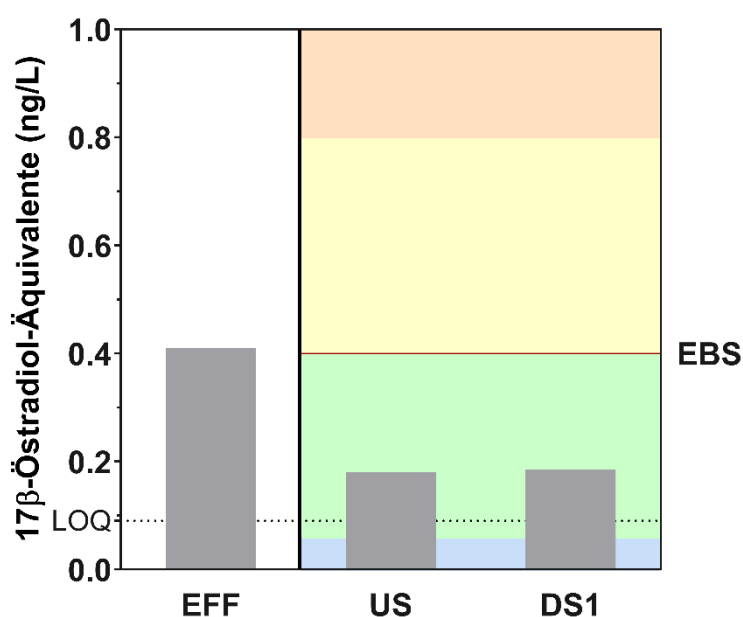


Die gemessenen  $DEQ_{bio}$ -Werte für die PSII-Hemmung im Abwasser liegen im Vergleich zu anderen ARA in der Schweiz im unteren Bereich, jene für die Wachstumshemmung im mittleren Bereich (Kienle et al., 2019). Die in den Proben der Dünnern gemessenen Werte sind für beide Parameter im Vergleich zu anderen Schweizer Oberflächengewässern im unteren Bereich (Kienle et al., 2019). Hier könnten u.a. der vermutlich geringe Einsatz von Pflanzenschutzmitteln im Einzugsgebiet während der Probenahmezeit im August und die Verdünnung des Abwassers im Gewässer eine Rolle spielen. Die Probenahmen in der Studie von Kienle et al. (2019) fanden im Mai/Juni statt.

### 3.2 $ER\alpha$ -CALUX®

Der  $ER\alpha$ -CALUX® war valide. Es konnte keine östrogene Aktivität in den Blanks und der Lösungsmittelkontrolle detektiert werden.

Die  $EEQ_{bio}$ -Werte für östrogene Aktivität lagen bei 0.41 ng/L im Abwasser der ARA Falkenstein und bei jeweils 0.18 ng/L in der Dünnern oberhalb und unterhalb des ARA-Ablaufs (Abb. 5 und Tab. 26 im Anhang 3) und somit unterhalb des effektbasierten Schwellenwerts für östrogene Aktivität von 0.4 ng  $EEQ_{bio}/L^3$ . Im Gegensatz zu anderen Gewässern (z.B. (Kienle et al., 2019)) wurde somit kein Unterschied in den  $EEQ_{bio}$ -Werten zwischen ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs festgestellt. Sowohl die Werte für das Abwasser als auch die Proben der Dünnern lagen im unteren Bereich im Vergleich zu anderen Standorten (Kienle et al., 2019).



**Abb. 5:  $ER\alpha$ -CALUX®: 17β-Östradiol-Äquivalenzzkonzentrationen ( $EEQ_{bio}$ , ng/L) für östrogene Aktivität in Probenextrakten aus dem Abwasser der ARA Falkenstein (EFF) und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs (US und DS1).**

Mittelwert aus zwei Messungen. Die farbige Linie markiert den effektbasierten Schwellenwert (EBS) (0.4 ng  $EEQ_{bio}/L$ ). Bei Überschreitung dieses Wertes kann das Risiko einer östrogenen Wirkung auf Wasserorganismen nicht ausgeschlossen werden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 0.09 ng  $EEQ_{bio}/L$ . Farbige Bereiche: Wasserqualitätsklassen für Oberflächengewässer (blau: sehr gut, grün: gut, gelb: mässig, orange: unbefriedigend). US = upstream, Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 = downstream, Dünnern unterhalb ARA-Ablauf.

<sup>3</sup> Es ist zu beachten, dass bei einem effektbasierten Schwellenwert von 0.07 ng/L die Wasserqualität bezüglich östrogen-wirksamer Stoffe in der Dünnern ober- und unterhalb der ARA Falkenstein als «mässig» eingestuft würde.



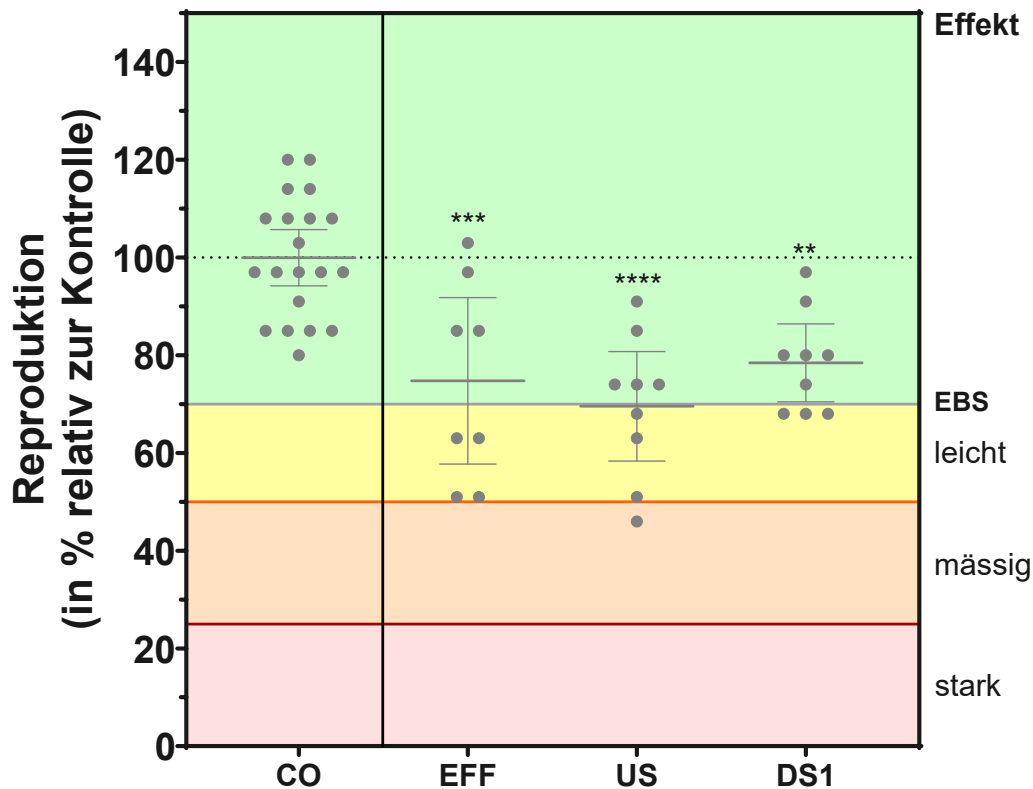
### 3.3 Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (*Ceriodaphnia dubia*)

#### Qualitätssicherung:

Alle Tests mit Kontrollwasser haben die Validitätskriterien der AFNOR und ISO erfüllt. Am 7. Tag lag das Überleben der Mütter bei  $\geq 80\%$  und der Anteil der Männchen bei  $\leq 20\%$ ; mindestens 60 % der lebenden Mütter hatten ein Minimum von 3 Bruten produziert und die mittlere Anzahl an Nachkommen je lebender Mutter war  $\geq 15$ . Daher kann der Test als valide eingestuft werden.

#### Fortpflanzung und Überleben der Testorganismen

In keiner der Proben der ARA Falkenstein und der Dünnern wurde eine erhöhte Sterblichkeit der Mütter festgestellt. Abb. 6 gibt einen Überblick über die Fortpflanzung (in % relativ zur Kontrolle) in den untersuchten Wasserproben (weitere Details siehe Anhang 3). In allen drei Proben wurde eine signifikante Hemmung der Fortpflanzung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Am US-Standort betrug diese Hemmung im Mittel 30 % (effektbasierter Schwellenwert), an den beiden anderen Standorten lag die Fortpflanzungshemmung unter diesem Wert.



**Abb. 6: Reproduktionstest mit *Ceriodaphnia dubia*: Fortpflanzung der Mütter nach 8 Tagen Exposition gegenüber Wasserproben der ARA Falkenstein (EFF) und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs (US und DS1) (dargestellt in % relativ zur Kontrolle (CO)).**

Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, die Punkte sind die einzelnen Messwerte.  $n = 8-9$  bzw. 20 Replikate à 1 Wasserfloh pro Testansatz (Proben von ARA Falkenstein und Dünnern bzw. Kontrolle). Die graue Linie zeigt den Schwellenwert an unter dem die Ergebnisse als signifikant beurteilt werden können (leichter Effekt). Die rote Linie gibt den Schwellenwert an unterhalb dessen die Effekte als stark eingestuft werden können. Sternchen weisen auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle hin, basierend auf statistischen Tests (siehe Anhang 2) und unabhängig von den Schwellenwerten. US = upstream, Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 = downstream, Dünnern unterhalb ARA-Ablauf.



### 3.4 Vergleich der Biotestergebnisse mit den Ergebnissen der chemischen Analytik

Von den rund 120 analysierten aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffen und Pestiziden sowie deren Metaboliten wurden 40 oberhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) gemessen. Für 37 dieser Stoffe waren akute und chronische Umweltqualitätskriterien (UQK) auf der Website und/oder in der UQK-Datenbank des Oekotoxizentrums verfügbar, für 7 dieser UQK war die Datenlage jedoch nicht robust genug, um sie für die Risikobeurteilung verwenden zu können. Daher wurden 29 Stoffe in die Risikobeurteilung einbezogen. Der berechnete Mischungsrisikoquotient ( $\sum RQ_{chem}$ ) war in der Probe vom ARA-Ablauf am höchsten und lag für alle drei Organismengruppen mehr als 10fach über 1, gefolgt von der DS1-Probe, auch hier lag der  $\sum RQ_{chem}$  für alle drei Organismengruppen  $>1$ . Die geringsten Werte traten in der US-Probe auf, hier lag der Mischungsrisikoquotient bei 0 (siehe Tab. 6).

In der Probe aus dem ARA-Ablauf lagen die Konzentrationen der Antibiotika Azithromycin und Clarithromycin über dem UQK, ebenso wie die Konzentration des Insektizids Fipronil, jedoch weniger als 10fach. Die Konzentration des Pharmazeutikums Diclofenac lag um das 30-fache über dem UQK. Diclofenac ist der einzige gemessene Stoff, bei dem das UQK auch in der Dünnern unterhalb des ARA-Ablaufs überschritten wurde. Weitere Stoffe, die hier zum Mischungsrisiko beitrugen, waren Azithromycin, Clarithromycin, Diuron und Sulfamethoxazol mit chronischen  $RQ_{chem}$  von jeweils 0.74, 0.16, 0.13 und 0.1.

Tab. 6 gibt einen Überblick über die Mischungsrisikobeurteilung basierend auf chemischer Analytik und die effektbasierte Risikobeurteilung.

**Tab. 6: Ergebnisse der Risikobeurteilung basierend auf den Daten der chemischen Analytik und der Biotests. Die Farben geben die Höhe der Risikoquotienten wieder: blau = 0 - 0.1, grün = 0.1 - <1, gelb = 1 - <2, orange = 2 - <10, rot = 10 - Maximalwert.**

|                           |                                    | ARA  | US  | DS1 |
|---------------------------|------------------------------------|------|-----|-----|
| <b>Chemische Analytik</b> | Chronisches Mischungsrisiko gesamt | 49.8 | 0.0 | 6.2 |
| Pflanzen                  |                                    |      |     |     |
| <b>Chemische Analytik</b> | Chronisches Mischungsrisiko        | 11.5 | 0.0 | 1.3 |
| <b>Algen</b>              | Wachstumshemmung                   | 3.3  | 0.1 | 0.3 |
|                           | PSII-Hemmung                       | 9.4  | 0.2 | 0.9 |
| Invertebraten             |                                    |      |     |     |
| <b>Chemische Analytik</b> | Chronisches Mischungsrisiko        | 47.4 | 0.0 | 5.8 |
| <b>Ceriodaphnia</b>       | Fortpflanzung                      | 0.8  | 1.0 | 0.7 |
|                           | Sterblichkeit                      | 0.0  | 0.0 | 0.0 |
| Vertebraten               |                                    |      |     |     |
| <b>Chemische Analytik</b> | Chronisches Mischungsrisiko        | 30.4 | 0.0 | 4.9 |
| <b>Fisch-Zelllinien</b>   | Akute Effekte                      | 0.0  | 0.0 | 0.0 |
|                           | Sublethale Effekte                 | 0.0  | 1.0 | 1.0 |
|                           | Matrix-Effekte                     | 0.0  | 1.0 | 1.0 |

Für die Organismengruppe der Pflanzen lagen  $RQ_{chem}$  und  $RQ_{bio}$  in der Probe vom ARA-Ablauf über 10, in der DS1-Probe lagen beide Werte um 1 und in der US-Probe deutlich unter 1. Die Ergebnisse der Risikobeurteilung basierend auf chemischer Analytik und Biotest waren gut vergleichbar. Das wurde auch bereits in früheren Studien beobachtet (Kienle et al., 2023b). Bei den Invertebraten waren die chronischen Mischungsrisikoquotienten im ARA-Ablauf über 10 und bei der DS1-Probe deutlich über 1, wohingegen der Biotest mit Wasserflöhen kaum Risiken für Invertebraten aufgezeigt hat. Dies kann mit der Empfindlichkeit der Testorganismen gegenüber den relevanten Stoffen zusammenhängen und wurde auch in einer früheren Studie beobachtet



(Kienle et al., 2023b). In dieser Studie waren Pyrethroide die Substanzgruppe mit den höchsten Risikoquotienten. Im Vergleich zur empfindlichsten Organismengruppe, den Amphipoden, sind Wasserflöhe hierfür um den Faktor 100 bis 1000 weniger empfindlich. (Deanovic et al., 2013). Bei der Organismengruppe der Vertebraten lag der Risikoquotient im ARA-Ablauf deutlich über 10 und in der DS1-Probe deutlich über 1, der Biotest mit Fischzelllinien zeigte leichte Matrix- und sublethale Effekte in den US- und DS1-Proben. In der Studie von Kienle et al. (2023b) zeigten der Fischzelllinientest und ein Biotest mit Fischembryonen und -larven Effekte in Wasserproben, bei denen die chemische Analytik nicht auf ein Risiko hindeutete. Insgesamt liegen bisher nur wenige Erfahrungen mit dem Vergleich von Risiken vor, die auf der Basis von chemischer Analytik und Biotests ermittelt wurden.

### **3.5 Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien**

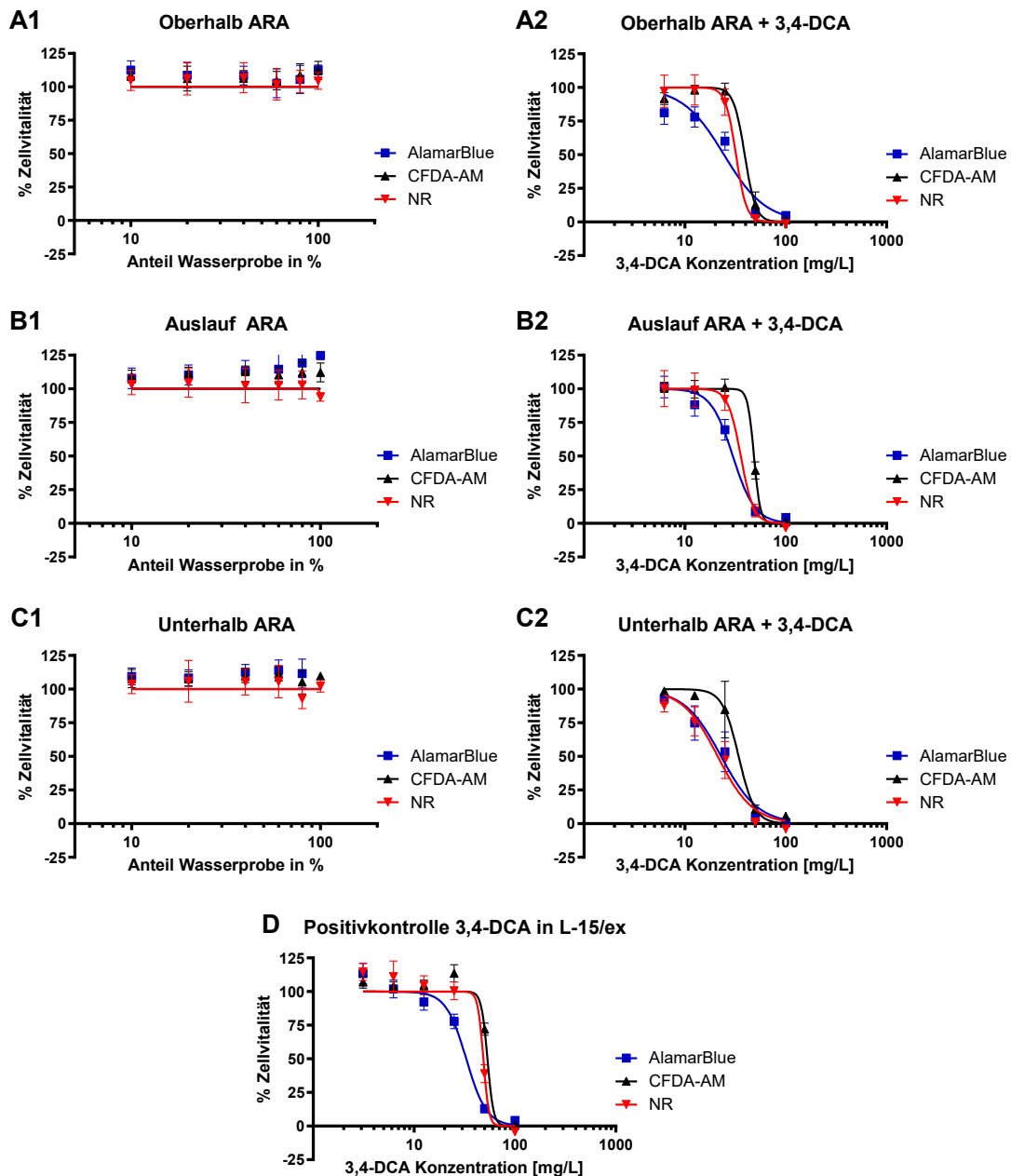
#### **3.5.1 Akute Toxizität der Wasserproben nach ISO 21115**

Die Ergebnisse der Positivkontrolle 3,4-DCA im Zellexpositionsmedium L-15/ex liegen innerhalb des in der in der ISO 21115 angegebenen Akzeptanzbereichs der EC50-Werte für alle drei Indikatorfarbstoffe, was die gesamte Testdurchführung validiert.

Keine der drei getesteten Wasserproben führte bei den drei Indikatorfarbstoffen zu einer Reduktion der Zellvitalität von mehr als 10 % (siehe A1, B1 und C1 in Abb. 7 und Tab. 27 im Anhang 3). Die Wasserproben hatten somit keine akut toxische Wirkung auf die RTgill-W1 Zellen.

Die Positivkontrolle in der 100%igen Wasserprobe zeigte eine leichte Verschiebung nach links für die Probe oberhalb der ARA (US) für AlamarBlue und für die Probe unterhalb der ARA (DS) für AlamarBlue und NeutralRed (siehe rot markierte Werte für A2 und C2 in Tab. 27 im Anhang 3). Dies deutet auf einen leichten Matrixeffekt hin, bei dem die Wasserprobe eine leichte subletale Toxizität auf die Zellen bewirkt, die durch die zusätzliche Belastung mit 3,4-DCA verstärkt wird.

Anzumerken ist, dass trotz Filtration der aufgesalzenen Wasserproben am Ende der 24 h Expositionszeit in allen drei Wasserproben eine leichte Kontamination mit Mikroorganismen unter dem Mikroskop beobachtet wurde, die jedoch keinen Einfluss auf die Toxizität in den Ergebnissen erkennen liess.



**Abb. 7: Toxizität in einer Fischzelllinie: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der drei getesteten Wasserproben in Verdünnung (A1, B1, C1), der 100%igen Wasserproben plus Positivkontrolle 3,4-DCA (A2, B2, C2) und der Positivkontrolle im Zellexpositionsmedium L-15/ex (D) für die drei Fluoreszenzfarbstoffe, die zur Quantifizierung der Zellvitalität in % zur Kontrolle verwendet wurden.**

Die Daten sind auf der Grundlage vom Anteil der Wasserprobe in % oder der 3,4-DCA-Konzentrationen in mg/L aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der pro Testkonzentration gemessenen technischen Triplikate dar.

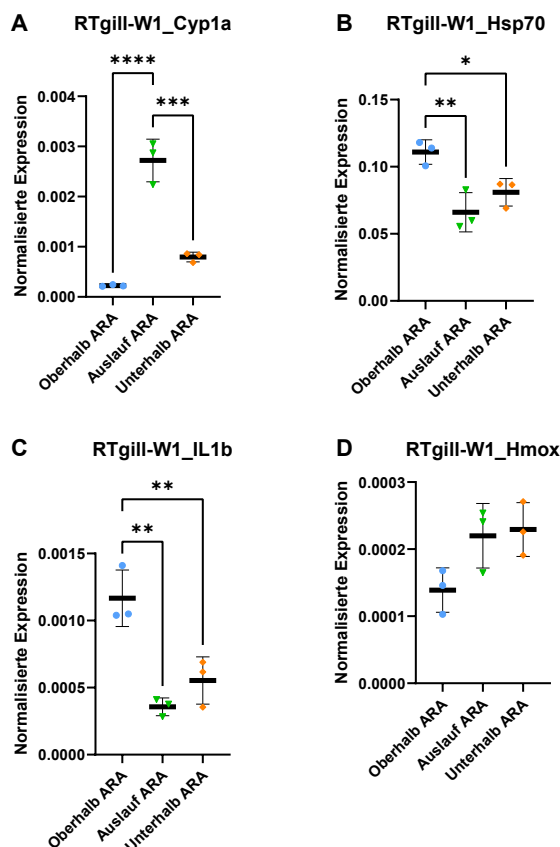


### 3.5.2 Regulierung der Expression von Biomarkergenen

Durch die Untersuchung von Biomarkergenen, die subletale, nicht akut-toxische Effekte erfassen, können molekulare Reaktionen in den Zellen gegenüber Umweltverunreinigungen detektiert werden. Dadurch werden Informationen über die Wasserqualität und mögliche Beeinträchtigungen der Zellfunktionen gewonnen, welche auf Fische übertragen werden können, die in den untersuchten Gewässerabschnitten leben.

Die verwendeten Markergene wurden bereits erfolgreich in Studien zur Untersuchung der Wasserqualität mit wild gefangenen juvenilen Bachforellen angewendet. Dazu gehörten Biomarkergene für die Aktivierung der Biotransformation (CYP1A, CYP3A, GST), die allgemeine Stressantwort (ABCB1a, PXR, HSP70), die Immunantwort (IL1b, IL8, Socs, TNFalfa), oxidativen Stress und Metallbelastung (NrF2, Hmox, MTa, MTb), Zellzyklus und Karzinogenese (C-myc, C-fos), Auswirkungen auf den Stoffwechsel (PEPCK), östrogene Wirkungen (VTG, ER $\alpha$ ) und neurotoxische Wirkungen (AChE). Tab. 18 im Anhang gibt eine Übersicht aller untersuchter Biomarkergene und deren Funktion. Im Rahmen der Bestrebungen die Wasserqualität und Auswirkungen auf die Fischgesundheit auch ohne die Notwendigkeit einer Fischbeprobung beurteilen zu können, stellen Fischzelllinien eine vielversprechende Alternative dar, die derzeit etabliert wird.

Beispielhaft sind in Abb. 8 die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse in RTgill-W1 Zellen von vier verschiedenen Markergenen, welche unterschiedliche zelluläre Funktionen widerspiegeln, dargestellt.



**Abb. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von für 24 h mit den Wasserproben exponierten RTgill-W1 Zellen (Daten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition). Beispielhaft ist je ein Markergen für die zelluläre Funktion Biotransformation (A), allgemeine Stressantwort (B), Immunantwort (C) und oxidativer Stress (D) dargestellt.**

Die Signifikanzanalyse wurde mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Standorten sind mit Sternchen markiert (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0332$ , \*\*\*  $p < 0.0021$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).



In Abb. 9 sind die Ergebnisse aller untersuchten und auswertbaren Markergene als Heatmap im paarweisen Vergleich dargestellt wobei "Unterhalb" und "Oberhalb" als Basis dienen". So zeigen z.B. die roten Boxen in der oberen Reihe zum Gen CYP1A (Biotransformation) an, dass dieses Gen im Auslauf signifikant hochreguliert wurde im Vergleich zu Oberhalb und Unterhalb.

| Zelluläre Funktion                  | Markergen | Signifikante Unterschiede in der Genexpression |                        |                       |                      |                        |                       |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
|                                     |           | RTgill-W1                                      |                        |                       | RTgutGC              |                        |                       |
|                                     |           | Oberhalb vs. Auslauf                           | Oberhalb vs. Unterhalb | Unterhalb vs. Auslauf | Oberhalb vs. Auslauf | Oberhalb vs. Unterhalb | Unterhalb vs. Auslauf |
| Biotransformation                   | CYP1A     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | CYP3A     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | GST       |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Allgemeine Stressantwort            | ABCB1a    |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | PXR       |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | HSP70     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Immunantwort                        | IL-1b     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | IL8       |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | Socs3     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Oxidativer Stress & Metallbelastung | NrF2      |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | Hmox      |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | Mta       |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Zellzyklus/ Karzinogenese           | C-myc     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
|                                     | C-fos     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Metabolismus                        | PEPCK     |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |
| Neurotransmission                   | AChE      |                                                |                        |                       |                      |                        |                       |

|      |                                          |
|------|------------------------------------------|
|      | p > 0.05, kein signifikanter Unterschied |
| *    | p < 0.05                                 |
| **   | p < 0.0332                               |
| ***  | p < 0.0021                               |
| **** | p < 0.0001                               |

**Abb. 9: Übersichts-Heatmap zur Verdeutlichung der signifikanten Unterschiede aller gemessenen subletalen Effekte in den für 24 h mit den Wasserproben exponierten RTgill-W1 und RTgutGC Zellen (Daten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition).**

Die Signifikanzanalyse wurde mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Standorten sind farblich markiert (gelb p < 0.05, orange p < 0.0332, hellrot p < 0.0021, rot p < 0.0001). Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind als grüne Felder dargestellt

Bei der Untersuchung der Biotransformation wurde CYP1A bei Zellen, die mit Wasser aus dem ARA-Ablauf exponiert wurden, stärker gebildet (exprimiert) als bei Zellen, die mit dem Wasser der Probenahmestellen oberhalb oder unterhalb des ARA-Ablaufs in Kontakt kamen. Dies weist darauf hin, dass im ARA-Ablauf vermehrt Mikroverunreinigungen wie z.B. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe vorhanden sind. Durch Verdünnung des Abwassers wurde dieser Effekt unterhalb der ARA weniger stark detektiert. Die Expression von CYP1A in der Darmzelllinie RTgutGC zeigte vergleichbare Ergebnisse. Bei den anderen beiden untersuchten Markergenen für Biotransformation, Cyp3a und GST, wurde keine signifikante Regulierung detektiert.

HSP70, ein Markergen für allgemeinen Stress, wurde sowohl für Wasserproben vom ARA-Ablauf als auch von Unterhalb signifikant reguliert im Vergleich zu Oberhalb. Bei der Darmzelllinie RTgutGC zeigt sich für dieses Gen kein signifikanter Unterschied, dafür aber bei den zwei anderen Markergen-Vertretern für allgemeinen Stress, ABCB1a und PXR.

Auch die Immunantwort, hier beispielhaft für die Regulierung des Interleukins IL1b dargestellt, einem Peptidhormon und körpereigenen Botenstoff des Immunsystems, war in Proben vom ARA-



Ablauf und von Unterhalb signifikant beeinflusst im Vergleich zur Wasserprobe von Oberhalb. Dies ist auch bei den anderen beiden Markergenen dieser Gruppe der Fall (IL8, Socs3), was für einen Eintrag von Pathogenen durch das ARA-Abwasser spricht. Im Fall der RTgill-W1 Zelllinie war der Verdünnungseffekt in der Probe von unterhalb des ARA-Ablaufs weniger deutlich wie für die Biotransformation. Für RTgutGC wurde ebenfalls eine signifikante Regulierung der Interleukine für Wasserproben aus dem ARA-Ablauf im Vergleich zu Oberhalb gemessen.

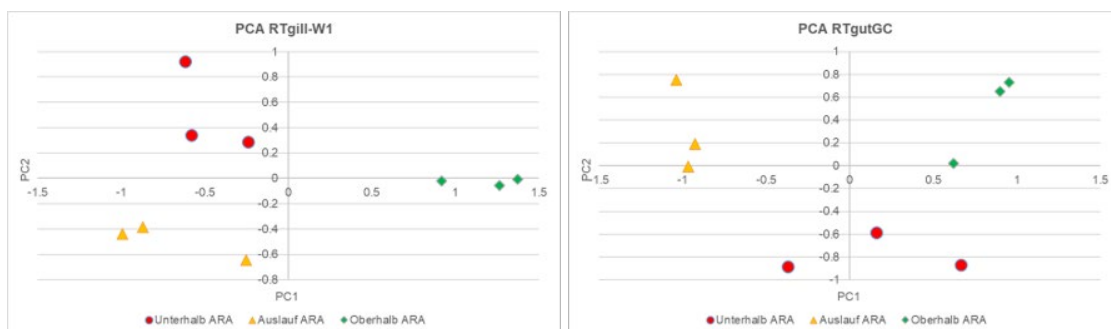
Die Messung des Hmox als Anzeiger für oxidativen Stress zeigte keine signifikante Regulierung in den RTgill-W1 Zellen. Dahingegen wurde Hmox in RTgutGC Zellen, die mit Wasser vom ARA-Ablauf exponiert wurden, signifikant reguliert. Die Untersuchung von MTa zeigte eine signifikante Regulierung für die Wasserproben von Unterhalb in den RTgill-W1 und RTgutGC Zellen, was auf eine Belastung mit Metallen oder Glukokortikoiden hindeutet, welche aber nicht aus dem ARA-Ablauf zu stammen scheinen (dort wurden diese Gene nicht signifikant reguliert). Gegen eine Belastung mit Glukokortikoiden spricht, dass der gemessene Markergen-Vertreter für Metabolismus, PEPCK, in beiden Zelllinien keine signifikante Regulierung zeigte, womit Metalle als mögliche verantwortliche Stoffe für die signifikante Regulierung übrigbleiben.

Eine signifikante Regulierung des Zellzyklus durch Proben vom ARA-Ablauf und von Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb wurde in beiden Zelllinien für c-myc detektiert und ebenfalls für c-fos in RTgill-W1 Zellen.

Ein Einfluss auf Neurotransmission wurde bei den mit Wasser von Unterhalb exponierten RTgutGC Zellen im Vergleich zu Oberhalb detektiert.

Die Untersuchung der Gene TNFalpha, MTb, VTG und ERa hat keine auswertbaren Ergebnisse hervorgebracht, weil entweder die Effizienz der Primer zu gering war oder der kritische Schwellenwert in der qPCR erst bei sehr hoher Zyklenzahl erreicht wurde. Da diese Gene in Fischgeweben sehr gut nachweisbar waren, bleibt es zu untersuchen, ob sie in den Zelllinien mit Positiv-Kontrollsubstanzen induzierbar wären bzw. auch besser geeignete Primer designt werden können.

Zusätzlich wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) durchgeführt (siehe Abb. 10). Mittels einer solchen Analyse werden die Ergebnisse aller getesteten Biomarker der verschiedenen Standorte integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet. Bei beiden Zelllinien zeigt sich eine klare Abtrennung der verschiedenen Expositionen zueinander, wobei sich bei RTgill-W1 das Cluster der Zellen, die mit Wasser von Oberhalb behandelt wurden, etwas mehr abzutrennen scheint als bei den RTgutGC-Zellen. Nach der Aufrüstung der ARA wäre es wünschenswert zu sehen, dass die Gruppen von Oberhalb und Unterhalb der ARA zusammenfallen, was für eine Verringerung des Einflusses des Abwassers auf die Wasserqualität der Dünnern sprechen würde.



**Abb. 10: Hauptkomponentenanalyse (PCA) aller getesteten Biomarkergene in den Zelllinien RTgill-W1 und RTgutGC (Genexpressionssda-ten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition).**



## 3.6 Genexpression in Bachflohkrebsen

### 3.6.1 Abiotische Daten

Beim Einsetzen und bei der Probenahme der Bachflohkrebsen wurden die abiotischen Parameter im Gewässer jeweils mit einer Punktmessung bestimmt. Wie in Tab. 7 sichtbar, ist bei der Leitfähigkeit und dem pH ein geringer Einfluss der ARA bemerkbar, ein grosser Unterschied ergab sich beim Sauerstoffgehalt, der von 110.7 % beim US-Standort auf nur noch 29.4 % beim DS-Standort sank. Der Sauerstoffgehalt blieb auch ca. 350 m nach dem ARA-Ablauf niedrig (30.5 %). Die Temperatur zeigte zum Zeitpunkt des Einsetzens der Bachflohkrebsen keinen Unterschied. Bei der Probenahme einen Monat später betrug der Temperaturunterschied 1 °C. Ein vergleichbarer Temperaturunterschied konnte auch anhand der Datenlogger nachgewiesen werden. Während der einmonatigen Expositionszeit wurden am US-Standort 9.96 °C und am DS-Standort 10.5 °C gemessen.

**Tab. 7: Abiotische Daten von Punktmessungen während der Aussetzung und Probenahme der Bachflohkrebsen bei der ARA Falkenstein (US = upstream, DS = downstream)**

| Probenahme    | O <sub>2</sub> (%) | Leitfähigkeit (µS/cm) | Temp. (°C) | pH  |
|---------------|--------------------|-----------------------|------------|-----|
| US 05.04.2023 | 110.7              | 411                   | 10.2       | 8.5 |
| DS 05.04.2023 | 29.4               | 545                   | 10.2       | 8.1 |
| US 08.05.2023 | 105.7              | 418                   | 12         | 8.5 |
| DS 08.05.2023 | 91                 | 468                   | 13         | 7.8 |

Tab. 8 zeigt die abiotischen Daten aller im Jahr 2023 untersuchten ARA. Diese sind dargestellt, um einen Vergleich zwischen ausgebauten und nicht ausgebauten ARA wie der ARA Falkenstein zu ermöglichen. Die ARA A war im Jahr 2023 noch vor dem Ausbau, die ARA B war teilweise ausgebaut, jedoch ohne Stufe zur Entfernung von Mikroverunreinigungen und die ARA C war eine fertig ausgebaut ARA inklusive Stufe zur Entfernung von Mikroverunreinigungen.

**Tab. 8: Mittelwerte der abiotischen Parameter aller untersuchten ARA aus dem Jahr 2023 (US = upstream, DS = downstream)**

| Abiotische Parameter             | ARA Falkenstein |       | ARA A |       | ARA B |       | ARA C |       |
|----------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                  | US              | DS    | US    | DS    | US    | DS    | US    | DS    |
| Temperatur °C                    | 9.96            | 10.53 | 11.10 | 12.95 | 9.46  | 9.84  | 9.46  | 9.84  |
| Sauerstoff (O <sub>2</sub> mg/L) | 11.31           | 6.11  | 11.49 | 4.75  | 10.49 | 10.81 | 11.63 | 11.82 |
| Leitfähigkeit (µS/cm)            | 414.5           | 506.5 | 334.6 | 680   | 531.5 | 665   | 529.5 | 563   |
| pH                               | 8.52            | 7.94  | 8.2   | 7.48  | 8.5   | 7.8   | 8.46  | 8.44  |

Die Temperatur wurde während der gesamten Expositionszeit mit einem Datenlogger gemessen, der Mittelwert ist in Tab. 8 dargestellt. Die angegebenen Sauerstoff-, Leitfähigkeits- und pH-Werte sind die Mittelwerte der beiden Punktmessungen während des Einsetzens und Herausholens der Bachflohkrebsen.



### 3.6.2 Heatmap und Expressionscounts

Im Jahr 2023 wurden an der ARA-Falkenstein bei den Bachflohkrebsen im Gewässer in der Nähe des ARA-Ablaufs (DS) ausgesetzt waren, 403 Transkripte signifikant positiv und 157 Transkripte signifikant negativ reguliert im Vergleich zum US-Standort. Insgesamt wurden 560 signifikant veränderte Transkripte nachgewiesen. Bei anderen im Jahre 2023 untersuchten ARA wurden ähnliche Analysen durchgeführt und auch hier wurde der Einfluss des ARA-Ablaufs auf die Anzahl der unterschiedlich regulierten Genexpression sichtbar (Tab. 9). Hier war eine Abnahme der Anzahl regulierter Gene mit zunehmendem Ausbaustandard der ARA feststellbar.

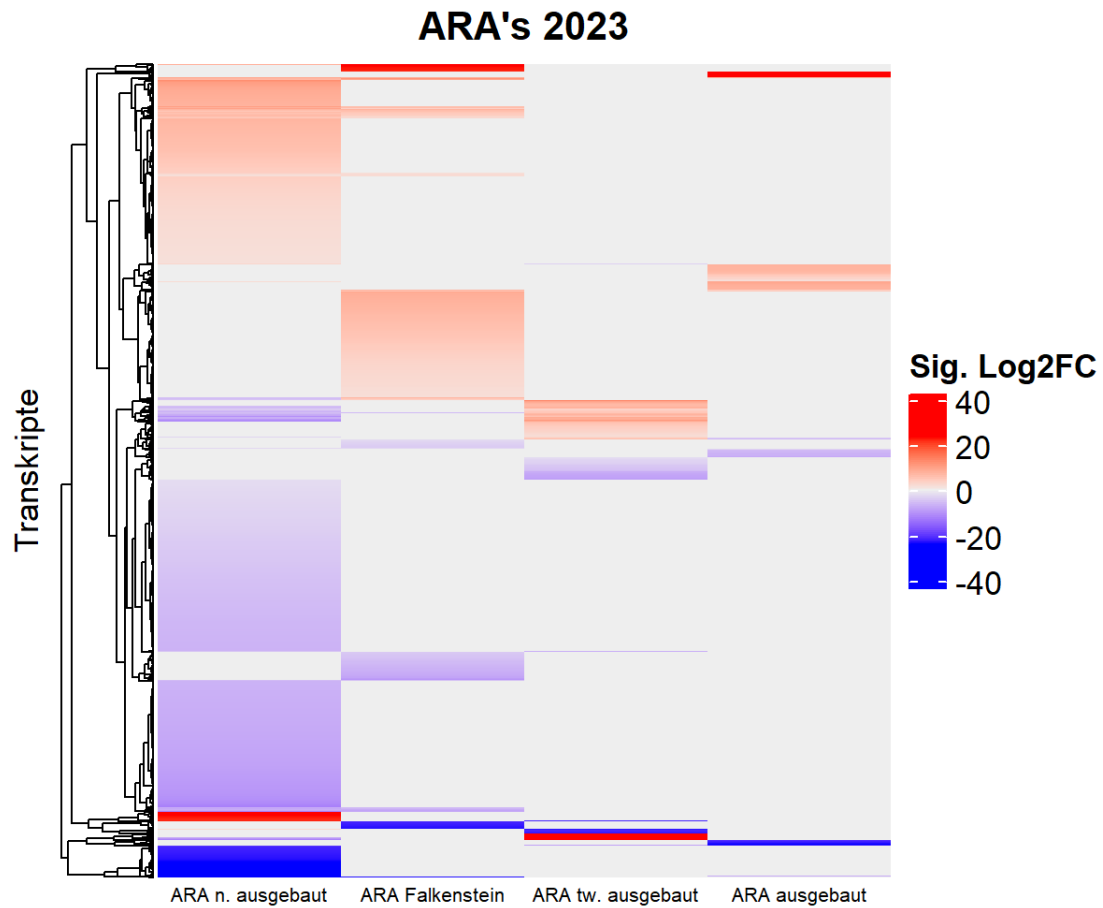
Die nicht ausgebauten ARAs weisen im Vergleich zu den Ausgebauten eine mindestens doppelt so hohe Anzahl an signifikant veränderten Transkripten vor. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der Sauerstoffgehalt bei der ARA A bei den Punktmessungen in einem noch niedrigeren Bereich lag als an der ARA-Falkenstein. Es kann daher nicht unterschieden werden, ob die Anzahl veränderter Transkripte durch die Stoffe im ARA-Ablauf oder durch die abiotischen Ausgangsbedingungen verursacht wurde.

Zudem sind sowohl die vorkommenden Bachflohkrebspopulationen genetisch unterschiedlich (Schneeweiss et al., 2023) als auch die örtlichen Gegebenheiten (Gewässergrösse, Abwasseranteil etc.), so dass die ARAs nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen und einem Wiederholen des Monitorings über mehrere Jahre sollen eindeutige Antworten auf die Frage erarbeitet werden, ob der Ausbau von ARA mit einer Stufe zur Elimination von Mikroverunreinigungen zu weniger Stress für die Bachflohkrebsse führt. Der Ausbau ging bisher immer mit einer Verbesserung des Sauerstoffgehaltes und der Leitfähigkeit zwischen US- und DS-Standorten einher.

**Tab. 9: Die Anzahl der signifikant veränderten Transkripte zwischen Up- und Downstream von allen ARA-Standorten aus dem Jahr 2023 (US = upstream, DS = downstream)**

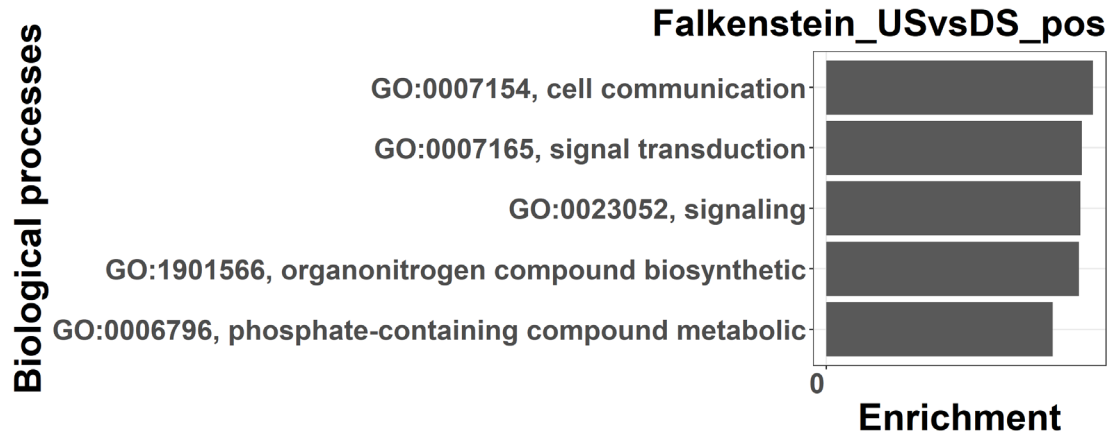
| Exposition                                                                       | Anzahl positiv regulierte Transkripte im Vergleich zu US | Anzahl negativ regulierte Transkripte im Vergleich zu US | Gesamtanzahl unterschiedlich regulierte Transkripte im Vergleich zu US |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| ARA Falkenstein                                                                  | 403                                                      | 157                                                      | 560                                                                    |
| ARA A vor Ausbau                                                                 | 591                                                      | 1071                                                     | 1662                                                                   |
| ARA B teilweise ausgebaut                                                        | 137                                                      | 93                                                       | 230                                                                    |
| ARA C Abgeschlossener Ausbau der Stufe zur Elimination von Mikroverunreinigungen | 100                                                      | 57                                                       | 157                                                                    |

Alle Veränderungen in der Genexpression wurden in Abb. 11 in einer Heatmap graphisch dargestellt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde primär auf die Anzahl signifikant veränderter Transkripte eingegangen, da es derzeit noch kein auf Bachflohkrebsen annotiertes Referenzgenom gibt.



**Abb. 11: Heatmap mit dem Log2 Fold change der Transkripte der Bachflohkrebs der verschiedenen ARAs aus dem Jahr 2023. Die Differential Expression wurde jeweils zwischen Up und Downstream errechnet. Dargestellt sind nur die signifikant veränderten Transkripte.**

Derzeit ist keine zuverlässige Annotation des Transkriptoms verfügbar, um Aussagen auf spezifischer Transkriptebene machen zu können. Die aktuell verfügbaren GoEnrichment Terms (Abb. 12) zeigen zwar für einige biologische Prozesse eine erhöhte Regulation von Transkripten unterhalb der ARA, die Aussagekraft bleibt jedoch gering, da es sich um allgemeine Prozesse wie Signaltransduktion, Zellkommunikation, und Signalgebung handelt. Bei den GoEnrichment-Analysen im Jahr 2023 wurden keine Stoffwechselwege auffällig reguliert, die im Zusammenhang mit Schadstoffen bekannt sind. Derzeit wird die Datenauswertung weiterentwickelt. Durch die geplanten Untersuchungen in den kommenden Jahren ist davon auszugehen, dass sich die Datengrundlage verbessert und belastbarere Aussagen möglich werden.



**Abb. 12:** Die fünf am signifikantesten hochregulierten GO-Terms aus der GO-Enrichment Analyse der Bachflohkrebse am Standort unterhalb der ARA (DS) im Vergleich zu oberhalb (US).

### 3.7 Oligochaeten-Index

Die Oligochaeten-Gemeinschaften zeigten eine mässig veränderte Funktion am Standort US, eine stark veränderte Funktion am Standort DS1 und eine veränderte Funktion am Standort DS2. Am Standort US war der Anteil empfindlicher und mässig resistenter Taxa hoch und der Anteil resistenter Taxa niedrig. Am Standort DS1 war der Anteil sehr resistenter Taxa sehr hoch und der Anteil empfindlicher und mässig resistenter Taxa sehr niedrig. Der Einfluss des ARA-Ablaufs auf den Vorfluter war somit deutlich erkennbar. Am Standort DS2 wurde eine Erholung des Gewässers beobachtet, was wahrscheinlich auf die grosse Entfernung zwischen diesem Standort und dem ARA-Ablauf zurückzuführen ist. Die Intensität der Exfiltration, die durch das Vorhandensein bestimmter Oligochaeten-Arten/Taxa, die im Grundwasser vorkommen und/oder empfindlich auf chemische Verunreinigungen reagieren, angezeigt wird, war an allen drei Standorten hoch. Ohne diese Exfiltration (die die Selbstreinigung des Gewässers ermöglicht) wäre die biologische Qualität an diesen Standorten möglicherweise geringer. Zu Vergleichszwecken könnte es sinnvoll sein, die FTR-Methode zu einer anderen Jahreszeit anzuwenden, in der die Exfiltration eher gering oder zumindest weniger intensiv ist als im Sommer, z.B. im Winter oder Frühjahr. Weitere Details zu den Ergebnissen finden sich in Vivien and Ferrari (2023).



### 3.8 Mikrobiologische Untersuchung und Indikatoren für Antibiotikaresistenz

#### 3.8.1 Durchflusszytometrie - Häufigkeit und Charakterisierung von Mikroorganismen

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden gemäss der Funktionskontrolle des Messgerätes und der Negativkontrolle mit steril-filtrierte Wasser validiert. Die Gating-Strategie (Festlegung der Wertebereiche zur Unterscheidung mikrobieller Zellen von anderen Partikeln) wurde für die Messung neu justiert.

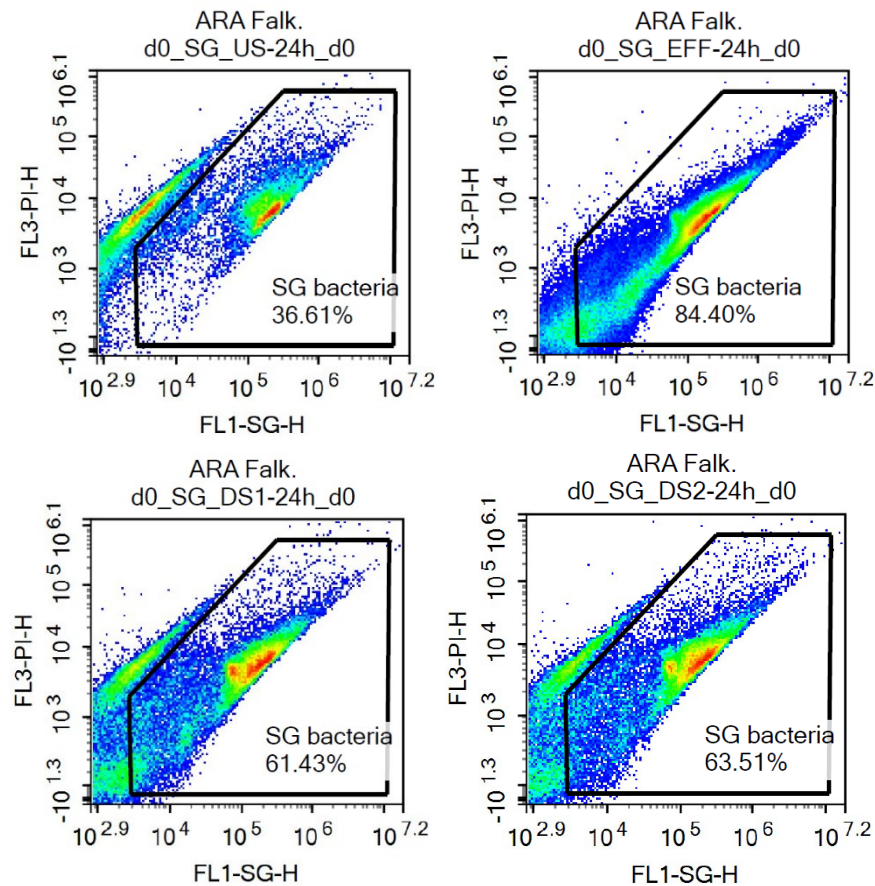
Die Gesamtzahl an mikrobiellen Zellen lag gemäss der Messung am US-Standort zwischen 10'000 und 13'000 Zellen / mL. Die Gesamtzellzahl im Ablauf der ARA (EFF) war im Durchschnitt ca. 5 x höher. Im Ablauf war zudem der Anteil der LNA ("Low Nucleic Acid"-Bakterien, kleine Bakterienzellen mit geringem DNA-Gehalt) deutlich höher. Der Einfluss der ARA ist dementsprechend unterhalb der Einleitungsstelle (DS) in höheren Gesamtzellzahlen und einem höheren LNA-Anteil im Vergleich zu oberhalb bei allen Probenahmekampagnen nachweisbar Tab. 10. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an anderen vergleichbaren Fließgewässern mit ARA-Einleitungen gemacht, z.B. am Standort Villeret eine Zunahme der Gesamtzellzahl um den Faktor 8 und eine Zunahme des LNA-Anteils von 50 auf über 70 %. Oder am Standort Münchwilen eine Verdopplung der Gesamtzellzahl und eine Zunahme des LNA-Anteils von 15 auf 43 % (H. Bürgmann & J. Lee, unpublizierte Daten zu (Lee et al., 2021)).

Dieser Einfluss der ARA ist auch im Muster der Zellgrößen / Fluoreszenzintensität der Zellpopulationen unterhalb der ARA sichtbar (Abb. 13).

**Tab. 10: Ergebnisse durchflusszytometrischer Messungen: Gesamtzellzahl und Anteil der HNA und LNA Fraktion (grosse / kleine Zelltypen)**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

| Kampagne | Messstelle | Gesamtzellzahl<br>(Zellen/mL) | HNA<br>(%) | LNA<br>(%) |
|----------|------------|-------------------------------|------------|------------|
| No.1     | US         | 10'846                        | 81.42      | 18.58      |
| No.1     | EFF        | 50'193                        | 61.53      | 38.47      |
| No.1     | DS1        | 15'190                        | 68.43      | 31.57      |
| No.1     | DS2        | 13'909                        | 79.68      | 20.32      |
| No.2     | US         | 12'250                        | 85.36      | 14.64      |
| No.2     | EFF        | 60'577                        | 55.74      | 44.26      |
| No.2     | DS1        | 21'670                        | 73.49      | 26.51      |
| No.2     | DS2        | 18'875                        | 82.45      | 17.55      |
| No.3     | US         | 13'187                        | 89.59      | 10.41      |
| No.3     | EFF        | 87'316                        | 74.42      | 25.58      |
| No.3     | DS1        | 29'635                        | 74.94      | 25.05      |
| No.3     | DS2        | 31'059                        | 80.12      | 19.87      |



**Abb. 13: Beispielhafte Scatterplots der Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrisch bestimmten Partikel und Gate für die Gesamtzellzahlbestimmung (SG bacteria) der Probenahme-kampagne Nr. 3.**

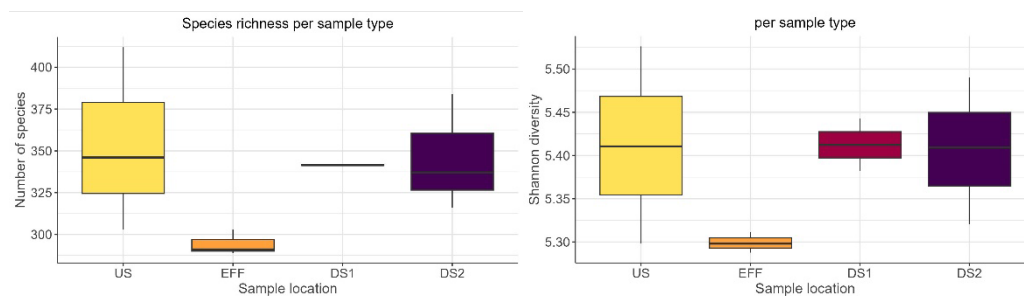
FL1-SG-H: Fluoreszenzintensität in der Wellenlänge des SYBRgreen-DNA Komplexes. FL3-PI-H Intensität der unspezifischen Autofluoreszenz. Jeder Punkt entspricht einer Zelldetektion, Farben von Blau zu Rot zeigen akkumulierte Signale. Das Muster der Populationen unterhalb der Einleitungsstelle (DS1, DS2) ist im Vergleich zum Standort oberhalb der ARA (US) deutlich verändert und weist Ähnlichkeiten zum Ablauf der ARA (EFF) auf.



### 3.8.2 Zusammensetzung und Diversität der Mikrobengemeinschaften

Die Sequenzierungen erfüllten die Qualitätsstandards gemäss Herstellerangaben, es wurden zwischen 0.9 und 1.5 Millionen Sequenzen pro Probe erhalten, das gängige Minimum von 50'000 Sequenzen pro Probe für eine repräsentative Mikrobiomanalyse wurde weit übertroffen, mit Ausnahme der Probe DS1 der Kampagne 1 aufgrund einer misslungenen DNA-Extraktion.

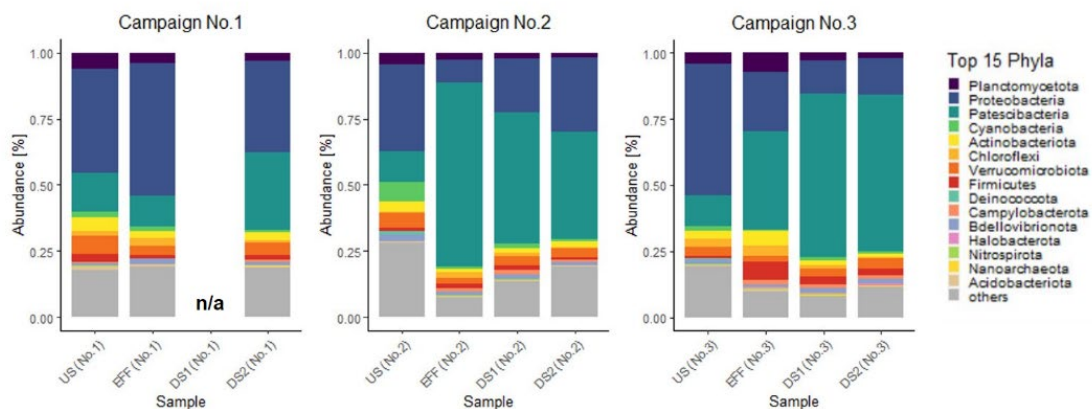
Die Bakteriengemeinschaft im Wasser der Dünnern wies eine deutlich höhere Biodiversität als das Abwasser auf (Abb. 14). Eine Auswirkung der Einleitung auf die bakterielle Biodiversität in der Dünnern unterhalb der Einleitungsstelle ist nicht nachweisbar.



**Abb. 14: Diversität der Bakteriengemeinschaft in den Wasserproben an den Probenahmestandorten.**

Boxplots zeigen den Median (Linie), 1. bis 3. Quartil (Box) und Minimal- / Maximalwert (Whisker). Links Artenzahl (Operationelle Taxonomische Einheiten gemäss Sequenzanalyse). Rechts Shannon-Diversität. US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

Die Verteilung der mikrobiellen Phyla in der Gemeinschaft zeigte eine Dominanz von *Proteobacteria*, *Patescibacteria*, *Chloroflexi*, *Plaktoomycetota* und *Actinobacteria* in den Wasserproben der Dünnern, aber auch des ARA-Ablaufs (Abb. 15). Selbst bei dieser groben taxonomischen Auflösung zeigt jedoch die Dominanz der *Patescibacteria* im ARA-Ablauf bei den Kampagnen 2 und 3 und die damit verbundene Zunahme dieser Gruppe in der Dünnern unterhalb, dass die ARA einen deutlichen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft der Dünnern hatte.



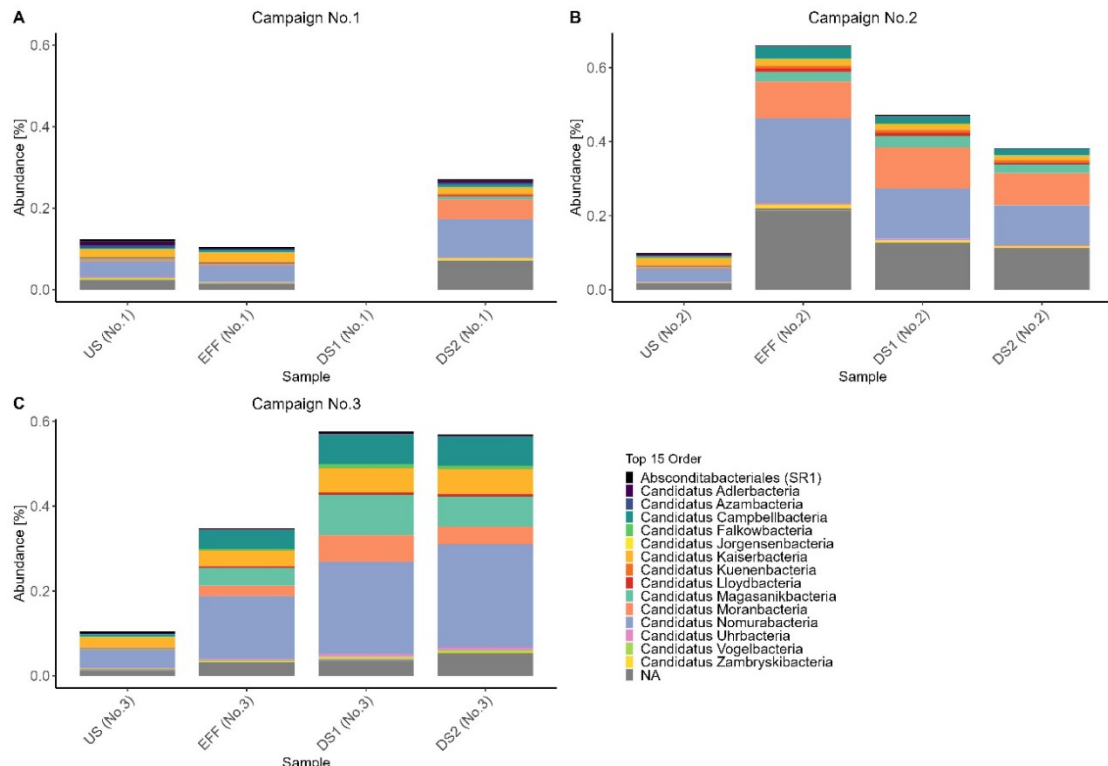
**Abb. 15: Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft in den Wasserproben.**

Dargestellt ist der relative Anteil der 5 bakteriellen Phyla mit der höchsten Häufigkeit, Alle anderen Phyla sind in der Kategorie "other" zusammengefasst. US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf.

Innerhalb der *Patescibacteria* weisen verschiedene phylogenetische Untergruppen (auf Ebene Ordnung) dieses Abundanzmuster auf (Abb. 19). Interessanterweise änderten sich die dominanten Gruppen zwischen den Probenahmezeitpunkten – Während der ersten Probenahme war der ARA-Ablauf sehr ähnlich zur US-Probe –, dennoch ist bei DS2 eine Veränderung dieser Gruppen



zu beobachten, was auf Wachstumsprozesse im Fluss hindeuten könnte. Auch Kampagne 2 und 3 unterscheiden sich hinsichtlich der Abundanz der Untergruppen, zeigen aber einen deutlichen Einfluss des ARA-Ablaufs.



**Abb. 16: Relative Abundanz der 15 häufigsten Ordnungen innerhalb des Phylums Patescibacteria.**

In der 2. und 3. Probenahmelampagne nehmen insbesondere *Candidatus Nomurabacteria*, *C. Moranbacteria*, *C. Magasanikbacteria*, *C. Kaiserbacteria* und *C. Campbellbacteria* in der Dünnern durch die Abwassereinleitung stark zu. US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

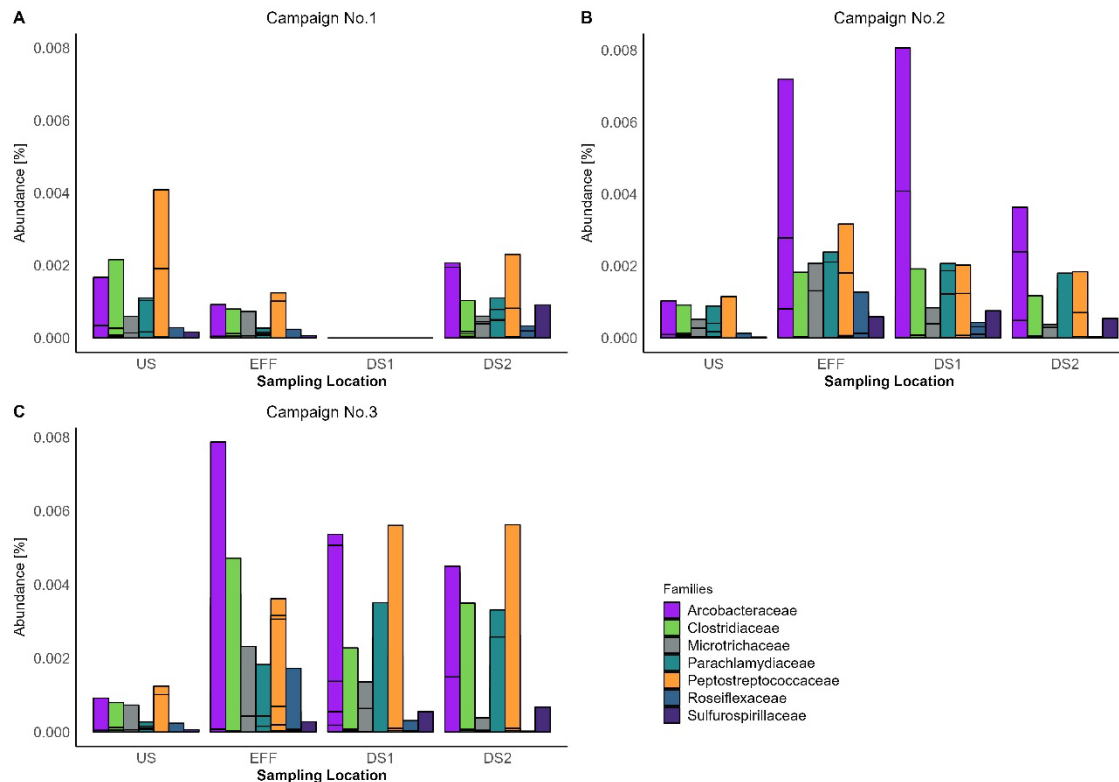
Im Weiteren konnten auch in anderen Phylums bakterielle Familien identifiziert werden, deren Abundanz stark durch die Abwassereinleitung beeinflusst wurde (Abb. 20) und die somit als Indikatoren für die Einleitung von Abwasser in Frage kommen. So zeigen *Arcobacteraceae* und *Sulfospirillaceae* (Phylum *Campylobacterota*), *Clostridiaceae* (*Bacillota*), *Microtrichaceae* (*Actinobacterota*), *Peptostreptococcaceae* (*Bacillota*) *Roseiflexaceae* (*Chloriflexota*), und *Parachlamydiaceae* (*Verrucomicrobiota*) alle in den Probenahmekampagnen 2 und 3 eine hohe Abundanz im Ablauf und in der Dünnern unterhalb der ARA (DS1 und DS2), aber eine niedrige Abundanz in der Dünnern oberhalb der ARA (US). Interessant ist, dass bei Kampagne 2 auch US hohe Abundanzen dieser Taxa gemessen wurden. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf die Einleitung von Mischwasser-Entlastungen im Einzugsgebiet der Dünnern während der Niederschläge der vorausgegangenen Tage sein (siehe Abb. 3).

In den gezeigten Familien gibt es etliche Arten die auch Teil der Darmflora sind (*Microtrichaceae*, *Peptostreptococcaceae*) oder mit Durchfallerkrankungen assoziiert sind (*Clostridiaceae*, *Arcobacteriaceae*), aber auch Arten, die vermutlich auch oder hauptsächlich mit dem ARA-Mikrobiom assoziiert sind oder andere Quellen haben (*Sulfospirillaceae*, *Clostridiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Roseiflexaceae*). Antibiotikaresistenzen sind im Zusammenhang mit z.B. *Clostridiaceae* oder *Arcobacteriaceae* beschrieben worden.

Die sowohl als Krankheitserreger wie auch als häufige Träger klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen bekannten *Enterobacteriaceae* (nicht gezeigt) wurden ebenfalls im Ablauf der ARA und in



den Flusswasserproben nachgewiesen. Auch diese Gruppe ist im Ablauf in höherer Abundanz als am US-Standort vorhanden, die Abundanz im Fluss bleibt aber auch unterhalb der ARA niedrig.



**Abb. 17: Relative Abundanz bakterieller Familien aus unterschiedlichen Phylums, die als Indikatoren für die Einleitung von Abwasser in Frage kommen.**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

Bereits die grundlegende Charakterisierung der mikrobiellen Populationen mittels Durchflusszytometrie und die Bestimmung der taxonomischen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft zeigen somit deutlich, dass die ARA Falkenstein den Gesamtgehalt und die Zusammensetzung der mikrobiologischen Zellen in der Dünnern stark verändert.

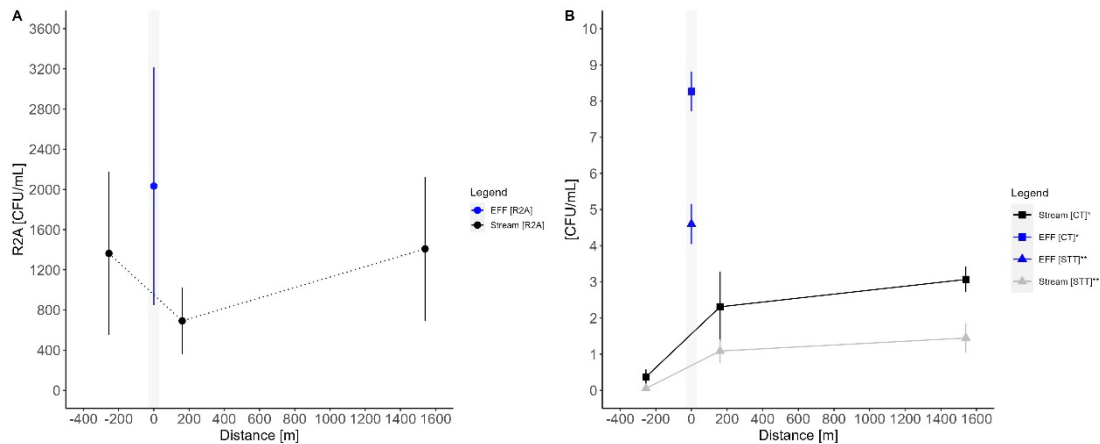
### 3.8.3 Kultivierbare antibiotikaresistente Bakterien (ARB)

Auf R2A-Medium kultivierbare Bakterien wurden im Flusswasser und im Ablauf der ARA quantifiziert (Abb. 18). Der Zellgehalt im ARA-Ablauf war etwa um den Faktor 50 bis 100 % höher als in der Dünnern, eine Erhöhung der Werte in der Dünnern durch den ARA-Ablauf war nicht nachweisbar. Zellen mit einer Resistenz gegen die beiden verwendeten Antibiotikakombinationen konnten in den Proben oberhalb der ARA kaum nachgewiesen werden. Im Ablauf der ARA waren Bakterien mit diesen Resistenzen mit einer Häufigkeit von ca. 5 bzw. 9 koloniebildenden Einheiten (KBE) /mL nachweisbar. Unterhalb der Einleitungsstelle waren diese antibiotikaresistenten Bakterien in geringer Häufigkeit (ca. 1-3 KBE/mL) nachweisbar, Bakterien mit Resistenz gegenüber einer Kombination aus Clarithromycin und Tetracyclin (CT) waren im ARA-Ablauf und an den DS-Standorten jeweils häufiger als Bakterien mit Resistenz gegenüber einer Kombination aus Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Tetracyclin (STT) (Abb. 18).

Die Resultate zeigen, dass die ARA Falkenstein die Häufigkeit von lebens- und wachstumsfähigen antibiotikaresistenten Bakterien in der Dünnern erhöht. Die hier verwendete Methode ist nicht



geeignet, daraus ein potentielles Gesundheitsrisiko abzuleiten, da auch resistente Bakterien erfasst werden, die nicht pathogen (krankheitserregend) sind. Zudem sind keine Grenzwerte für resistente Bakterien etabliert.



**Abb. 18: Häufigkeit kultivierbarer heterotropher Bakterien (A) und heterotropher Bakterien mit Resistenzen gegen zwei verschiedene Antibiotikakombinationen (B).**

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der im Triplikat durchgeführten Messung. \* [CT]: R2A Agar cont. Clarithromycin [4mg/ml] and Tetracycline [16mg/ml], \*\*[STT]: R2A Agar cont. Sulfamethoxazole [76mg/ml], Trimethoprim [4mg/ml] and Tetracycline [16mg/ml]. EFF = ARA-Ablauf, Stream = Proben aus der Dünnern in unterschiedlichem Abstand zum ARA-Ablauf.

### 3.8.4 Häufigkeit von Markergenen für Antibiotikaresistenz mit quantitativer PCR (qPCR)

Die qPCR-Analysen erfüllten die qualitativen Standards hinsichtlich der Linearität der Standardkurve ( $R^2 > 0.99$ ) und der Effizienz (e) der Reaktion ( $90 \% \leq e \leq 110 \%$ ), mit Ausnahme von *int1*-1 ( $e = 128 \%$ ) und *qnrA* ( $e = 143 \%$ ). Dies kann bei diesen Reaktionen auf Inhibition der PCR hindeuten. Für die verdünnten Proben sind allerdings nur geringe Auswirkungen auf die Messergebnisse zu erwarten, die Messergebnisse wurden daher normal ausgewertet. Die Negativkontrollen, einschliesslich der Blind-Extrakte, waren negativ oder hatten Cp-Werte (Crossing point: Messgrösse der qPCR Methode, entspricht der PCR-Zyklenzahl bei der das Messsignal einen Schwellenwert überschreitet), die deutlich über dem niedrigsten Eichstandard (50 Kopien / Reaktion) lagen.

Die untersuchten Antibiotika-Resistenzgene kodieren für Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika (siehe Anhang 3, Tab. 20). Sie werden hier aber in erster Linie in ihrer Gesamtheit als Indikatoren für das Vorkommen und die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen verwendet und interpretiert. Die Resistenzgene *sul1*, *sul2*, *ermB*, *tetW* und *tetM* sowie *int1* konnten in allen Proben quantifiziert werden, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* und *qnrA* waren nur in einem Teil der Proben nachweisbar (Abb. 19).

Die Häufigkeiten der quantifizierbaren Antibiotika-Resistenzgene lagen im Ablauf der ARA Falkenstein zumeist deutlich, um Faktoren zwischen 4 und 1200, über den Konzentrationen in der Dünnern oberhalb (Tab. 11). Dementsprechend nahm die Konzentration dieser Marker in der Dünnern unterhalb der Einleitstelle zu (Abb. 19). Besonders deutlich war die Zunahme während der Probenahmekampagnen 2 und 3 (Abb. 19, Tab. 12). *bla<sub>CTX-M-1</sub>* und *qnrA* wurden nur im Ablauf und gelegentlich bei den DS-Standorten nachgewiesen. Nur bei der ersten Probenahme wurde *bla<sub>CTX-M-1</sub>* auch am US-Standort detektiert.

Die Messwerte der Standorte DS1 und DS2 sind innerhalb einer Kampagne vergleichbar, mit einer Tendenz zur Abnahme von DS1 zu DS2. Dieser Trend kann z.B. durch Sedimentation oder Sorption von Partikeln und Bakterien oder durch Absterben von Bakterien unter den Umweltbe-

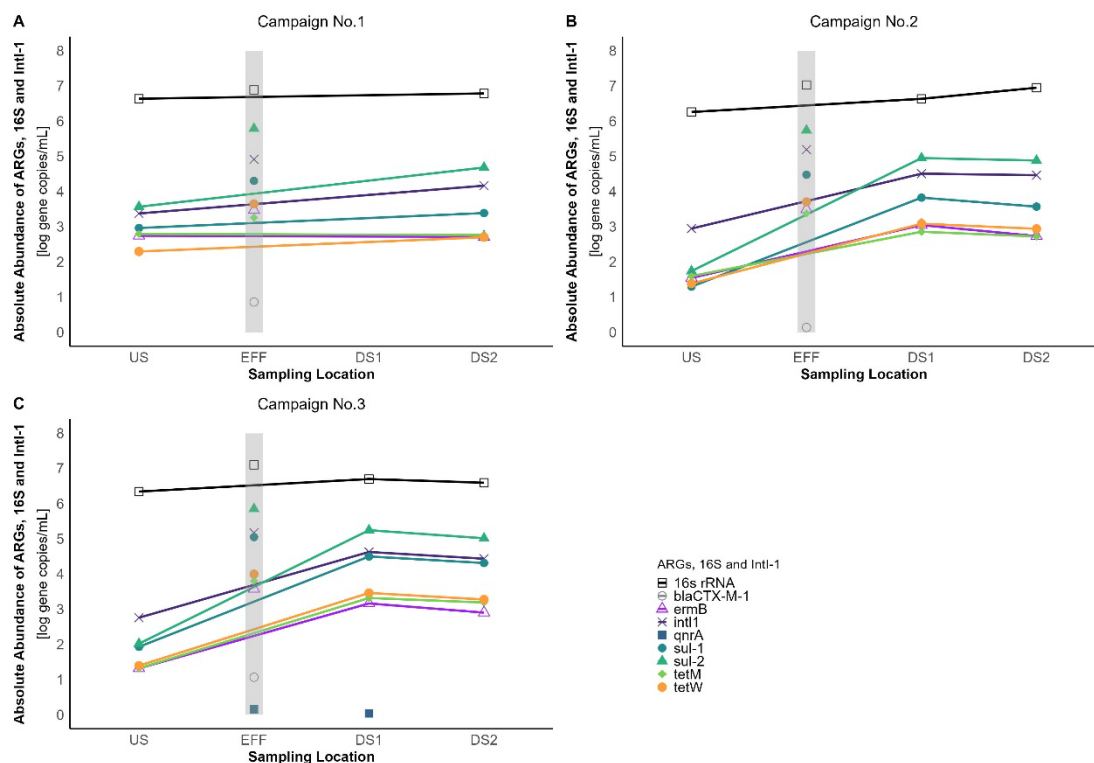


dingungen im Fluss verursacht werden. Auch eine Verdünnung z.B. durch Zustrom von Grundwasser oder eine noch nicht vollständige horizontale Durchmischung von Fluss- und Abwasser am Standort DS1 ist möglich. Ein Wachstum der resistenten Population in der Dünnern ist jedenfalls nicht erkennbar (vergleiche Lee et al. (2021)).

**Tab. 11: Anreicherungsfaktoren der absoluten Häufigkeit der Resistenzgene im Ablauf der ARA im Verhältnis zur Dünnern (US).**

|          | Anreicherungsfaktoren der quantifizierten Gene<br>(EFF [Kopien/mL] / US [Kopien/mL]) |      |      |      |      |      |      |                         |       |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------------------------|-------|
| Kampagne | 16S                                                                                  | int1 | sul1 | sul2 | tetM | tetW | ermB | bla <sub>CT-M-1</sub> * | qnrA* |
| No. 1    | 2.0                                                                                  | 28.6 | 25.9 | 28.6 | 3.5  | 21.0 | 5.6  | n/a                     | n/a   |
| No. 2    | 7.4                                                                                  | 152  | 322  | 152  | 56.9 | 440  | 87.0 | n/a                     | n/a   |
| No. 3    | 13.4                                                                                 | 222  | 1225 | 222  | 289  | 365  | 228  | n/a                     | n/a   |

\* bla<sub>CT-M-1</sub> und qnrA Resultat waren unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (LOD) und daher nicht quantifizierbar.



**Abb. 19: Häufigkeiten (Konzentrationen in Genkopien / mL) von Markergenen für Antibiotikaresistenz, quantifiziert mittels qPCR. A-C: Ergebnisse der Probenahmekampagnen 1-3.**

Die Konzentrationsverläufe in der Dünnern sind mit Lineplots dargestellt, die Häufigkeiten im Ablauf der ARA Falkenstein als Symbole in den grauen Balken. Bei Kampagne 1 wurden die Werte von DS1 aufgrund der fehlgeschlagenen DNA-Extraktion nicht berücksichtigt. Die Werte sind logarithmiert – ein Wert von 1 entspricht 10, 2 entspricht 100 Kopien / mL. US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf.

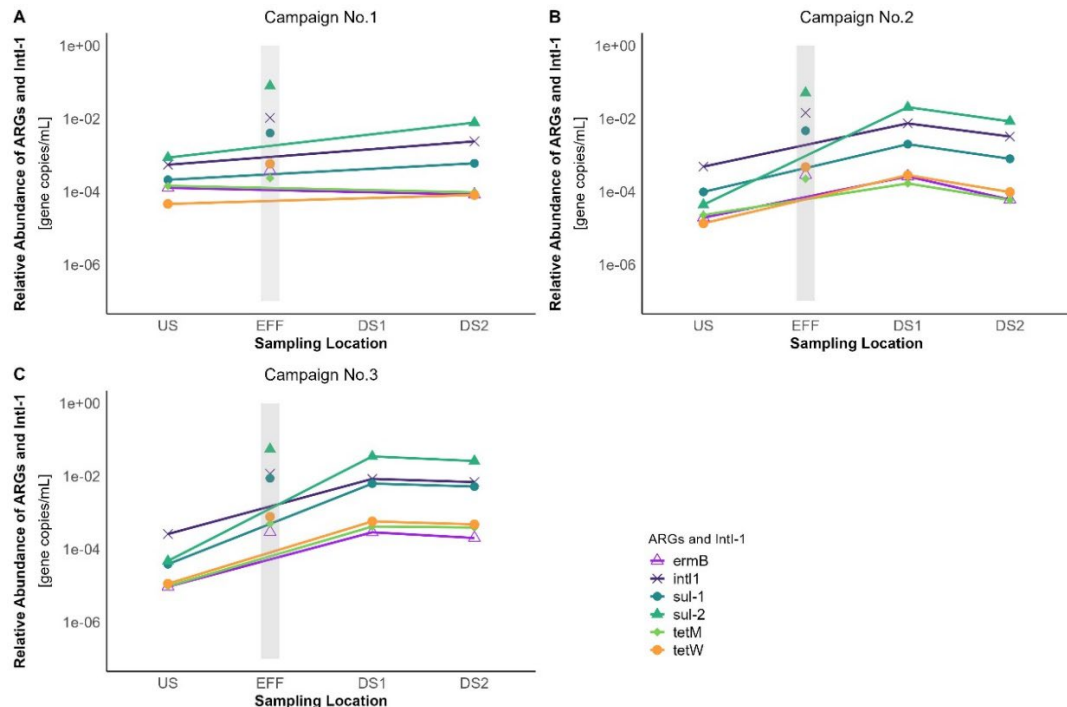


**Tab. 12: Anreicherungs-faktoren (fold change) der quantifizierten Marker-Gene in der Dünnern unterhalb der ARA (DS1, DS2) im Vergleich zum Standort oberhalb der ARA (US)**

| Kam-pagne | Samp-le | Anreicherungs-faktoren der quantifizierten Gene<br>(DS [Kopien/mL] / US [Kopien/mL]) |      |      |      |      |      |      |                         |       |
|-----------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------------------------|-------|
|           |         | 16S                                                                                  | int1 | sul1 | sul2 | tetM | tetW | ermB | bla <sub>CT-M-1</sub> * | qnrA* |
| No. 1     | DS1     | n/a                                                                                  | n/a  | n/a  | n/a  | n/a  | n/a  | n/a  | n/a                     | n/a   |
| No. 1     | DS2     | 1.5                                                                                  | 5.2  | 5.3  | 0.9  | 1.0  | 2.3  | 5.2  | n/a                     | n/a   |
| No. 2     | DS1     | 2.9                                                                                  | 31.4 | 54.9 | 27.1 | 16.2 | 97.0 | 31.4 | n/a                     | n/a   |
| No. 2     | DS2     | 5.9                                                                                  | 30.1 | 41.0 | 15.3 | 11.8 | 76.0 | 30.1 | n/a                     | n/a   |
| No. 3     | DS1     | 5.2                                                                                  | 64.1 | 340  | 93.1 | 108  | 110  | 64.1 | n/a                     | n/a   |
| No. 3     | DS2     | 4.1                                                                                  | 43.2 | 220  | 47.5 | 61.3 | 72.8 | 43.2 | n/a                     | n/a   |

\* bla<sub>CT-M-1</sub> und qnrA Resultate waren unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (LOD) und daher nicht quantifizierbar.

Neben der absoluten Häufigkeit ist auch die relative Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen ein wichtiges Mass, das Hinweise auf eine Anreicherung dieser Merkmale in einer Population (z.B. unter dem Selektionsdruck von Antibiotika) geben kann. Bei den durchgängig quantifizierbaren Markern erhöhte sich auch die relative Häufigkeit der Resistenzgene in der Dünnern unterhalb der Einleitungsstelle deutlich, wiederum insbesondere während der Probenahmekampagnen 2 und 3 (Abb. 20). Dies lässt sich jedoch gut mit der ebenfalls höheren relativen Häufigkeit der Resistenzen im Ablauf erklären. Eine Ausnahme stellten *ermB* und *tetM* bei der 1. Probenahme dar, hier wurde kein Anstieg beobachtet. Insgesamt war der Anstieg bei der 1. Probenahme bei allen Genen geringer ausgeprägt (Abb. 20).



**Abb. 20: Relative Häufigkeiten (in Genkopien / Kopien 16S rRNA Gen) von genetischen Markern für Antibiotikaresistenz, quantifiziert mittels qPCR.**

Linien zeigen den Verlauf der Konzentration der Marker in der Dünnern, die Werte im Ablauf sind als Einzelwerte für EFF (grauer Balken) dargestellt. Die vertikale Achse ist logarithmisch skaliert. US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf



### 3.8.5 Metagenomische Charakterisierung des Resistoms an ausgewählten Proben

Sequenziert wurden die Proben aus Kampagne 2. Die Sequenzierungen wurden erfolgreich durchgeführt und resultierten in 13 bis 17 Millionen Sequenzen bzw. 12 bis 15 Milliarden Basen pro Probe (Tab. 13).

**Tab. 13: Kenndaten der sequenzierten Metagenome**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

| Messstelle | Laufzeit (hrs) | Basen (Gb) | Reads ( x 10 <sup>6</sup> ) | Size N50 (kb) | Reads called | Bases called | Pass ratio |
|------------|----------------|------------|-----------------------------|---------------|--------------|--------------|------------|
| US         | 72             | 14.93      | 17.34                       | 1.14          | 100 %        | 13.91        | 93 %       |
| EFF        | 72             | 11.79      | 13.37                       | 1.11          | 100 %        | 10.76        | 91 %       |
| DS1        | 72             | 12.98      | 12.68                       | 1.32          | 100 %        | 12.04        | 93 %       |
| DS2        | 72             | 15.4       | 13.76                       | 1.45          | 100 %        | 13.48        | 88 %       |

Die Analyse des Resistoms (Gehalt eines Metagenoms von Antibiotika-Resistenzgenen) wurde mit dem Workflow "FastQ Antimicrobial Resistance" des Cloud-basierten Analysetools Epi2Me von Oxford Nanopore durchgeführt. Der Anteil generell klassifizierbarer Sequenzen war bei den durchgeführten Analysen niedrig (< 30 %, Tab. 14).

In allen Metagenomen konnten in den verbleibenden 1.7 bis 4.3 Millionen Reads zahlreiche Antibiotika-Resistenzgene identifiziert werden (Tab. 14). Die Anzahl der Gene mit Übereinstimmung mit Antibiotika-Resistenzgenen der CARD-Datenbank war aber niedrig, maximal einige hundert Übereinstimmungen pro Gen und Probe. Somit ist nur eine qualitative, maximal eine semi-quantitative Interpretation der Resultate möglich. In vielen Fällen ist zudem die Übereinstimmung mit den Referenzgenen der Datenbank relativ niedrig. Eine niedrige Übereinstimmung kann zu Fehlklassifizierungen führen.

**Tab. 14: Angaben zur Fatstq AMR-Analyse der Metagenome in Epi2Me**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

| Messstelle | Epi2Me Run ID | # analysierte Reads & Anteil (%) | # Reads in CARD | Übereinstimmung (%) | CARD-Gene* (alle Modelle) | CARD-Gene* (P-Homologe) |
|------------|---------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| US         | 455413        | 4'384'811 (29%)                  | 21'404          | 80.2                | 217                       | 115                     |
| EFF        | 457630        | 1'736'682 (15%)                  | 10'082          | 79.8                | 219                       | 124                     |
| DS1        | 457631        | 2'593'386 (20%)                  | 13'658          | 80.0                | 250                       | 148                     |
| DS2        | 457633        | 3'127'955 (20%)                  | 21'912          | 80.5                | 253                       | 150                     |

**Epi2Me Run ID** Kennung der Analyse auf dem Epi2Me server. **# analysierte Reads:** Anzahl der analysierten Sequenzen. **# Reads in CARD:** Anzahl der Sequenzen mit Übereinstimmung mit den Resistenzgenen der Datenbank. **Übereinstimmung:** Durchschnittliche Übereinstimmung mit den Referenzsequenzen in der CARD Datenbank. **CARD-Gene** – Anzahl der gefundenen Gene mit Übereinstimmung mit Antibiotika-Resistenzgenen der CARD Datenbank. **P-Homologe:** Anzahl gefundener Gene im Protein-Homologie Modell

Qualitativ lässt sich zusammenfassen, dass alle Proben (auch US) ein diverses Resistom mit Resistenzgenen gegen verschieden Antibiotika-Wirkstoffklassen aufwiesen. Die Zahl der detektierten Resistenzgene war unterhalb der ARA im Vergleich zur Dünnern oberhalb (US) erhöht, ein Hinweis, dass der ARA-Ablauf zusätzliche Resistenzen ins System einbringt (Tab. 14). Ein umfassender Katalog der gefundenen Resistenzgene wird als Datensatz dem Bericht beigelegt.

Für eine semiquantitative Auswertung wurde eine Analyse der Gene mit hoher Ähnlichkeit zu Genen der Referenzdatenbank (durchschnittlich Übereinstimmung > 80 %) und insgesamt hoher Häufigkeit durchgeführt. Weiterhin wurden nur die Gene gemäss Protein-Homologie-Modell genutzt, das heisst Resistenzen die aus Mutationen von regulären Genen resultieren wurden nicht berücksichtigt. Unter den so ausgewählten Resistenzgenen finden sich Resistenzen gegen unterschiedliche Antibiotika, unter anderem gegen Aminoglycoside,  $\beta$ -lactam Antibiotika (inklusive



der Cephalosporine und der als Reserveantibiotika bedeutsamen Carbapeneme), Tetracycline und Sulfonamide (Tab. 15).

**Tab. 15: Top 30\* Antibiotikaresistenzgene (CARD database, Protein-Homologie-Modell) und Anzahl der gefundenen Sequenz-Übereinstimmungen**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

| Gene                | Resistenz nach CARD                  | US  | EFF | DS1 | DS2 |
|---------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| <b>AAC(6')-Ib'</b>  | aminoglycoside                       | 148 | 24  | 66  | 853 |
| <b>AAC(6')-Ib7</b>  | aminoglycoside                       | 5   | 33  | 29  | 12  |
| <b>oprN</b>         | multiple (efflux)                    | 0   | 2   | 2   | 71  |
| <b>sul1</b>         | sulfonamide                          | 1   | 35  | 12  | 9   |
| <b>qacH</b>         | disinfectants (quarternary ammonium) | 2   | 19  | 16  | 12  |
| <b>aadA11</b>       | aminoglycoside                       | 0   | 28  | 15  | 6   |
| <b>OXA-368</b>      | cephalosporin                        | 7   | 12  | 9   | 18  |
| <b>APH(3')-IIa</b>  | aminoglycoside                       | 1   | 11  | 14  | 12  |
| <b>IMP-13</b>       | carbapenem                           | 1   | 17  | 10  | 7   |
| <b>tetQ</b>         | tetracycline                         | 1   | 10  | 11  | 10  |
| <b>OXA-12</b>       | $\beta$ -lactam                      | 11  | 1   | 4   | 7   |
| <b>APH(3'')-Ib</b>  | aminoglycoside                       | 0   | 2   | 5   | 13  |
| <b>APH(6)-Id</b>    | aminoglycoside                       | 0   | 3   | 3   | 11  |
| <b>CAU-1</b>        | carbapenem                           | 2   | 0   | 6   | 6   |
| <b>OXA-209</b>      | $\beta$ -lactam                      | 2   | 7   | 1   | 4   |
| <b>tet39</b>        | tetracycline                         | 1   | 4   | 7   | 1   |
| <b>AAC(6')-32</b>   | aminoglycoside                       | 5   | 0   | 1   | 6   |
| <b>aadA6</b>        | aminoglycoside                       | 0   | 6   | 4   | 2   |
| <b>msrE</b>         | macrolide                            | 0   | 2   | 7   | 3   |
| <b>IMP-37</b>       | carbapenem                           | 0   | 5   | 4   | 2   |
| <b>tetW</b>         | tetracycline                         | 1   | 2   | 5   | 2   |
| <b>aadA</b>         | aminoglycoside                       | 0   | 6   | 0   | 4   |
| <b>dfrB3</b>        | diaminopyrimidine                    | 2   | 3   | 1   | 2   |
| <b>smeB</b>         | multiple (efflux)                    | 0   | 8   | 0   | 0   |
| <b>mefC</b>         | multiple (efflux)                    | 0   | 6   | 2   | 0   |
| <b>acrB</b>         | multiple (efflux)                    | 0   | 5   | 3   | 0   |
| <b>OXA-129</b>      | $\beta$ -lactam                      | 0   | 3   | 3   | 2   |
| <b>OXA-20</b>       | $\beta$ -lactam                      | 0   | 1   | 6   | 1   |
| <b>FOX-2</b>        | cephalosporin                        | 5   | 0   | 1   | 1   |
| <b>aadA6/aadA10</b> | aminoglycoside                       | 0   | 3   | 1   | 3   |
| <b>ErmF</b>         | streptogramin                        | 0   | 2   | 4   | 1   |

\*Eine Gruppe von 5 mex Genen (*mexF*, *mexW*, *mexK*, *mexB*, *mexE*) und *OpmH* (alle *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 zugeordnet), die alle mit hoher Abundanz nur in DS2 detektiert wurden, wurden als mögliche Kontaminanten von dieser Zusammenstellung ausgeschlossen. Die Sequenzübereinstimmungen sind Rohdaten und wurden nicht auf die Zahl der analysierten Sequenzen normiert (siehe Tab. 14)

Etliche dieser Gene zeigten ein Abundanzmuster, das qualitativ dem der qPCR-basierten Analyse der Antibiotikaresistenz-Marker entsprach, d.h. niedrig in der Dünnern oberhalb der ARA, hoch im ARA-Ablauf und erhöht in der Dünnern unterhalb der Einleitungsstelle (z.B. AAC(6')-Ib7, *qacH*, *aadA11*, APH(3')-IIa, IMP-13, *tetQ*, *tet39*, *aadA6*). Diesem Muster entspricht auch *sul1*, und ist damit im Einklang mit den qPCR-Messungen desselben Gens (Tab. 15, vergleiche Kapitel 3.8.4, Abb. 19). Zu beachten ist bei dieser Auswertung, dass nicht versucht wurde die Zahl der Über-



einstimmungen zu normalisieren z.B. auf die Anzahl auswertbarer Sequenzen. Die Zahl der Übereinstimmungen in EFF ist demnach vermutlich im Vergleich zu den Flusswasserproben unterschätzt. Insgesamt bestätigt diese Auswertung dennoch, dass die Beobachtungen an Markergenen (siehe Kapitel 3.8.4) repräsentativ für den allgemeinen Eintrag einer breiten Palette von Resistenzen mit dem gereinigten Abwasser sind.

Die hier vorgestellte metagenomische Resistomanalyse mit Nanopore-Sequenzierung wurde im Rahmen dieser Studie erstmals an Fliessgewässerproben getestet. Die Analyse ist in der Lage ein breites Spektrum an Resistenzgenen zu detektieren. Die Sensitivität ist aber gering, nur für eine kleine Zahl von Genen war zumindest eine semiquantitative Analyse möglich. Die in der Fachliteratur oft verwendete Strategie einer Aggregation nach Resistenzklassen war mit dem Output des Epi2Me Workflows ebenfalls nicht möglich. Dem metagenomischen Analyseansatz kann also einerseits ein grosses Potenzial attestiert werden. Andererseits benötigen sowohl die Methode an sich als auch die bioinformatische Analyse eine Weiterentwicklung (erreichen besserer Klassifizierbarkeit, tiefere Sequenzierung oder Anreicherung der Resistenzen vor der Sequenzierung).

### **3.8.6 Gesamtbeurteilung der mikrobiellen Wasserqualität und der Belastung mit Antibiotikaresistenzen**

Insgesamt zeigen die Messungen übereinstimmend, dass die Einleitung des gereinigten Abwassers der ARA Falkenstein einen mässigen bis starken Einfluss auf die mikrobiologische Qualität des Wassers in der Dünnern hat. Die Häufigkeit der Indikatoren für das Vorkommen von Antibiotikaresistenzen war insbesondere während der Probenahmekampagnen 2 und 3 in der Dünnern unterhalb der ARA sehr deutlich im Vergleich zur Dünnern oberhalb der ARA erhöht. Die metagenomische Resistom-Analyse konnte zeigen, dass die quantitativen Indikatoren für allgemeine Trends des Resistoms repräsentativ sind. Diese Effekte sind mit hoher Sicherheit direkt auf die Einleitungen der ARA zurückzuführen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit ähnlichen Studien an Fliessgewässern der Schweiz mit ARA-Einleitungen und hohem Abwasseranteil im Fliessgewässer unterhalb des ARA-Ablaufs (Lee et al., 2021). In Gewässern mit niedrigerem Abwasseranteil oder rascher Verdünnung sind Effekte weniger ausgeprägt.

Die Unterschiede zwischen den Beobachtungen bei der ersten Probenahmekampagne mit geringeren Effekten und den Kampagnen 2 und 3 sehen wir in den höheren Niederschlägen während dieser Periode begründet. Zwar wurden während der eigentlichen Probenahme keine Niederschläge registriert, allerdings traten diese vor allem bei Kampagne 1 und in geringem Umfang bei Kampagne 2 in den Tagen vor der Probenahme auf (Abb. 3). Dies hat vermutlich zu einem höheren Abfluss in der Dünnern selbst und dadurch zu einer stärkeren Verdünnung des eingeleiteten Abwassers geführt. Möglicherweise sind auch in der Dünnern oberhalb der ARA Einträge aus Mischwasserentlastungen vorhanden gewesen, was den Kontrast zwischen dem Wasser der Dünnern und dem ARA-Ablauf weiter reduziert hat. Möglicherweise sind schliesslich auch in der ARA selbst durch höheres Volumen und Verdünnung des zu behandelnden Abwassers Veränderungen im Prozessablauf aufgetreten. Im Gegensatz dazu herrschte während der Kampagne 3 eine ausgesprochen trockene Witterung. Die Messungen aus dieser Kampagne repräsentieren daher vermutlich eher Maximalwerte des ARA-Einflusses.

Es wird erwartet, dass der Ausbau der ARA zu einer Situation führt, in der die mikrobiologischen Auswirkungen auf die Dünnern unterhalb der ARA deutlich geringer oder nicht mehr nachweisbar sind. In Pilotanlagen mit Pulveraktivkohle und Membranfiltration wurde eine fast vollständige Elimination der Bakterien und Resistenzgene im Ablauf gemessen (Bürgmann et al., 2013). Für Ozonanlagen wurden dagegen etwas geringere Reduktionen und eine grössere Variabilität festgestellt (Bürgmann and Beck, 2022). Da in anderen Studien nur eine geringe Belastung von ortsfesten Mikrobengemeinschaften (z.B. im Sediment oder auf Steinen) gefunden wurde (Lee et al. 2023), kann von einer dauerhaften und umfassenden Verbesserung aufgegangen werden. Diese Hypothese kann durch eine Wiederholung der Untersuchung nach dem Ausbau überprüft werden.



## 4 Diskussion und Gesamtbeurteilung

**Ökotoxikologische Biotests:** Die ökotoxikologischen Biotests haben gezeigt, dass die im ER $\alpha$ -CALUX® gemessene östrogene Aktivität im ARA-Ablauf relativ gering war. Der effektbasierte Schwellenwert von 0.4 ng 17 $\beta$ -Östradiol-Äquivalenten (EEQ) wurde nur geringfügig überschritten. In der Dünnern konnten keine Unterschiede in der östrogenen Aktivität zwischen oberhalb (US) und unterhalb der Abwassereinleitung (DS1) festgestellt werden. Die Werte lagen bei 0.18 ng EEQ/L. Insgesamt war die Wasserqualität für diesen Parameter an beiden Standorten gut.

Der kombinierte Algentest ergab Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ) von 230 ng/L für die Photosynthesehemmung (PSII) und 1'250 ng/L für die Wachstumshemmung im ARA-Ablauf und damit eine geringe bzw. mittlere PSII- und Wachstumshemmung in dieser Probe. In der Dünnern oberhalb der Abwassereinleitung war die Wasserqualität für beide Parameter sehr gut. Mit 0.5 ng DEQ/L (PSII-Hemmung) und 32 ng DEQ/L (Wachstumshemmung) lagen die Werte unterhalb der jeweiligen EBS (PSII-Hemmung: 70 ng/L, Wachstumshemmung: 130 ng/L). Die DEQ-Werte stiegen durch die Abwassereinleitung am Standort unterhalb der ARA leicht an (PSII-Hemmung: 19 ng DEQ/L, Wachstumshemmung: 120 ng DEQ/L), lagen aber immer noch im Bereich für gute Wasserqualität.

Der Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen zeigte in allen Proben eine signifikante Verringerung des Populationswachstums im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle. Insgesamt wurde jedoch in keiner Probe der EBS-Wert von 30 % Wachstumshemmung überschritten, d.h. die Proben weisen nicht auf eine hohe Toxizität für Wasserflöhe hin. Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probenahmestellen festgestellt.

Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Biotests können mit mehreren Studien verglichen werden, die in den letzten Jahren in Schweizer und internationalen Fließgewässern mit urbanem Einzugsgebiet durchgeführt wurden:

- Kienle et al. (2023) bewerteten 15 Proben aus Fließgewässern in der Schweiz mit unterschiedlichen Einzugsgebieten (extensiv, landwirtschaftlich und landwirtschaftlich-urban) (Kienle et al., 2023a; Kienle et al., 2023b). An den fünf Standorten mit landwirtschaftlich-urbanem Einzugsgebiet wurden in einer von fünf Proben Überschreitungen des EBS-Wertes für den ER $\alpha$ -CALUX® gemessen. Im kombinierten Algentest wurde der EBS-Wert für die Hemmung des Algenwachstums in vier von fünf Proben überschritten und jener für PSII-Hemmung in zwei von fünf Proben. Beim Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen wurde keine Überschreitung der EBS-Werte festgestellt.
- Kienle et al. (2019) untersuchten die östrogene Aktivität und Auswirkungen auf Algenwachstum und -Photosynthese in 24 ARA und angrenzenden Gewässern. Im Gewässer wurde der EBS für PSII-Hemmung an 3 von 24 US-Standorten und an 7 von 24 DS-Standorten überschritten, jener für Wachstumshemmung in 18 (US) bzw. 20 (DS) von 24 Standorten. Der ER $\alpha$ -CALUX®, der an 12 der Standorte angewendet wurde, zeigte keine EBT-Überschreitung US und 3 Überschreitungen DS.
- De Baat et al. (2019) untersuchten 45 Flüsse und Gräben in den Niederlanden, die durch verschiedene Landnutzungen beeinflusst wurden (Referenz, urban, ARA, Gartenbau, landwirtschaftliche Mischung und komplexe Nutzung), mit Passivsammlern. Der EBS-Wert für den ER $\alpha$ -CALUX® wurde an 70 % der Standorte überschritten. Die meisten EBS-Überschreitungen wurde an Standorten mit urbaner Nutzung, einer ARA und Gartenbauland festgestellt. In einer weiteren Studie an 15 Flüssen und Gräben in den Niederlanden, darunter Referenzstandorte, urbane Standorte und Standorte mit ARA-Einfluss (De Baat et al., 2020), lagen die gemessenen Effekte im ER $\alpha$ -CALUX® bei der Untersuchung polarer Extrakte an > 75 % der Standorte über dem EBS-Wert.

Vergleicht man die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte mit den Werten aus diesen drei Studien, so zeigt sich, dass die in der vorliegenden Studie im ER $\alpha$ -CALUX® in der Dünnern



gemessenen EEQ-Werte (0.18 ng EEQ/L) in einem ähnlichen Bereich liegen wie die in Proben aus 12 Schweizer Fließgewässern unterhalb von ARA (0.1 - 0.84 ng EEQ/L) (Kienle et al., 2019) und in Proben von Standorten mit landwirtschaftlich-urbanen Einzugsgebieten (0.2 - 0.44 ng EEQ/L) (Kienle et al., 2023b) gemessenen Werte. Sie liegen deutlich unter den Werten, die an mehreren Standorten in den Niederlanden mit komplexer Belastung (urbane Landnutzung und unterhalb von ARA) gemessen wurden (Maximalwerte: 1.50 bzw. 4.92 ng EEQ/L) (De Baat et al., 2019; De Baat et al., 2020).

Die im kombinierten Algentest gemessenen Werte im ARA-Ablauf (230 ng PSII-DEQ/L und 1250 ng/L Wachstums-DEQ/L) lagen in einem ähnlichen Bereich wie die in 24 Schweizer ARA gemessenen Werte (27.2 - 791 ng PSII-DEQ/L und 300 - 2'828 ng Wachstums-DEQ/L) (Kienle et al., 2019). Die in der Dünnern oberhalb der Abwassereinleitung gemessenen Werte (0.5 ng PSII-DEQ/L und 32 ng Wachstums-DEQ/L) lagen tiefer als die in den Fließgewässern oberhalb der 24 ARA gemessenen Werte (2.4 - 122 ng PSII-DEQ/L und 59 - 1'203 ng Wachstums-DEQ/L). Und in der Dünnern unterhalb der ARA Falkenstein lagen die Konzentrationen mit 19 ng PSII-DEQ/L und 120 ng Wachstums-DEQ/L im unteren Bereich der von Kienle et al. (2019) gemessenen Werte (2.8 - 1576 ng PSII-DEQ/L und 100 - 3845 ng Wachstums-DEQ/L).

Mit dem Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen bestehen bisher keine Erfahrungen bei Messungen im ARA-Ablauf in Kombination mit einer Probenahme im Fluss ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs. Kienle et al. (2019) untersuchten die Auswirkungen von Flusswasser oberhalb und unterhalb von ARA auf die Fortpflanzung von Wasserflöhen an 4 von 24 Standorten, wobei an einem der vier Standorte eine verringerte Fortpflanzung unterhalb der Abwassereinleitung gemessen wurde. An den anderen Standorten wurde die Fortpflanzung durch die Wasserproben gefördert, was mit einer verbesserten Verfügbarkeit von Nährstoffen in den Proben im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle zusammenhängen könnte. Dagegen wurde in den Proben der ARA Falkenstein und der Dünnern eine signifikant verringerte Fortpflanzung im Vergleich zur Kontrolle gemessen, es traten jedoch keine Unterschiede zwischen den Proben auf und der effektbasierte Schwellenwert von 30 % Fortpflanzungshemmung wurde nicht überschritten. Dies wurde bereits in früheren Studien beobachtet, z.B. (Ferrari et al., 2017), es ist jedoch schwierig Schlussfolgerungen über die Gründe hierfür zu ziehen. Unterschiede in der Zusammensetzung des Wassers der Umweltprobe im Hinblick auf Nährstoffe und Schadstoffe im Vergleich zum Kontrollwasser könnten eine Rolle spielen. Die Unterschiede zwischen den Proben waren jedoch nicht gross genug, um signifikante Unterschiede feststellen zu können.

**Genexpression in Bachflohkrebsen:** Bei den Bachflohkrebsen wurden während der Untersuchung 2023 wie erwartet Unterschiede in der Genexpression (Anzahl regulierter Transkripte) in der Dünnern direkt unterhalb der ARA-Einleitung im Vergleich zu oberhalb gemessen. Vergleichbare explorative Untersuchungen werden derzeit an mehreren Standorten in der Schweiz durchgeführt. Der Unterschied in der Genexpression konnte auch bei den anderen ARA oberhalb und unterhalb nachgewiesen werden. Von einem Standort liegen bereits Ergebnisse nach Ausbau vor, hier hat sich die Differenz in der Anzahl regulierter Transkripte oberhalb/unterhalb nach dem Ausbau deutlich reduziert. Allerdings sind die Standorte aufgrund unterschiedlicher abiotischer Bedingungen und Bachflohkrebspopulationen nur bedingt miteinander vergleichbar. Der Einfluss des Ausbaus auf die Genexpression inklusive einer detaillierten Analyse wird erst nach dem Ausbau möglich sein.

Da der Sauerstoffgehalt in der Dünnern unterhalb des ARA-Ablaufs bei der Untersuchung 2023 stark reduziert war und ein Einfluss dieses abiotischen Parameters auf die Genexpression nicht ausgeschlossen werden kann, wurden 2024 erneut Bachflohkrebsen eingesetzt. Ziel war es hier, eine stabilere Datenbasis für die Genexpression in Bachflohkrebsen vor dem Ausbau zu generieren.

**Genexpression in Fischzelllinien:** Untersuchungen mit der Fischkiemenzelllinie der Regenbogenforelle zeigten keine akute Toxizität der Proben auf die Zellen, in den Proben der Dünnern wurden lediglich leichte Matrix- und sublethale Effekte gemessen. Die Genexpression in Zelllinien von Kieme und Darm zeigte jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Standorten auf, welche



die ARA als Verursacher identifizierten. So war ein Gen für Biotransformation im ARA-Ablauf im Vergleich zur US-Probe in der Dünnern stark erhöht. In der DS1-Probe war der Effekt noch vorhanden, wenn auch etwas reduziert. Die Expression von Markergenen für allgemeinen Stress zeigte ebenfalls dieses Muster, ebenso wie die Expression von Genen für die Regulierung des Zellzyklus und der Immunantwort. Eine erhöhte Expression von Genen für die Immunantwort deutet auf den Eintrag von Pathogenen durch das ARA-Abwasser hin. Die Genexpression gab auch Hinweise auf eine Belastung mit Metallen am Standort DS1 in der Dünnern ebenso wie einen Einfluss auf die Neurotransmission. Die Ergebnisse der beiden Zelllinien waren bis auf geringfügige Unterschiede vergleichbar, wobei die leichten Unterschiede auf die unterschiedliche Funktion dieser Zellen in der Antwort auf Schadstoffexposition zurückzuführen sein könnten (Kiemenzellen: Eintrittspforte für Schadstoffe aus dem Wasser, Darmzellen: Eintrittspforte für Schadstoffe aus der Nahrung).

Diese Ergebnisse, d.h. eine Differenzierung der Wasserqualität oberhalb, am Ablauf, und unterhalb der ARA, decken sich mit früheren Untersuchungen zur Genexpression, bei denen Gewebe von vor Ort gefangenen Bachforellen untersucht wurden. Die hier erzielten Ergebnisse sind daher in zweifacher Hinsicht vielversprechend: (1) Sie zeigen, dass auch eine tierversuchsfreie Alternative, nämlich Fischzelllinien, zur Untersuchung der Wasserqualität an ARAs eingesetzt werden können und (2) sie lassen die Erwartung zu, dass nach einer Aufrüstung der ARA die Unterschiede in der Genexpression zwischen oberhalb und unterhalb der ARA verschwinden sollten, wie dies in der Vergangenheit auch für Genexpression in Gewebeproben von vor Ort gefangenen Fischen beobachtet werden konnte.

**Analyse der Oligochaetengemeinschaft:** Diese Analyse zeigte einen Unterschied in der Artzusammensetzung in den Sedimenten der Dünnern von oberhalb nach unterhalb. Am Standort US wurde eine mässig veränderte Funktion, am Standort 1 unterhalb der Abwassereinleitung (DS1) eine stark veränderte Funktion und am Standort DS2 eine veränderte Funktion festgestellt. Dies bedeutet, dass an dieser Stelle eine gewisse Erholung der Oligochaetengemeinschaft im Vergleich zum Standort DS1 beobachtet wurde, möglicherweise aufgrund der Entfernung zwischen dem Standort DS2 und dem ARA-Ablauf. Es bestand jedoch immer noch ein Unterschied zwischen den Standorten DS2 und US, was auf das Vorhandensein von Abwasser oder anderen Verschmutzungsquellen (Landwirtschaft, Verkehrskorridor) zurückzuführen sein könnte. Die Intensität der Exfiltration, die eine Selbstreinigung des Gewässers ermöglicht, war an allen drei Standorten hoch, was sich positiv auf die biologische Qualität ausgewirkt haben könnte.

**Antimikrobielle Resistenzen:** Insgesamt war der Eintrag von antimikrobiellen Resistenzen, d.h. antibiotikaresistente Bakterien und antibiotikaresistente Gene durch die ARA in die Dünnern klar nachweisbar. Unterhalb der ARA wurden deutlich erhöhte Werte gemessen. Die Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die ARA war ebenfalls klar nachweisbar. Die Bakteriengemeinschaft in der Dünnern unterhalb der Abwassereinleitung wurde durch den Eintrag von Abwasserbakterien zum Teil deutlich verändert. Die wiederholte Beprobung zeigte eine deutliche zeitliche Variabilität und einen Einfluss der Niederschlagsintensität. Dies deckt sich mit früheren Forschungsergebnissen die einen starken Einfluss von Niederschlägen auf die Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen, insbesondere durch Entlastungen, gezeigt haben (Lee et al., 2022). Die Trends waren aber dennoch konsistent.



## 5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die in der vorliegenden Studie angewendeten Methoden erlauben eine umfassende Beurteilung des Ablaufs der ARA Falkenstein und der Wasser- und Sedimentqualität in der Dünnern vor dem Ausbau der ARA.

Die ökotoxikologischen Biotests, die eine Bewertung von Schadstoffmischungen ermöglichen, zeigten keine Überschreitungen der effektbasierten Schwellenwerte in der Dünnern. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der chemischen Analytik zeigte, dass die Risikobeurteilung basierend auf den Biotestergebnissen für die Organismengruppe der Pflanzen gut mit der Risikobeurteilung basierend auf den Ergebnissen der chemischen Analytik übereinstimmt. Bei der Organismengruppe der Invertebraten zeigte die chemische Analytik am Standort unterhalb des ARA-Ablaufs ein chronisches Mischungsrisiko für diese Organismengruppe auf. Dieses Risiko war in den Ergebnissen des Tests mit Wasserflöhen nicht sichtbar. Auch für die Organismengruppe der Vertebraten identifizierte die chemische Analytik ein chronisches Mischungsrisiko für diese Organismengruppe. Die Tests mit Fischzelllinien zeigten keine akuten Effekte, jedoch leichte sublethale und Matrix-Effekte in den beiden Proben der Dünnern. Die Genexpression in Fischzelllinien und in Bachflohkrebsen zeigte einen klaren Unterschied zwischen dem Standort oberhalb des ARA-Ablaufs und jenem unterhalb. Der Einfluss des Abwassers war also deutlich messbar. Dies zeigte sich auch bei der Analyse der Oligochaetengemeinschaft. Im Hinblick auf antimikrobielle Resistenzen ist die aktuelle Belastung der Dünnern mit AMR und Abwasserbakterien als eher hoch einzuschätzen.

Insgesamt haben die zum Teil zum ersten Mal im Rahmen einer solchen Studie angewandten Methoden sich als vielversprechend für eine Erfassung des Zustands der Dünnern vor ARA-Ausbau erwiesen. Es wird erwartet, dass die im ARA-Ablauf und in der Dünnern unterhalb des ARA-Ablaufs gemessenen Wirkungen durch den Ausbau der ARA deutlich abnehmen. Mit der Aufrüstung ist zu erwarten, dass die Membrantechnologie die Freisetzung von Bakterien und damit auch von Antibiotikaresistenzen weitgehend unterbindet. Pilotanlagen mit PAK/Ultramembranfiltration zeigten minimale AMR-Emissionen. Auch die Elimination / Verringerung der Konzentrationen an Mikroverunreinigungen sollte zur Verringerung der gemessenen Wirkungen beitragen. Insgesamt kann also eine deutliche Reduktion der Belastung nach dem Ausbau erhofft werden.



## 6 Referenzen

- Afgan, E., Nekrutenko, A., Grüning, B.A., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M.C., Ostrovsky, A.E., Mahmoud, A., Lonie, A.J., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Kumar, A., Eschenlauer, A.C., Desanto, A.D., Guerler, A., Serrano-Solano, B., Batut, B., Langhorst, B.W., Carr, B., Raubenolt, B.A., Hyde, C.J., Bromhead, C.J., Barnett, C.B., Royaux, C., Gallardo, C., Fornika, D.J., Baker, D., Bouvier, D., Clements, D., De Lima Morais, D.A., Taberner, D.L., Lariviere, D., Nasr, E., Zambelli, F., Heyl, F., Psomopoulos, F., Coppens, F., Price, G.R., Cuccuru, G., Corguillé, G.L., Von Kuster, G., Akbulut, G.G., Rasche, H., Hans-Rudolf, H., Eguinoa, I., Makunin, I., Ranawaka, I.J., Taylor, J.P., Joshi, J., Hillman-Jackson, J., Chilton, J.M., Kamali, K., Suderman, K., Poterlowicz, K., Yvan, L.B., Lopez-Delisle, L., Sargent, L., Bassetti, M.E., Tangaro, M.A., Van Den Beek, M., Cech, M., Bernt, M., Fahrner, M., Tekman, M., Föll, M.C., Schatz, M.C., Crusoe, M.R., Roncoroni, M., Kucher, N., Coraor, N., Stoler, N., Rhodes, N., Soranzo, N., Pinter, N., Goonasekera, N.A., Moreno, P.A., Videm, P., Melanie, P., Mandreoli, P., Jagtap, P.D., Gu, Q., Weber, R.J.M., Lazarus, R., Vorderman, R.H.P., Hiltemann, S., Golitsynskiy, S., Garg, S., Bray, S.A., Gladman, S.L., Leo, S., Mehta, S.P., Griffin, T.J., Jalili, V., Yves, V., Wen, V., Nagampalli, V.K., Bacon, W.A., De Koning, W., Maier, W. and Briggs, P.J. 2022. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research* 50(W1), W345-W351.
- AFNOR 2000 NF T 90-376, Water quality—determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test. Association Française de Normalisation (ed), Saint Denis.
- Alexa, A. and Rahnenfuhrer, J. 2022 topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology.
- Altermatt, F., Alther, R., Fišer, C., Jokela, J., Konec, M., Küry, D., Mächler, E., Stucki, P. and Westram, A.M. 2014. Diversity and distribution of freshwater amphipod species in Switzerland (Crustacea: Amphipoda). *PLoS ONE* 9(10).
- Andrews, S.A. 2023 FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.
- Battke, F., Symons, S. and Nieselt, K. 2010. Mayday - integrative analytics for expression data. *BMC Bioinform.* 11.
- Baumann, P. and Langhans, S.D. 2010 Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Synthese der Beurteilungen auf Stufe F (flächendeckend), p. 47, Bundesamt für Umwelt, Bern.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120.
- Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P. and Lee, L.E.J. 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* 17(6), 601-611.
- Brion, F., De Gussem, V., Buchinger, S., Hollert, H., Carere, M., Porcher, J.-M., Piccini, B., Féray, C., Dulio, V., Könnemann, S., Simon, E., Werner, I., Kase, R. and Ait-Aïssa, S. 2019. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. *Environment International* 130, 104896.
- Bundesamt für Gesundheit (2012) Schweizerisches Lebensmittelbuch (SLMB). Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry. , Schweizerische Eidgenossenschaft.
- Bürgmann, H. and Beck, K. 2022 Monitoring of antibiotic resistance indicators in three full-scale wastewater ozonation facilities with sand filters in Switzerland, Eawag.
- Bürgmann, H., Cáceres, J.S., Beck, K. and Czekalski, N. 2013 Study of the temporal variability in the load of resistant bacteria at the WWTP Lausanne, Switzerland, p. 25, Eawag.
- Bürgmann, H., Egli, A., Endimiani, A., Stephan, R., Tschudin Sutter, S. and Hardt, W.D. 2022 Routes and reservoirs of AMR-determinants & one health AMR-surveillance. Thematic synthesis of the national research programme "Antimicrobial Resistance", Bern.
- Connon, R.E., Geist, J. and Werner, I. 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12(9), 12741-12771.



- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A. and Bürgmann, H. 2012. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3(MAR).
- Czekalski, N., Gascón Díez, E. and Bürgmann, H. 2014. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* 8(7), 1381-1390.
- Dai, D., Brown, C., Bürgmann, H., Larsson, D.G.J., Nambi, I., Zhang, T., Flach, C.F., Pruden, A. and Vikesland, P.J. 2022. Long-read metagenomic sequencing reveals shifts in associations of antibiotic resistance genes with mobile genetic elements from sewage to activated sludge. *Microbiome* 10(1).
- De Baat, M.L., Kraak, M.H.S., Van der Oost, R., De Voogt, P. and Verdonschot, P.F.M. 2019. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water Research* 159, 434-443.
- De Baat, M.L., Van der Oost, R., Van der Lee, G.H., Wieringa, N., Hamers, T., Verdonschot, P.F.M., De Voogt, P. and Kraak, M.H.S. 2020. Advancements in effect-based surface water quality assessment. *Water Research* 183, 116017.
- Deanovic, L.A., Markiewicz, D., Stillway, M., Fong, S. and Werner, I. 2013. Comparing the effectiveness of chronic water column tests with the crustaceans *Hyalella azteca* (order: Amphipoda) and *Ceriodaphnia dubia* (order: Cladocera) in detecting toxicity of current-use insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(3), 707-712.
- Doppler, T., Mangold, S., Wittmer, I., Spycher, S., Compte, R., Stamm, C., Singer, H., Junghans, M. and Kunz, M. 2017. Hohe PSM-Belastung in Schweizer Bächen. *Aqua & Gas* (4), 46-56.
- Ecotox Centre 2023 Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays - Strata-XL, p. 20.
- Elendt, B.P. and Bias, W.R. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res* 24(9), 1157-1167.
- Escher, B., Neale, P. and Leusch, F. 2021 *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*, IWA Publishing.
- Escher, B.I., Aït-Aïssa, S., Behnisch, P.A., Brack, W., Brion, F., Brouwer, A., Buchinger, S., Crawford, S.E., Du Pasquier, D., Hamers, T., Hettwer, K., Hilscherová, K., Hollert, H., Kase, R., Kienle, C., Tindall, A.J., Tuerk, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E. and Neale, P.A. 2018. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Science of The Total Environment* 628-629, 748-765.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S. and Vermeirssen, E.L.M. 2008. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *Journal of Environmental Monitoring* 10(5), 612-621.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. and Käller, M. 2016. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32(19), 3047-3048.
- Fent, K. (2013) *Ökotoxikologie, Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ferrari, B.J.D., Vermeirssen, E., Simon, E., Bucher, T. and Santiago, S. 2017 *Projet Kartox : Ecotoxicité des eaux issues d'exutoires karstiques évaluée à l'aide de tests in vitro et in vivo. Étude réalisée sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV), Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, Lausanne.*
- Fumasoli, A., Rebsamen, D. and Benz, A. 2022 *Ausbau ARA Falkenstein: Biomonitoring Dünnern - Untersuchungskonzept*, Hunziker Betatech.
- Glauch, L. and Escher, B.I. 2020. The Combined Algae Test for the Evaluation of Mixture Toxicity in Environmental Samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39(12), 2496-2508.
- Götz, C.W., Kase, R., Kienle, C. and Hollender, J. 2010. Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser - Kombination von Expositions- und ökotoxikologischen Effektdaten. *Gas, Wasser, Abwasser* 7, 575-585.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind,



- N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. and Regev, A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29(7), 644-652.
- IDT 2022 xGen<sup>TM</sup> RNA Lib Prep 16rxn.
- International Organization for Standardization 2007 Water quality -- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007.
- International Organization for Standardization 2008 Water quality -- Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. ISO 20665:2008.
- International Organization for Standardization 2018 Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay. ISO 19040-3:2018.
- International Organization for Standardization 2019a Soil quality — Guidance on the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil materials. ISO 17616:2019.
- International Organization for Standardization 2019b Water quality — Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1). ISO 21115:2019.
- Junghans, M., Langer, M., Baumgartner, C., Vermeirssen, E. and Werner, I. 2019. Ökotoxikologische Untersuchungen: Risiko von PSM bestätigt - NAWA-SPEZ-Studie 2017 zeigt Beeinträchtigung von Gewässerorganismen. *Aqua & Gas* 99(4), 26-34.
- Kienle, C., Beauvais, R., Casado-Martinez, M.C., Voisin, A.-S., Werner, I., Vermeirssen, E. and Ferrari, B. 2023a. Ökotoxikologische Biotests und Biomarker zur Beurteilung der Wasser- und Sedimentqualität. *Aqua & Gas*.
- Kienle, C., Bramaz, N., Schifferli, A., Olbrich, D., Werner, I. and Vermeirssen, E. 2023b. Ökotoxikologische Beurteilung der Wasserqualität mit einer Biotestbatterie *Aqua & Gas* (4/23).
- Kienle, C., Kase, R., Schärer, M. and Werner, I. 2015. Ökotoxikologische Biotests - Anwendung von Biotests zur Evaluation der Wirkung und Elimination von Mikroverunreinigungen. *Aqua & Gas* 95(7/8), 18-26.
- Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P. and Werner, I. 2018. Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests - Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern. *Aqua & Gas* 98(4), 40-48.
- Kienle, C., Vermeirssen, E.L.M., Schifferli, A., Singer, H., Stamm, C. and Werner, I. 2019. Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams – Unravelling the contribution of chemicals causing effects. *PLOS ONE* 14(12), e0226278.
- Könemann, S., Kase, R., Simon, E., Swart, K., Buchinger, S., Schlüsener, M., Hollert, H., Escher, B.I., Werner, I., Aït-Aïssa, S., Vermeirssen, E., Dulio, V., Valsecchi, S., Polesello, S., Behnisch, P., Javurkova, B., Perceval, O., Di Paolo, C., Olbrich, D., Sychrova, E., Schlichting, R., Leborgne, L., Clara, M., Scheffknecht, C., Marneffe, Y., Chalon, C., Tušil, P., Soldán, P., von Danwitz, B., Schwaiger, J., San Martín Becares, M.I., Bersani, F., Hilscherová, K., Reifferscheid, G., Ternes, T. and Carere, M. 2018. Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 102, 225-235.
- Langer, M., Junghans, M., Spycher, S., Koster, M., Baumgartner, C., Vermeirssen, E. and Werner, I. 2017. Hohe Ökotoxikologische Risiken in Bächen. *Aqua & Gas* 97(4), 58-68.
- Lee, J., Beck, K. and Bürgmann, H. 2022. Wastewater bypass is a major temporary point-source of antibiotic resistance genes and multi-resistance risk factors in a Swiss river. *Water Research* 208.
- Lee, J., Ju, F., Maile-Moskowitz, A., Beck, K., Maccagnan, A., McArdell, C.S., Dal Molin, M., Fenicia, F., Vikesland, P.J., Pruden, A., Stamm, C. and Bürgmann, H. 2021. Unraveling the riverine antibiotic resistome: The downstream fate of anthropogenic inputs. *Water Research* 197.
- Liechti, P., Sieber, U., von Blücher, U., Willi, H.P., Bundi, U., Frutiger, A., Hütte, M., Peter, A., Göldi, C., Kupper, U., Meier, W. and Niederhauser, P. 1998 Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz, Modul-Stufen-Konzept, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern.



- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12).
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32(6), 1372-1379.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M., Meerman, J.H., Belfroid, A.C., Spenkelink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B. and Vethaak, D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 21(1), 16-23.
- Neale, P.A., Munz, N.A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherova, K., Kienle, C., Novak, J., Seiler, T.B., Shao, Y., Stamm, C. and Hollender, J. 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *The Science of the total environment* 576, 785-795.
- New England Biolabs 2023 Isolate mRNA using the NEBNext.pdf.
- OECD 1992 Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- OECD 2013 Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- OECD 2021 Test No. 249: Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay.
- Proctor, C.R., Besmer, M.D., Langenegger, T., Beck, K., Walser, J.C., Ackermann, M., Bürgmann, H. and Hammes, F. 2018. Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *ISME J.* 12(5), 1344-1359.
- R Core Team 2023 R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B.I. and Mueller, J.F. 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosensors & bioelectronics* 22(11), 2554-2563.
- Simon, E., Rieggraf, C., Schifferli, A., Olbrich, D., Bucher, T. and Vermeirssen, E.L.M. 2022. Evaluation of Three ISO Estrogen Receptor Transactivation Assays Applied to 52 Domestic Effluent Samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* 41(10), 2512-2526.
- Simon, P. 2003. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19(11), 1439-1440.
- Spycher, S., Mangold, S., Doppler, T., Junghans, M., Wittmer, I., Stamm, C. and Singer, H. 2018. Pesticide Risks in Small Streams—How to Get as Close as Possible to the Stress Imposed on Aquatic Organisms. *Environmental Science & Technology* 52(8), 4526-4535.
- van der Oost, R., Sileno, G., Janse, T., Nguyen, M.T., Besselink, H. and Brouwer, A. 2017. SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part II—field feasibility survey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(9), 2400-2416.
- Vermeirssen, E.L., Hollender, J., Bramaz, N., van der Voet, J. and Escher, B.I. 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(11), 2575-2582.
- Vivien, R. and Ferrari, B.J.D. 2023 Assessment of the biological quality and functioning of the Dünnern River upstream and downstream of the Falkenstein wastewater treatment plant (canton of Solothurn) using oligochaete communities in the coarse surface sediments, Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Lausanne, Switzerland.
- Vivien, R., Lafont, M., Werner, I., Laluc, M. and Ferrari, B.J.D. 2019. Assessment of the effects of wastewater treatment plant effluents on receiving streams using oligochaete communities of the porous matrix. *Knowl Manag Aquat Ec* 265(420).
- Wittmer, I. 2014. Schweizer Fliessgewässer mit vielen Pestiziden belastet. *Aqua & Gas* 3, 32-43.



## 7 Glossar

|           |                                                                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AFNOR     | Association Française de Normalisation                                                                              |
| ARA       | Abwasserreinigungsanlage                                                                                            |
| ARB       | Antibiotikaresistente Bakterien                                                                                     |
| ARG       | Antibiotikaresistente Gene                                                                                          |
| BDS       | BioDetection Systems b.v.                                                                                           |
| BEQ       | Biological Equivalence (Biologische Äquivalenz)                                                                     |
| CALUX     | Chemically Activated LUciferase eXpression                                                                          |
| CT        | Clarithromycin & Tetracyclin                                                                                        |
| DS        | Downstream (Probenahmestelle in der Dünnern unterhalb ARA-Ablauf)                                                   |
| DSMZ      | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen                                                              |
| EBS       | Effekt-basierter Schwellenwert                                                                                      |
| EC        | Effect Concentration (Effekt-Konzentration)                                                                         |
| EQ        | Equivalence (Äquivalenz)                                                                                            |
| EFF       | Effluent (Abwasser)                                                                                                 |
| ER        | Estrogen Rezeptor                                                                                                   |
| ES        | Effektschwelle                                                                                                      |
| FTR       | Functional Trait                                                                                                    |
| ISO       | International Organization for Standardization                                                                      |
| KBE       | Koloniebildende Einheiten                                                                                           |
| LID       | Lowest Ineffective Dilution (niedrigste Verdünnungsstufe ohne Effekt)                                               |
| LOQ       | Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)                                                                         |
| mRNA      | Messenger ribonucleic acid                                                                                          |
| NGS       | Next Generation Sequencing                                                                                          |
| OECD      | Organization for Economic Co-operation and Development                                                              |
| PC10      | Konzentration einer Probe, bei der die Reaktion 10 % der durch die Positivkontrolle ausgelösten Reaktion entspricht |
| PCA       | Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)                                                              |
| PSII      | Photosystem-II                                                                                                      |
| qPCR      | Quantitative polymerase chain reaction (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)                                     |
| RNA       | Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)                                                                                 |
| RQ        | Risikoquotient                                                                                                      |
| RLU       | Relative Light Units (Relative Lichteinheiten)                                                                      |
| RTgill-W1 | Regenbogenforellen Kiemenzelllinie                                                                                  |
| SD        | Standard deviation (Standardabweichung)                                                                             |
| SST       | Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Tetracyclin                                                                       |
| SPE       | Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)                                                                       |
| TCC       | Total Cell Count (Gesamtzellzahl)                                                                                   |
| U2OS      | Humane Knochenmarkkrebs-Zelllinie                                                                                   |
| US        | Upstream (Probenahmestelle in der Dünnern oberhalb ARA-Ablauf)                                                      |
| UQK       | Umwelt-Qualitätskriterium                                                                                           |



## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Probenahmestellen .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 3  |
| Abb. 2: Die ARA Falkenstein in Oensingen SO in einem Luftbild (Swisstopo) S: Sammelstelle, US: Standort für die Bachflohkrebskäfige oberhalb des ARA-Ablaufs (upstream) ; DS Standort für die Bachflohkrebskäfige unterhalb des ARA-Ablaufs (downstream), X Markierung des ARA-Ablaufs.....                                                                                                       | 4  |
| Abb. 3: Niederschlagsmengen vor und während der Probenahmekampagnen. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 5  |
| Abb. 4: Kombiniertes Algentest: Diuron-Äquivalenzkonzentrationen ( $DEQ_{bio}$ , ng/L) für die Hemmung der Photosynthese nach 2 h (A) und die Hemmung des Wachstums nach 24 h (B) in Probenextrakten aus dem Abwasser der ARA Falkenstein und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs. ....                                                                                               | 12 |
| Abb. 5: ER $\alpha$ -CALUX <sup>®</sup> : 17 $\beta$ -Östradiol-Äquivalenzkonzentrationen ( $EEQ_{bio}$ , ng/L) für östrogene Aktivität in Probenextrakten aus dem Abwasser der ARA Falkenstein (EFF) und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs (US und DS1). ....                                                                                                                      | 13 |
| Abb. 6: Reproduktionstest mit Ceriodaphnia dubia: Fortpflanzung der Mütter nach 8 Tagen Exposition gegenüber Wasserproben der ARA Falkenstein (EFF) und der Dünnern ober- und unterhalb des ARA-Ablaufs (US und DS1) (dargestellt in % relativ zur Kontrolle (CO)). ....                                                                                                                          | 14 |
| Abb. 7: Toxizität in einer Fischzelllinie: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der drei getesteten Wasserproben in Verdünnung (A1, B1, C1), der 100%igen Wasserproben plus Positivkontrolle 3,4-DCA (A2, B2, C2) und der Positivkontrolle im Zellexpositionsmedium L-15/ex (D) für die drei Fluoreszenzfarbstoffe, die zur Quantifizierung der Zellvitalität in % zur Kontrolle verwendet wurden. .... | 17 |
| Abb. 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von für 24 h mit den Wasserproben exponierten RTgill-W1 Zellen (Daten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition). Beispielhaft ist je ein Markergen für die zelluläre Funktion Biotransformation (A), allgemeine Stress-antwort (B), Immunantwort (C) und oxidativer Stress (D) dargestellt. ....                                 | 18 |
| Abb. 9: Übersichts-Heatmap zur Verdeutlichung der signifikanten Unterschiede aller gemessenen subletalen Effekte in den für 24 h mit den Wasserproben exponierten RTgill-W1 und RTgutGC Zellen (Daten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition). ....                                                                                                                                           | 19 |
| Abb. 10: Hauptkomponentenanalyse (PCA) aller getesteten Biomarkergene in den Zelllinien RTgill-W1 und RTgutGC (Genexpressionssda-ten von je 3 Zellkulturflaschen pro Exposition). ....                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| Abb. 11: Heatmap mit dem Log2 Fold change der Transkripte der Bachflohkrebsse der verschiedenen ARAs aus dem Jahr 2023. Die Differential Expression wurde jeweils zwischen Up und Downstream errechnet. Dargestellt sind nur die signifikant veränderten Transkripte....                                                                                                                          | 23 |
| Abb. 12: Die fünf am signifikantesten hochregulierten GO-Terms aus der GO-Enrichment Analyse der Bachflohkrebsse am Standort unterhalb der ARA (DS) im Vergleich zu oberhalb (US). ....                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| Abb. 13: Beispielhafte Scatterplots der Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrisch bestimmten Partikel und Gate für die Gesamtzellzahlbestimmung (SG bacteria) der Probenahmekampagne Nr. 3. ....                                                                                                                                                                                           | 26 |
| Abb. 14: Diversität der Bakteriengemeinschaft in den Wasserproben an den Probenahmestandorten. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 27 |
| Abb. 15: Zusammensetzung der bakteriellen Artengemeinschaft in den Wasserproben. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| Abb. 16: Relative Abundanz der 15 häufigsten Ordnungen innerhalb des Phylums Patescibacteria. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 28 |
| Abb. 17: Relative Abundanz bakterieller Familien aus unterschiedlichen Phylums, die als Indikatoren für die Einleitung von Abwasser in Frage kommen. ....                                                                                                                                                                                                                                         | 29 |
| Abb. 18: Häufigkeit kultivierbarer heterotropher Bakterien (A) und heterotropher Bakterien mit Resistenzen gegen zwei verschiedene Antibiotikakombinationen (B). ....                                                                                                                                                                                                                             | 30 |



|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 19: Häufigkeiten (Konzentrationen in Genkopien / mL) von Markergenen für Antibiotikaresistenz, quantifiziert mittels qPCR. A-C: Ergebnisse der Probenahmekampagnen 1-3..... | 31 |
| Abb. 20: Relative Häufigkeiten (in Genkopien / Kopien 16S rRNA Gen) von genetischen Markern für Antibiotikaresistenz, quantifiziert mittels qPCR. ....                           | 32 |
| Abb. 21: Probenahmestelle oberhalb ARA (US) (Photo: Veronica Lozano, Kt. Solothurn) .....                                                                                        | 48 |
| Abb. 22: Probenahme am ARA-Ablauf (Photo: Veronica Lozano, Kt. Solothurn) .....                                                                                                  | 48 |
| Abb. 23: Probenahmestelle 1 unterhalb der ARA (DS1) (Photo: Veronica Lozano).....                                                                                                | 49 |
| Abb. 24: Probenahmestelle 2 unterhalb der ARA (DS2), Autosampler (Photos: Helmut Bürgmann, Denise Wälchli).....                                                                  | 49 |
| Abb. 25: Kombierter Algentest: Doppelte Bestimmung des Wachstums-DEQ in 29 Proben aus 6 verschiedenen Projekten (Projekt II = Kanton Solothurn ARA Falkenstein) .....            | 65 |



## 8.2 Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1: Probenahmestellen in der Dünnern und dem Ablauf der ARA Falkenstein.....                                                                                                                                                                                | 3  |
| Tab. 2 Durchgeführte Untersuchungen.....                                                                                                                                                                                                                        | 6  |
| Tab. 3: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ)-Werte (ng/L) für Photosynthese- und Wachstumshemmung. .                                                                              | 8  |
| Tab. 4: Interpretation der Ergebnisse des Fortpflanzungstests mit Wasserflöhen (angepasst von Ferrari et al. (2017)) .....                                                                                                                                      | 8  |
| Tab. 5: Einstufung der Wasserqualität, entsprechende Risikoquotienten (RQ) und Einhaltung des Schwellenwerts.....                                                                                                                                               | 11 |
| Tab. 6: Ergebnisse der Risikobeurteilung basierend auf den Daten der chemischen Analytik und der Biotests. Die Farben geben die Höhe der Risikoquotienten wieder: blau = 0 - 0,1, grün = 0,1 - <1, gelb = 1- <2, orange = 2 - <10, rot = 10 - Maximalwert. .... | 15 |
| Tab. 7: Abiotische Daten von Punktmessungen während der Aussetzung und Probenahme der Bachflohkrebsse bei der ARA Falkenstein (US = upstream, DS = downstream) .....                                                                                            | 21 |
| Tab. 8: Mittelwerte der abiotischen Parameter aller untersuchten ARA aus dem Jahr 2023 (US = upstream, DS = downstream) .....                                                                                                                                   | 21 |
| Tab. 9: Die Anzahl der signifikant veränderten Transkripte zwischen Up- und Downstream von allen ARA-Standorten aus dem Jahr 2023 (US = upstream, DS = downstream) .....                                                                                        | 22 |
| Tab. 10: Ergebnisse durchflusszytometrischer Messungen: Gesamtzellzahl und Anteil der HNA und LNA Fraktion (grosse / kleine Zelltypen) .....                                                                                                                    | 25 |
| Tab. 11: Anreicherungsfaktoren der absoluten Häufigkeit der Resistenzgene im Ablauf der ARA im Verhältnis zur Dünnern (US). ....                                                                                                                                | 31 |
| Tab. 12: Anreicherungsfaktoren (fold change) der quantifizierten Marker-Gene in der Dünnern unterhalb der ARA (DS1, DS2) im Vergleich zum Standort oberhalb der ARA (US).....                                                                                   | 32 |
| Tab. 13: Kenndaten der sequenzierten Metagenome .....                                                                                                                                                                                                           | 33 |
| Tab. 14: Angaben zur Fatstq AMR-Analyse der Metagenome in Epi2Me .....                                                                                                                                                                                          | 33 |
| Tab. 15: Top 30* Antibiotikaresistenzgene (CARD database, Protein-Homologie-Modell) und Anzahl der gefundenen Sequenz-Übereinstimmungen .....                                                                                                                   | 34 |
| Tab. 16: Probenahmetage mit Informationen zu Entlastung, Niederschlag und Abfluss.....                                                                                                                                                                          | 50 |
| Tab. 17: Festphasenextraktion für Biotests.....                                                                                                                                                                                                                 | 51 |
| Tab. 18: Übersicht der Biomarkergene, die für die Untersuchung der Zelllinien RTgill-W1 und RTgutGC verwendet wurden, die 24 h lang mit den Wasserproben exponiert waren.....                                                                                   | 56 |
| Tab. 19: Filtrierte Wassermenge für jede Probe innerhalb jeder Kampagne. US = Dünnern oberhalb A-RA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern un-terhalb ARA-Ablauf ..                                                                                    | 60 |
| Tab. 20: Auflistung der Basensequenzen der verwendeten Primer und der Produktlänge [bp] (Länge des Amplifikates zwischen dem Forward- und dem Reverse-Primer in Basenpaaren), sowie die beschreibende Literatur.....                                            | 61 |
| Tab. 21: Fluoreszenzsonden, welche in Kombination mit den designten Primerpaaren aus Tab. 20 für den TaqMan Assay eingesetzt wurden.....                                                                                                                        | 61 |
| Tab. 22: Auflistung der Konzentrationen der Primer und Fluoreszenzsonden (Oligonukleotide), der Konditionen für die initiale Denaturierung, des Temperaturprogramms und der Anzahl der Zyklen.....                                                              | 62 |
| Tab. 23: Plasmide und Inserts der qPCR-Quantifizierungsstandards .....                                                                                                                                                                                          | 63 |
| Tab. 24: Auflistung der sequenzierten Reads pro Probe auf der GridION Plattform (Oxford Nanopore Technologies, UK) mit R9.4.1 MinION flow cells nach ca. 48 h sequenziert. ....                                                                                 | 63 |
| Tab. 25: Ergebnisse des kombinierten Algentests (ungerundet) .....                                                                                                                                                                                              | 65 |
| Tab. 26: Ergebnisse des ERα-CALUX® .....                                                                                                                                                                                                                        | 66 |
| Tab. 27: Zellvitalität nach Exposition mit den Wasserproben (Zellen + Wasserprobe ARA), den 100%igen Wasserproben plus Positivkontrolle (Zellen + Wasserprobe ARA + 3,4-DCA) und der Positivkontrolle im Zellexpositionsmedium L-15/ex.....                     | 68 |



## Anhang 1 Probenahme und -aufbereitung: Ergänzende Informationen

### Probenahme-Standorte

Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24 zeigen die Probennahmestellen in der Dünnern und auf der ARA Falkenstein.



**Abb. 21: Probenahmestelle oberhalb ARA (US) (Photo: Veronica Lozano, Kt. Solothurn)**



**Abb. 22: Probenahme am ARA-Ablauf (Photo: Veronica Lozano, Kt. Solothurn)**



**Abb. 23: Probenahmestelle 1 unterhalb der ARA (DS1)**  
(Photo: Veronica Lozano)



**Abb. 24: Probenahmestelle 2 unterhalb der ARA (DS2), Autosampler**  
(Photos: Helmut Bürgmann, Denise Wälchli)



## Probenahmedauer

Tab. 16 gibt einen Überblick über die Probenahmetage.

**Tab. 16: Probenahmetage mit Informationen zu Entlastung, Niederschlag und Abfluss.**

Verwendet wurden die Proben von den in gelb markierten Probenahmetagen

| Datum                       | Messzeitraum     |                  | Entlastung |                 | Niederschlag [mm] |            | Abfluss [m3/s]   |               | Proben Ökotoxzentrum |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------|-----------------|-------------------|------------|------------------|---------------|----------------------|
|                             | von              | bis              | ARA Tela   | ARA Falkenstein | Kestenholz        | Matzendorf | Abfluss Balsthal | Abfluss Olten |                      |
| Freitag, 28. Juli 2023      |                  |                  | x          |                 | 2.4               | 12.8       | 1.22             | 1.07          |                      |
| Samstag, 29. Juli 2023      | 29.07.2023 08:00 | 30.07.2023 08:00 | x          | x               | 14.5              | 15.2       | 2.42             | 3.73          |                      |
| Sonntag, 30. Juli 2023      | 30.07.2023 08:00 | 31.07.2023 08:00 | x          | x               | 0                 | 0          | 1.41             | 1.94          |                      |
| Montag, 31. Juli 2023       | 31.07.2023 08:00 | 01.08.2023 08:00 | x          |                 | 0                 | 0          | 0.832            | 0.865         |                      |
| Dienstag, 1. August 2023    | 01.08.2023 08:00 | 02.08.2023 08:00 |            | x               | 20.3              | 13.8       | 1.05             | 1.87          |                      |
| Mittwoch, 2. August 2023    | 02.08.2023 08:00 | 03.08.2023 08:00 |            |                 | 6                 | 3.2        | 1.01             | 1.29          |                      |
| Donnerstag, 3. August 2023  | 03.08.2023 08:00 | 04.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.786            | 0.988         | x                    |
| Freitag, 4. August 2023     | 04.08.2023 08:00 | 05.08.2023 08:00 |            |                 | 4                 | 5.4        | 1.03             | 0.963         |                      |
| Samstag, 5. August 2023     | 05.08.2023 08:00 | 06.08.2023 08:00 |            |                 | 0.2               | 0.2        | 1.13             | 1.39          | x                    |
| Sonntag, 6. August 2023     | 06.08.2023 08:00 | 07.08.2023 08:00 |            |                 | 9.4               | 11.5       | 1.35             | 1.3           |                      |
| Montag, 7. August 2023      | 07.08.2023 08:00 | 08.08.2023 08:00 |            |                 | 3.8               | 4.8        | 1.45             | 1.89          |                      |
| Dienstag, 8. August 2023    | 08.08.2023 08:00 | 09.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 1.07             | 1.18          | x                    |
| Mittwoch, 9. August 2023    | 09.08.2023 08:00 | 10.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.889            | 0.937         | x                    |
| Donnerstag, 10. August 2023 | 10.08.2023 08:00 | 11.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.792            | 0.792         | x                    |
| Freitag, 11. August 2023    | 11.08.2023 08:00 | 12.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.731            | 0.707         | x                    |
| Samstag, 12. August 2023    | 12.08.2023 08:00 | 13.08.2023 08:00 |            |                 | 2.1               | 0.7        | 0.719            | 0.702         | (x)                  |
| Sonntag, 13. August 2023    | 13.08.2023 08:00 | 14.08.2023 08:00 |            |                 | 0.2               | 0          | 0.685            | 0.655         | x                    |
| Montag, 14. August 2023     | 14.08.2023 08:00 | 15.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.651            | 0.614         | x                    |
| Dienstag, 15. August 2023   | 15.08.2023 08:00 | 16.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.626            | 0.588         | x                    |
| Mittwoch, 16. August 2023   | 16.08.2023 08:00 | 17.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          | 0.61             | 0.577         | x                    |
| Donnerstag, 17. August 2023 | 17.08.2023 08:00 | 18.08.2023 08:00 |            |                 | 0                 | 0          |                  |               | x                    |
| Freitag, 18. August 2023    | 18.08.2023 08:00 | 19.08.2023 08:00 |            |                 |                   |            |                  |               | x                    |
| Samstag, 19. August 2023    | 19.08.2023 08:00 | 20.08.2023 08:00 |            |                 |                   |            |                  |               | x                    |
| Sonntag, 20. August 2023    | 20.08.2023 08:00 | 21.08.2023 08:00 |            |                 |                   |            |                  |               | x                    |

## Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion

Die Proben wurden zunächst durch einen 2.7 µm Glasfaserfilter (APFD 09050, Millipore) gefiltert, danach mit 10 % HCl auf pH 7.2 ( $\pm 0.2$ ) eingestellt und anschliessend mittels Festphasenextraktion (SPE) aufkonzentriert (Tab. 17).

Die Anreicherung der Proben erfolgte anhand einer Standardarbeitsanweisung (Ecotox Centre, 2023): Je 500 mL (Abwasser) bzw. 1000 mL (Flusswasser) der Umweltproben wurden mittels Strata XL-Kartuschen (Phenomenex) angereichert. Eintausend Milliliter Reinstwasser dienten als SPE-Blindprobe (SPE Blank) und Field Blank (FB). Nach dem Auswaschen (Eluierung) der Probe aus den Kartuschen mit 2 mL Aceton, 2 mL Methanol und 3 mL Aceton wurde das Lösungsmittel auf ca. 0.5 mL eingengt und anschliessend mit Ethanol auf 1 mL addiert. Die Proben wurden so 500 bzw. 1000fach angereichert. Danach wurden die Extrakte bei 20 °C bis zur Analyse im Bio-test gelagert.

**Tab. 17: Festphasenextraktion für Biotests**

| Allgemeine Informationen |                                                                                         |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Probenart                | Wasserproben                                                                            |
| Probenvolumen            | 1'000 mL Oberflächenwasser, 500 mL Abwasser                                             |
| Blank                    | 1'000 mL Reinstwasser                                                                   |
| Probenfiltration         |                                                                                         |
| Filtration               | Glasfaserfilter Typ APFD 09050 (2.7 µm) (Millipore)                                     |
| Ansäuerung               | With HCl to pH 7.2                                                                      |
| Probenvorbereitung       |                                                                                         |
| Anreicherung             | Solid Phase Extraction (SPE)                                                            |
| SPE Kartuschen           | Strata-XL (100 µm Polymeric Reversed Phase, 500 mg / 6 mL)<br>(Phenomenex: 8B-S043-HCH) |
| Konditionierung          | 5 mL Aceton<br>5 mL Methanol<br>5 mL Reinstwasser<br>5 mL Reinstwasser                  |
| Elution                  | 2 mL Aceton<br>2 mL Methanol<br>3 mL Aceton                                             |
| Einengen                 | Unter Vakuum auf ca. 500 - 800 µL, dann auf 1'000 µL aufstocken mit Ethanol             |
| Anreicherungsfaktor      | 500fach (ARA-Ablauf), 1000fach (Oberflächenwasser)                                      |
| Lagerung                 | Im Dunkeln bei -20 °C                                                                   |



## Anhang 2 Angewendete Untersuchungsmethoden: Ergänzende Informationen

### Kombinierter Algentest

#### Testorganismus

Der kombinierte Algentest wurde mit der einzelligen Grünalge *Raphidocelis subcapitata* durchgeführt. Die Algen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Deutschland).

#### Testprinzip und -durchführung

Der Test wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt, wie in Escher et al. (2008) beschrieben. Das Herbizid Diuron diente als Referenzsubstanz und Ethanol als Lösungsmittelkontrolle. Die Referenzsubstanz und die Umweltproben wurden in zweifacher Ausführung in einer 1:3-Verdünnungsreihe über acht Wells (Vertiefungen) getestet (80 µL/Well). Die Anfangskonzentration von Diuron im Test betrug  $1.33 \times 10^{-6}$  M oder 310 µg/L. Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels wurden Referenz und Proben in 150 µL Versuchsmedium rückgelöst und 150 µL der Algenkultur mit einer optischen Dichte ( $OD_{685}$ ) von 0.1 zu jedem Well hinzugefügt. Der maximale relative Anreicherungsfaktor (*relative enrichment factor* / REF), d.h. die Kombination aus Anreicherung in der SPE und Verdünnung im Algentest, für die Umweltproben im Algentest betrug 133 (Abwasser) bzw. 266 (Fließgewässer).

Die Photosynthesehemmung wurde über die effektive Quantenausbeute (Y) mittels eines Maxi-Imaging-PAM (Puls Amplitude Modulation, IPAM) -Gerätes (Walz, Effeltrich, Deutschland) nach 2 h gemessen (siehe auch (Escher et al., 2008; Schreiber et al., 2007)). Das Algenwachstum wurde mittels Absorptionsmessung bei 685 nm ( $OD_{685}$ ) in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Synergy 2, Biotek, Winooski, United States) nach 0 und 24 h erfasst. Die Absorption von Licht bei 685 nm ist proportional zum Chlorophyll A-Gehalt der Algen und dadurch proportional zur Zellzahl im Medium.

#### Datenauswertung

Zur Quantifizierung der Photosynthese- und Wachstumshemmung wurden Diuron-Äquivalenzkonzentrationen ( $DEQ_{bio}$ ) für die Photosynthesehemmung und die Wachstumshemmung berechnet wie in Kienle et al. (2019) und Neale et al. (2017) beschrieben. Die ermittelten Werte wurden somit unter Einbeziehung der jeweiligen Probenanreicherung sowie Verdünnung im Test in Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (ng  $DEQ_{bio}$ /L) umgerechnet.

### ERα-CALUX®

#### Testorganismus

Der ERα-CALUX® wird mit der humanen Osteosarcom-Zelllinie U2OS durchgeführt. Diese Zelllinie stammt von der Firma BioDetection Systems (BDS, Niederlande).

#### Testprinzip und -durchführung

Besitzt eine Substanz oder Umweltprobe östrogene Aktivität, so bindet sie an den Hormonrezeptor der ERα-CALUX® Zelle und aktiviert diesen. Nach mehreren Schritten wird dadurch das Enzym Luziferase gebildet, welches das zu den Zellen zugegebene Protein Luziferin unter Erzeugung von Licht umwandelt. Die erzeugte Lichtmenge ist proportional zu der induzierten Wirkung. Die resultierende Luziferaseaktivität, und damit das Ausmass an Hormonaktivität, kann mittels eines Luminometers quantifiziert werden (ISO 19040-3).

Der Test wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten nach der ISO-Richtlinie 19040-3 (International Organization for Standardization, 2018) durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde das Östrogen 17β-Östradiol (E2) verwendet und DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Die Probenextrakte wurden

in DMSO überführt und um den Faktor 10 auf 5'000-fach (Abwasserproben) bzw. 10'000-fach (Flusswasser) weiter aufkonzentriert.

Von der Referenzsubstanz wurden neun Konzentrationen 17 $\beta$ -Östradiol ( $1.0 \times 10^{-9}$  M bis  $1 \times 10^{13}$  M oder 0.03 bis 27 ng/L) und von den Probenextrakten fünf Verdünnungen (1:1'000, 1:3'000, 1:10'000, 1:30'000 und 1:100'000) in dreifacher Ausführung getestet. Der maximale Anreicherungsfaktor für die Abwasserproben im Test betrug fünf.

Vor dem Test wurden 96-Well Platten mit Zellen in Versuchsmedium besiedelt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 16 - 24 h wachsen gelassen. Am Testtag wurde das Medium durch die Gemische des Versuchsmediums mit zu testenden Proben ausgetauscht. Nach 24 h Inkubation (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen mikroskopisch auf zytotoxische Effekte kontrolliert. Es traten bei den Proben im gewählten Verdünnungsbereich keine zytotoxischen Effekte auf. Deshalb konnten die ermittelten Luziferase-Aktivitäten ohne Einschränkung verwendet werden. Das Medium wurde anschliessend entfernt. Durch Zugabe von 30  $\mu$ L Lyse-Puffer (mit Triton) wurden die Zellen lysiert und das Enzym Luziferase freigesetzt.

Die Luziferase-Aktivität wurde mit dem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer gemessen (TriStar2, Multimode- Reader LB 942, Berthold Technologies, Schweiz) und als relative Lichteinheit (RLU) wiedergegeben.

### Datenauswertung

Zur Quantifizierung der östrogenen Aktivität wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Probenanreicherung und Verdünnung im Test 17 $\beta$ -Östradiol-Äquivalenzkonzentrationen (ng/L EEQ) berechnet.

## Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen

### Konservierung und Verarbeitung von Proben

Die Wasserproben wurden bis zur Verwendung im Dunkeln bei 2 - 8°C gelagert. Der Test wurde drei Tage nach der Lieferung an das Labor Soluval Santiago gestartet. Die Proben wurden zusammen mit einem Kontrollwasser getestet (siehe Tab. 2).

### Versuchsdurchführung

**Testorganismus:** Im verwendeten Biotest wurden die Auswirkungen der untersuchten Abwässer auf den Wasserfloh *Ceriodaphnia dubia* in einem chronischen Toxizitätstest in 8 Tagen bestimmt (Hemmung der Fortpflanzung nach ISO/CD 20665 (International Organization for Standardization, 2008) und AFNOR T90-376 (AFNOR, 2000)).

**Medien:** Der Test wurde mit einer leichten Modifikation der Standards durchgeführt: Das Kontroll- bzw. Verdünnungsmedium – eine Mischung aus 25 % Evian Mineralwasser, 25 % Elendt M4 Medium (Elendt and Bias, 1990) und 50 % entionisiertem Wasser – entsprach einem mässig harten Wasser, das mit Selen und Vitamin B12 ergänzt war. Als Futter diente eine Mischung aus Hefe, einer aufgeschlossenen Suspension von Fischflocken (TetraMin®) und Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata* und *Chlorella* sp.).

**Exposition der Testorganismen:** Die Testorganismen stammten aus einer Laborkultur (Soluval Santiago, Couvet, CH). Die Jungtiere (weniger als 24 h alt und alle innerhalb von 8 h des gleichen Alters zu Beginn des Tests) wurden bis zu 8 Tage in einem statischen System mit regelmässigem Wasserwechsel gegenüber den verschiedenen Testansätzen exponiert (ein Kontrollansatz mit 24 Replikaten und Wasserproben mit 9 - 11 Replikaten pro Ansatz). Die Proben wurden in einer Konzentration getestet (90 % Wasserprobe und 10 % Medium). Alle Tests wurden bei  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  in einer Klimakammer durchgeführt mit einer Beleuchtungsintensität von 300 bis 500 Lux und einem 16:8 h hell:dunkel-Rhythmus.

**Endpunkte/Beobachtungen:** Das Überleben der Mütter und der Nachkommen wurde täglich, jeweils beim Wasserwechsel, bestimmt. Die physikalisch-chemischen Charakteristika der Proben



(pH, gelöster Sauerstoff (mg/L) und elektrische Leitfähigkeit ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )) wurden bei Ankunft der Proben im Labor, zu 4 - 5 Zeitpunkten während dem Test und am Testende gemessen.

### Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism® (Version 10.2.2). Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet (*Shapiro-Wilk-Test*). Alle Datensätze für den Endpunkt Fortpflanzung waren normalverteilt, daher wurden die Daten mit einer Varianzanalyse (*Ordinary one-way ANOVA*) gefolgt von einem *Dunnett's multiple comparisons* Test ausgewertet. In den Proben trat keine Mortalität auf, daher erfolgte für diesen Endpunkt keine statistische Auswertung.

## Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien

### Toxizität in Fischkiemenzellen

#### Testprinzip

Der RTgill-W1-Zelltest mit einer Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) ermöglicht den Nachweis der akuten Toxizität von Wasserproben und Chemikalien (ISO 21115) (International Organization for Standardization, 2019b). Die Toxizität wird durch Messung der Fluoreszenz von drei Indikatorfarbstoffen auf demselben Zellsatz nach 24 h Exposition mit einer Verdünnungsreihe der Proben bewertet. Hierbei werden AlamarBlue, CFDA-AM und Neutralrot zur Messung der metabolischen Aktivität, der Integrität der Zellmembran und der Integrität der Lysosomenmembran verwendet. Die Ergebnisse werden als prozentuale Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Wird mit allen drei Indikatorfarbstoffen eine verdünnungsabhängige Abnahme der Zellvitalität festgestellt, wird die Probe als akut toxisch eingestuft. Eine Abnahme der Fluoreszenzwerte bei nur einem oder zwei Indikatorfarbstoffen weist auf eine subletale Wirkung hin. Die so ermittelte Toxizität korreliert bei der Bewertung von Chemikalien in vielen Fällen mit den Ergebnissen des akuten Fischtoxizitätstests (OECD, 1992) und des akuten Fischembryo-Toxizitätstests (OECD (2013) und International Organization for Standardization (2007)).

#### Testorganismus

Für den Test wird eine permanente Kiemenzelllinie (RTgill-W1) der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet (Bols et al., 1994).

#### Vorbereitung der Proben

Vor dem Test wurden die nativen Wasserproben über Nacht aufgetaut. Je ein Aliquot jeder Wasserprobe (US, EFF, DS1) wurde gemäß ISO 21115 (ohne Festphasenextraktion) für die Zellexposition vorbereitet. Dabei wurde jede Wasserprobe auf eine Reihe von allgemeinen Wasserparametern untersucht. Die Osmolalität wurde durch Zugabe von Komponenten des Zellexpositionsmediums L-15/ex (hauptsächlich Salze) eingestellt, um den Zellen ein isotonisches Milieu zu bieten (Hinweis: Dies führte zu einer Verdünnung der Wasserprobe um 5 %). Die Proben wurden anschliessend sterilfiltriert ( $0.22\ \mu\text{m}$ ), um Störungen durch das Wachstum von Mikroorganismen zu vermeiden. Die so vorbereiteten Proben wurden dann für die Durchführung des Zytotoxizitätstests nach ISO 21115 und die gleichzeitige Exposition der Zellen für die Genexpressionsanalyse verwendet.

#### Durchführung

Jede Probe wurde auf zwei Arten getestet. Eine Testplatte (24-Well-Platte) mit den RTgill-W1-Zellen wurde einer Verdünnungsreihe der Wasserprobe ausgesetzt, wobei das Zellexpositionsmedium L-15/ex als Verdünnungsmittel verwendet wurde. Da viele Wasserproben nicht akut toxisch sind, wurde parallel eine zweite Platte mit den RTgill-W1-Zellen getestet, in der unverdünntes Probenwasser mit einer Verdünnungsreihe der Positivkontrolle 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) versetzt wurde. Für die Toxizität von 3,4-DCA wurde ein Akzeptanzbereich festgelegt, der auf

den effektiven Konzentrationen dieser Chemikalie basiert, die eine 50%ige Abnahme der Zellviitalität verursachen ( $EC_{50}$ -Wert), gemessen mit allen drei Indikatorfarbstoffen. Diese Positivkontrolle zeigt nicht nur das ordnungsgemässe Funktionieren des Testverfahrens bei schwacher oder keiner Toxizität der Wasserprobe an, sondern dient auch dazu, mögliche Matrixeffekte durch undefinierte Bestandteile der Wasserprobe zu erkennen. Eine Abschwächung der Toxizität wird angezeigt, wenn sich die Konzentrations-Wirkungskurve des 3,4-DCA im Vergleich zum Akzeptanzbereich nach rechts verschiebt; eine Verschiebung nach links deutet darauf hin, dass die Wasserprobe eine subletale Toxizität für die Zellen verursacht, die durch die zusätzliche Belastung durch das 3,4-DCA verstärkt wird.

Zur Validierung der Testdurchführung selbst wurde ein zusätzlicher Test mit einem Konzentrationsbereich von 3,4-DCA im definierten Zellexpositionsmedium (L-15/ex) unter Verwendung einer separaten Testplatte durchgeführt (Positivkontrolle in L-15/ex).

Gemäss ISO 21115 sollte der  $EC_{50}$ -Wert der Positivkontrolle 3,4-DCA basierend auf nominalen Konzentrationen für jeden Zellvitalitäts-Indikatorfarbstoff innerhalb von zweieinhalb Standardabweichungen (SD) der unten angegebenen  $EC_{50}$ -Werte liegen.

|              |                                                                  |
|--------------|------------------------------------------------------------------|
| AlamarBlue:  | 42.9 mg/L $\pm$ 5.7 mg/L (2.5 SD range: 28.7 mg/L to 57.1 mg/L)  |
| CFDA-AM:     | 62.6 mg/L $\pm$ 24.9 mg/L (2.5 SD range: 0.4 mg/L to 124.9 mg/L) |
| Neutral Red: | 48.8 mg/L $\pm$ 10.0 mg/L (2.5 SD range: 23.7 mg/L to 73.8 mg/L) |

### Genexpression in Fischzellen

Die gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Plus MiniKit (Qiagen) isoliert. RNA-Qualität und Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop) bestimmt. Die RNA-Integrität wurde mittels Gelelektrophorese untersucht. Die cDNA wurde mit dem Perfect Real Time PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) synthetisiert. Die quantitative Bestimmung der Biomarker mRNA-Expression erfolgte mittels qPCR (quantitative Echtzeit-PCR) unter der Verwendung des LightCycler 480 (Roche) und dem GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Es wurden 20 verschiedenen Biomarkergene untersucht, die verschiedene zelluläre Antworten gegenüber Umweltstress, wie allgemeinen Stress, Metall- und oxidativen Stress, Biotransformation, Immunregulation usw., aufzeigen.

Die qPCR-Ergebnisse wurden mittels Referenzgenexpression normalisiert und die „Mean normalized Expression“ mittels dem Q-Gen-Core-Modul (<http://www.qgene.org/>) (Muller et al., 2002; Simon, 2003) berechnet. Die Signifikanzanalyse der Genexpression wurde mittels *one-way ANOVA* und anschliessendem *Tukey's multiple comparisons*-Test durchgeführt (graphPad Prism 10). Für eine PCA (Hauptkomponentenanalyse) wurde das Programm MayDay (Battke et al., 2010) verwendet.

Tab. 18 gibt einen Überblick über alle untersuchten Biomarkergene und ihre Funktion.



**Tab. 18: Übersicht der Biomarkergene, die für die Untersuchung der Zelllinien RTgill-W1 und RTgutGC verwendet wurden, die 24 h lang mit den Wasserproben exponiert waren.**

| Zelluläre Funktion              | Marker gen                                        | Spezifische Funktion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Biotransformation</b>        | CYP1A (Cytochrom P450 1A)                         | Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist an der Transformation verschiedenster Chemikalien beteiligt, einschliesslich Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs), alkylierter PAKs, polychlorierter Biphenyle (PCBs) und Dioxine.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                 | CYP3A (Cytochrom P450 3A)                         | Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist an der Transformation vorrangig aliphatischer Kohlenwasserstoffe oder Xenohormone beteiligt. Zudem verstoffwechselt es circa die Hälfte aller Medikamentenwirkstoffe, die eine oxidative Biotransformation durchlaufen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                 | GST (Glutathion-S-Transferase)                    | Die Konjugationsaktivität von Glutathion-S-Transferase (Phase II-Enzym) spielt eine entscheidende Rolle bei der zellulären Entgiftung chemotherapeutischer Substanzen, sowie verschiedener Medikamentenwirkstoffe, Pestizide und Karzinogene.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Allgemeine Stressantwort</b> | ABCB1a (ABC-Transporter B1, P-glycoprotein, MDR1) | Dieses Protein gehört zur Familie der ABC-Efflux-Transporter-Familie ist verantwortlich für den Transport nicht-biotransformierter Substanzen aus der Zelle. Das funktionelle Protein transportiert ein breites Spektrum unterschiedlichster Substrate, einschliesslich amphiphiler Medikamentenwirkstoffe (d.h. Wirkstoffe die sowohl wasser- als auch fettliebend sind), hydrophober Kationen, Anthrazykline (zelltoxische Antibiotika), Anthracene (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), Vincaalkaloide (Pflanzenwirkstoffe aus der Gruppe der Alkaloide), Antibiotika, antivirale Wirkstoffe und natürliche Toxine (z.B. Microzystine) und verhindert dadurch eine Anreicherung dieser Substanzen in der Zelle. |
|                                 | PXR (Pregnan-X-Rezeptor)                          | Dieser nukleäre Rezeptor dient als Sensor für toxische Nebenprodukte des körpereigenen (endogenen) Metabolismus sowie für von aussen einwirkende (exogene) Chemikalien und verbessert deren Eliminierung aus der Zelle durch die Regulierung verschiedener Entgiftungsgene. PXR wird durch eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen aktiviert, wie z.B. Steroide, Antibiotika, sowie verschiedenste pflanzliche Substanzen.                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                                 | HSP70 (Heat shock protein)                        | Dieses Protein dient der Bewahrung der Proteinintegrität indem es Aggregation und Fehlfaltungen verhindert.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Immunantwort</b>             | IL-1b (Interleukin-1 beta)                        | Dieses Zytokin (Peptidhormon & körpereigener Botenstoff des Immunsystems) ist Entzündungsmediator (d.h. ein körpereigener Stoff, der eine Entzündungsreaktion einleitet und aufrechterhält) und zentraler Botenstoff in der zellulären Antwort auf eine Reihe von Fremdeinflüssen, wie z.B. Lipopolysaccharide, welche in der Membran von gramnegativen Bakterien enthalten sind.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                 | IL8 (Interleukin 8)                               | Dieses Zytokin ist Entzündungsmediator und bewirkt eine spezifische Aktivierung neutrophiler Granulozyten, einen transienten Anstieg des zytosolischen Calciums, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies („respiratory burst“), die Stimulation von Chemotaxis, den Transport von Speicherproteinen (Granula) aus der Zelle (Exozytose), ebenso wie eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                 | Socs3 (Suppressor of cytokine signaling 3)        | Socs 3 hat sich als wichtiger Rückkopplungsinhibitor mehrerer Zytokine (d.h. Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen steuern) erwiesen, darunter der Leukämie-Inhibitionsfaktor,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                                                |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                |                                          | IL-6, IL-11, der Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leptin und der Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                | TNFalpha (tumor necrosis factor alpha)*  | Der Tumornekrosefaktor-alpha reguliert Zytokine und andere Immunzellen, sowie den programmierten (apoptotischen) Zelltod und verhindert die Tumorbildung.                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Oxidativer Stress &amp; Metallbelastung</b> | NrF2 (NF-E2 p45-related factor 2)        | Erste zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress, welche die Regulierung verschiedener antioxidativer Signalwege und Schutzgene initiiert, die für die Versorgung der Zelle mit Antioxidantien zuständig sind.                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                | Hmox (Hämeoxygenase)                     | Dieses Gen wird sensitiv reguliert gegenüber oxidativem Stress, Hypoxie und Schwermetallbelastung.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                                | MTa (Metallothionein A)                  | Metallothionein A ist für die Bindung von sowohl physiologischen Metallen (z.B. Zink oder Kupfer), als auch xenobiotischen (d.h. körperfremden Metallen (z.B. Kadmium, Quecksilber, Silber, Arsen) verantwortlich. Die Bindung erfolgt über die Thiolgruppen an den Cystein-Enden des Proteins. Zusätzlich wird MTa sensitiv gegenüber Glukokortikoid-Exposition reguliert, da dieses Protein ein «Glukokortikoide Responsive-Element» (GRE) im Promotor besitzt. |
|                                                | MTb (Metallothionein B)*                 | Metallothionein B ist für die Bindung von sowohl physiologischen (z.B. Zink, Kupfer, Selenium), als auch xenobiotischen (z.B. Kadmium, Quecksilber, Silber, Arsen) Metallen verantwortlich. Die Bindung erfolgt, wie bei MTa, über die Thiolgruppen an den Cystein-Enden des Proteins.                                                                                                                                                                            |
| <b>Zellzyklus/ Karzinogenese</b>               | C-myc (Protoonkogen)                     | c-myc ist ein Krebsgen (Onkogen)-Vorläufer (Protoonkogen), dessen Genprodukt c-Myc als Transkriptionsfaktor (DNA-bindendes Protein, das das Ablesen der DNA in RNA steuert) ein wichtiger Regulator von Zellwachstum und -differenzierung ist.                                                                                                                                                                                                                    |
|                                                | C-fos (Protoonkogen)                     | c-Fos-Proteine sind zelluläre Proteine, die an die DNA binden. Sie werden von den c-fos-Genen als Antwort auf äussere Zellreize produziert. Das c-Fos-Protein verbindet sich mit dem c-Jun-Protein zum Transkriptionsfaktor AP-1, der die Expression vieler am Zellwachstum beteiligter Gene reguliert.                                                                                                                                                           |
| <b>Metabolismus</b>                            | PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) | Wichtigstes Enzym der Glukoneogenese (Bildung von D-Glukose aus Kohlenhydrat-Vorstufen), sensitiv gegenüber Glukokortikoid-Hormon-Exposition.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Östrogene Wirkung</b>                       | VTG (Vitellogenin)*                      | Eidotter-Vorläuferprotein: durch Östrogene bzw. Xenoöstrogene (östrogen-ähnliche Stoffe) reguliert.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                                | ERa (Estrogenrezeptor alpha)*            | <i>Steroidrezeptor</i> (Rezeptoren, die für die Signalübertragung von Steroidhormonen in der Zelle verantwortlich sind): <i>durch Östrogene bzw. Xenoöstrogene aktiviert</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Neurotransmission</b>                       | AChE (Acetylcholinesterase)              | Die Acetylcholinesterase ist ein Enzym aus der Gruppe der Cholinesterasen, welches spezifisch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) (Botenstoff, der Signale von einer Nervenzelle zur nächsten überträgt) in Essigsäure und Cholin hydrolysiert und damit die Wirkung von Acetylcholin im synaptischen Spalt (Spalt zwischen zwei Nervenzellen) aufhebt.                                                                                                       |
| <b>Referenzgen</b>                             | EF1alpha (Elongationsfaktor 1 alpha)     | nicht-reguliertes und konstitutiv exprimiertes Gen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

\* Weitere Studien notwendig um die Regulierung dieser Gene in den Zelllinien besser zu verstehen.



## Genexpression in Bachflohkrebsen

Die mRNA wurde aus 6 Individuen des US- und 6 Individuen des DS-Standortes extrahiert. Die RNA der Einzelorganismen wurde mit Trizol nach dem Protokoll von Thermo Fisher Scientific isoliert ("Trizol Reagent User Guide," 2020). Die RNA-Konzentration und -Qualität wurde mit dem Nanodrop bestimmt. Die Quotienten, die Hinweise auf eine Protein- bzw. Lösemittelkontamination der isolierten RNA geben, waren für alle Proben  $> 1.8$ . Daraus konnte geschlossen werden, dass die mRNA-Qualität für alle Proben ausreichend war. Anschliessend wurde die mRNA aus den Proben mit dem NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, 2023) isoliert.

Aus der isolierten mRNA wurde die NGS-Library mit dem xGen™ RNA Lib Prep 16rxn von Integrated DNA Technologies (IDT, 2022) erstellt. Die NGS-Libraries wurden mittels Qubit quantifiziert und entsprechend dem Illumina-Protokoll NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Zyklen) gepoolt und denaturiert. Anschliessend wurde der NGS-Run auf dem Illumina NextSeq 550 gestartet.

### Qualitätskontrolle, Read cleaning und Transkriptom assembly

Die Rohdaten wurden mit verschiedenen, in die webbasierte Plattform useGalaxy.eu integrierten, Tools verarbeitet (Afgan et al., 2022). Für die Qualitätskontrolle wurden FastQC v0.74+galaxy0 (Andrews, 2023) und MultiQC v1.11+galaxy1 (Ewels et al., 2016) verwendet. *Read Trimming* wurde mit Trimmomatic v0.38.1 (Bolger et al., 2014) im *Paired-End*-Modus durchgeführt, Adaptersequenzen wurden mit ILLUMINACLIP abgeschnitten und *Reads* mit einem mittleren Phred-*Qualityscore* von weniger als 25 über vier Basen wurden mit SLIDINGWINDOW abgeschnitten, *Reads* kürzer als 50 Basen wurden entfernt.

Das Referenz-Transkriptom wurde mit dem Tool Trinity v2.15.1+galaxy1 (Grabherr et al., 2011) auf der Basis von Bachflohkrebsen aus den ARA-Expositionsversuchen von 3 Schweizer Mittelstandstandorten aus dem Jahr 2022 assembliert. Das Transkriptom wurde noch nicht annotiert.

### Read-Zählung und differentielle Expressionsanalyse

Die für die differentielle Expressionsanalyse verwendeten Reads wurden mit Trimmomatic 0.39+galaxy0 (Bolger et al., 2014) im *Paired-End*-Modus getrimmt, Adaptersequenzen wurden mit ILLUMINACLIP abgeschnitten und Reads mit einer durchschnittlichen Qualität von weniger als 20 über vier Basen wurden mit SLIDINGWINDOW abgeschnitten.

Mit dem Tool *align reads and estimate abundance* (Grabherr et al., 2011) wurden alle *Reads* jeder Probe den im Transkriptom definierten Transkripten zugeordnet und die Anzahl der zugeordneten *Reads* pro Transkript gezählt. Für diese Zählung der *Reads* pro Transkript wurde die Methode *Salmon* verwendet.

Die differentielle Expression von jeweils sechs Proben der Downstream-Individuen wurde mit 6 Proben der Upstream-Individuen verglichen. Die Analyse erfolgte mit DESeq2 (Love et al., 2014). Für jede Bedingung wurden die sechs Proben für die Zählung der Transkripte gepoolt. Um nur signifikante Ergebnisse anzuzeigen, wurden alle Transkripte mit einem p-Wert von mehr als 0.01 oder einer log2-fache Änderung zwischen -2 und +2 herausgefiltert.

Um die Veränderung von gruppierten ausgewählten biologischen Prozessen zu evaluieren (z.B. Signaltransduktion, Zell-Kommunikation, Signalgebung) wurde eine GoEnrichment-Analyse angewendet. Das GO Enrichment wurde in R Version 4.3.2 (R Core Team, 2023) mit dem R-Package TopGo v 2.54.0 (Alexa and Rahnenfuehrer, 2022) durchgeführt.

## Oligochaeten-Index

Die Oligochaeten-Taxa werden in verschiedene funktionelle Merkmale (*functional traits*, FTR) eingeteilt. FTR1, zu dem unterirdisch lebende oder stygophile Arten/Taxa gehören, ist ein Indikator für die Exfiltration von Grundwasser, während FTR2, FTRi, FTR3 und FTR4 jeweils intolante, mässig resistente, resistente und sehr resistente Taxa gegenüber Verschmutzung umfassen. Die Funktionsweise eines Fließgewässers kann als Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen dem Eintrag chemischer Stoffe in die poröse Matrix und der Dynamik des vertikalen hydrologischen Austauschs definiert werden. Die Berechnung des ökologischen Potenzials basiert auf den prozentualen Anteilen von FTR1, FTR2, FTR3 und FTR4 und ermöglicht es, den Grad der Veränderung der Funktionsfähigkeit eines Fließgewässers - von erhalten bis stark verändert - zu bestimmen (Vivien and Ferrari, 2023).

## Untersuchung von Antibiotikaresistenzen: Nachweis und Quantifizierung von mikrobieller Kontamination und Indikatoren für Antibiotikaresistenz

Diese Untersuchungen wurden an der Eawag durchgeführt. Die Arbeiten umfassten die Extraktion von DNA aus Wasserproben, und die Quantifizierung von Resistenzgenen (relative und absolute Häufigkeit) in diesen Extrakten. Es wurde eine Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft (an allen Proben) und des Metagenoms und des Resistoms (an ausgewählten Proben) durchgeführt. Des Weiteren wurden die Gesamtzellzahl, die Zahl der kultivierbaren Zellen und die Zahl der kultivierbaren antibiotikaresistenten Zellen bestimmt. Das Vorgehen entspricht weitestgehend der in Lee et al. (2021) beschriebenen Methodik.

### Kultivierbare antibiotikaresistente Bakterien (ARB)

Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen wurden auf der Grundlage der veröffentlichten EU-CAST-Leitlinien ausgewählt, wie in einer früheren Veröffentlichung von Czekalski et al. (2012) beschrieben. Negativkontrollen wurden nur auf R2A-Agar plattiert (ausgestrichen). Allen Platten wurde das Antimykotikum Pimaricin (50 mg/L) zugesetzt, um Pilzkontaminationen zu unterdrücken. Von den Negativkontrollen wurden drei verschiedene Verdünnungen (10, 100 und 1'000) ausplattiert. Das Ausplattieren auf die antibiotischen Medien erfolgte in 10-facher Verdünnung, sowie in 10- und 100-facher Konzentration. Von allen Proben wurden 10 mL mit einem Filter ausplattiert. Dafür wurden jeweils 10 mL bzw. 100 mL (für die Konzentrierung zum Ausplattieren auf selektive Medien) der Proben durch EZ-Pak(R) gemischte Celluloseester-Membranfilter mit einer Porengrösse von 0.22 µm und einem Durchmesser von 47 mm (Millipore, USA) filtriert. Die Platten wurden für 72 h bei 37 °C inkubiert. Bis zur Auszählung mit dem Scan (R) 100 Colony Counter (Interscience, Frankreich) wurden die Platten für 48 h im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Verdünnung und Filtration der Proben, die Inkubation und die Auswertung erfolgte nach veröffentlichten Protokollen (Lee et al., 2021). Diese zusätzliche Methode wurde nur mit Wasserproben aus der Kampagne Nr. 3 durchgeführt.

### Filtration

Jede Wasserprobe wurde durch mindestens zwei Express PLUS PES Membranfilter mit einer Porengrösse von 0.2 µm und einem Durchmesser von 47 mm (Millipore, USA) filtriert. Der grösste Teil der Probe DS1 aus der ersten Kampagne ging bei der Handhabung verloren. Das Filtrationsvolumen der Replikatfilter, die für die weiteren molekularen Analysen verwendet wurden, hing von der Trübung der Wasserproben ab und ist in Tab. 19 aufgeführt.



**Tab. 19: Filtrierte Wassermenge für jede Probe innerhalb jeder Kampagne.** US = Dünnern oberhalb A-RA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern un-terhalb ARA-Ablauf

| Messstelle | Filtriertes Volumen (mL) |                |                |
|------------|--------------------------|----------------|----------------|
|            | Kampagne No. 1           | Kampagne No. 2 | Kampagne No. 3 |
| US         | 1'000                    | 1'500          | 2'600          |
| EFF        | 1'700                    | 1'000          | 765            |
| DS1        | 850                      | 1'500          | 1'300          |
| DS2        | 1'000                    | 1'500          | 1'600          |

## DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den Filtern mit dem DNeasy Power Water Kit (Qiagen, Deutschland) nach dem Extraktionsprotokoll des Herstellers extrahiert. Die extrahierte DNA wurde mit dem Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, USA) und den beiden Assays Qubit™ 1x dsDNA broad range and high sensitivity (Invitrogen, USA) quantifiziert. Zusätzlich wurden Messungen mit dem NanoDrop One Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt, um die Reinheit der extrahierten DNA zu bewerten. Leerproben wurden durch Extraktionen ohne Probenmaterial gewonnen und bestätigten, dass sowohl die verwendeten Membranfilter als auch die Extraktionsreagenzien keine DNA-Kontamination aufwiesen.

## Bestimmung der Häufigkeit von Markergenen für Antibiotikaresistenz mit quantitativer PCR (qPCR)

Die Häufigkeit von insgesamt acht Indikatorgenen für anthropogene Antibiotika-Resistenzgen (ARG)-Einträge (*sul1*, *sul2*, *ermB*, *tetM*, *tetW*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *qnrA* und das Integron-Integrase-Klasse-1-Gen *int1*) wurde mittels qPCR bestimmt. Zusätzlich wurde eine qPCR für das Housekeeping-Gen 16s rRNA als Mass für die Gesamtzahl der in jeder Probe vorhandenen Bakterien durchgeführt. Informationen zu den verwendeten Primer-Paaren und Fluoreszenzsonden sind in Tab. 20 aufgeführt.

Alle qPCR-Tests wurden in dreifacher technischer Ausführung an jedem Extrakt, den Verdünnungsreihen der Standards ( $5 \times 10^7$  bis 50 Kopien / Reaktion) und den Negativkontrollen durchgeführt (*No-template*-Kontrolle: AE-Puffer; PCR-Kontrolle: nur PCR-Reagenzien ohne Zugabe von Probe und Extraktions-Leerproben: siehe oben). Für die Standardkurven wurde Plasmid-DNA mit klonierten Inserts der Zielgene verwendet, die das jeweilige Ziel-ARG enthalten (Tab. 23).

Die SYBR Green (*ermB*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* und *qnrA*) und Taq Man Assays (*sul1*, *sul2*, *tetM*, *tetW*, Integron Integrase Klasse 1 Gen *int1* und 16s rRNA gene) wurden mit dem LightCycler® 480 SYBR® Green | Master + H<sub>2</sub>O und LightCycler® 480 Probes Master + H<sub>2</sub>O von Roche (CH) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen für beide Assaytypen betrug 10 µL. Für den SYBR Green Assay setzt sich die Reaktion wie folgt zusammen: 5 µL 1X SYBR Green Master mix, 2 µL DNA-Template (10-, 100- und 1'000-fache Verdünnung der Proben), Forward und Reverse Primer (gemäss Tab. 20). Die TaqMan-Reaktionen enthielten: 5 µL 1X Probes Master Mix, 2 µL DNA-Template (10, 100 und 1'000-fache Verdünnung der Proben), Forward und Reverse Primer (gemäss Tab. 20), sowie die Fluoreszenzsonde (gemäss Tab. 21). Das restliche Volumen wurde für beide Reaktionen mittels qPCR H<sub>2</sub>O von Roche auf 10 µL aufgefüllt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 22 zusammengestellt.

Die Datenanalyse und Visualisierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Czekalski et al., 2012; Czekalski et al., 2014).

**Tab. 20: Auflistung der Basensequenzen der verwendeten Primer und der Produktlänge [bp] (Länge des Amplifikates zwischen dem Forward- und dem Reverse-Primer in Basenpaaren), sowie die beschreibende Literatur.**

| Name                | Gen                     | Resistenz                            | Assay Typ | Primer Sequenz (5'-3')       | Länge (bp) | Literatur                                     |
|---------------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------|------------------------------|------------|-----------------------------------------------|
| Bact 349F (B-3)     | 16S                     | Bakterielles Marker-Gen              | TaqMan    | AGGCAGCAGTDRGGAAT            | 457        | Takai and Horikoshi, 2000                     |
| Bact 806R (B-4)     | 16S                     | Bakterielles Marker-Gen              | TaqMan    | GGACTACYVGGGTATCTAAT         | 457        | Takai and Horikoshi, 2000                     |
| Int11-LC1 (R-35)    | Int11                   | Integron Integrase Klasse 1          | TaqMan    | GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG   | 196        | O. Barraud et al., 2010                       |
| Int11-LC5 (R-36)    | Int11                   | Integron Integrase Klasse 1          | TaqMan    | GAT CGG TCG AAT GCG TGT      | 196        | O. Barraud et al., 2010                       |
| qSUL653f (R-10)     | sul1                    | Sulfonamid                           | TaqMan    | CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG         | 67         | Heuer and Smalla, 2007                        |
| qSUL719 (R-11)      | sul1                    | Sulfonamid                           | TaqMan    | TTGCCGATCGCGTGAAGT           | 67         | Heuer and Smalla, 2007                        |
| tetW-F (R-13)       | tetW                    | Tetrazyklin                          | TaqMan    | CGGCAGCGCAAAGAGAAC           | 58         | Walsh et al., 2011                            |
| tetW-R (R-14)       | tetW                    | Tetrazyklin                          | TaqMan    | CGGGTCAGTATCCGCAAGTT         | 58         | Walsh et al., 2011                            |
| tetMf (154)         | tetM                    | Tetrazyklin                          | TaqMan    | GGTTTCTCTGGATACTTAAAT-CAATCR | 58         | Walsh et al., 2011                            |
| tetMr (155)         | tetM                    | Tetrazyklin                          | TaqMan    | CCAACCATAYAATCCTTGTCRC       | 58         | Walsh et al., 2011                            |
| erm (B)-91f (R-28)  | ermB                    | Erythromycin                         | SYBR Gr.  | GATACCGTTTACGAAATTGG         | 364        | Chen et al., 2007                             |
| erm (B)-454r (R-29) | ermB                    | Erythromycin                         | SYBR Gr.  | GAATCGAGACTTGAGTGTGC         | 364        | Chen et al., 2007                             |
| blaCTX-F (R-18)     | bla <sub>CTX</sub> -M-1 | Extended spectrum $\beta$ -Laktamase | SYBR Gr.  | CTATGGCACCACCAACGATA         | 103        | Marti et al., 2013                            |
| blaCTX-R (R-19)     | bla <sub>CTX</sub> -M-1 | Extended spectrum $\beta$ -Laktamase | SYBR Gr.  | ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT         | 103        | Marti et al., 2013                            |
| qnrA32F (R1)        | qnrA                    | Chinolon                             | SYBR Gr.  | AGGATTTCTCACGCCAGGATT        | 124        | Cattoir et al., 2008<br>Cummings et al., 2011 |
| qnrA 155R (R2)      | qnrA                    | Chinolon                             | SYBR Gr.  | CCGCTTTCAATGAAACTGCA         | 124        | Cattoir et al., 2008<br>Cummings et al., 2011 |
| qSUL2_595f (R-53)   | sul2                    | Sulfonamide                          | TaqMan    | CGGCTGCGCTTCGATT             | 60         | Heuer et al., 2008                            |
| qSUL2_654r (R-54)   | sul2                    | Sulfonamide                          | TaqMan    | CGCGCGCAGAAAGGATT            | 60         | Heuer et al., 2008                            |

**Tab. 21: Fluoreszenzsonden, welche in Kombination mit den designten Primerpaaren aus Tab. 20 für den TaqMan Assay eingesetzt wurden.**

| Gen   | Name                  | Sonden-Sequenz (5'-3') inkl. Modifikationen |
|-------|-----------------------|---------------------------------------------|
| 16S   | Bact 516_FAM (B-5)    | FAM-TGCCAGCAGCCGCGTAATACRDAG-BHQ-1          |
| int11 | Int11-FAM (R-37)      | FAM-ATTCCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT-BHQ-1         |
| sul1  | tpSUL1 (R-12)         | FAM-CAGCGAGCCTTGCGGCGG-BHQ-1                |
| tetW  | tetW-FAM (R-15)       | FAM-CTGGACGCTCTTACG-BHQ-1 MGB               |
| tetM  | JOE-tetMs-BHQ-1       | FAM-ATGCAGTTATGGARGGGATACGCT ATGGY-BHQ-1    |
| sul2  | tpSUL2_614_FAM (R-48) | FAM-CGGTGCTTCTGTCTGTTTCGCGC-BHQ-1           |



**Tab. 22: Auflistung der Konzentrationen der Primer und Fluoreszenzsonden (Oligonukleotide), der Konditionen für die initiale Denaturierung, des Temperaturprogramms und der Anzahl der Zyklen.**

| Name Primer / Probe   | Konzentration Oligonukleotide | Init. Denaturierung | Temperaturprogramm          | Anzahl Zyklen |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------|
| Bact 349F (B-3)       | 0.9                           | 95 °C 10:00 min     | 95 °C 00:40                 | 45            |
| Bact 806R (B-4)       | 0.9                           |                     | 53 °C 00:40                 |               |
| Bact 516_FAM (B-5)    | 0.3                           |                     | 72 °C 01:00                 |               |
| Intl1-LC1 (R-35)      | 0.4                           |                     | 95 °C 00:30                 | 45            |
| Intl1-LC5 (R-36)      | 0.4                           |                     | 60 °C 01:00                 |               |
| Intl1-FAM (R-37)      | 0.2                           |                     |                             |               |
| qSUL653f (R-10)       | 0.25                          |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| qSUL719 (R-11)        | 0.25                          |                     | 60 °C 01:00                 |               |
| tpSUL1 (R-12)         | 0.25                          |                     |                             |               |
| tetW-F (R-13)         | 0.25                          |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| tetW-R (R-14)         | 0.25                          |                     | 60 °C 01:00                 |               |
| tetW-FAM (R-15)       | 0.1                           |                     |                             |               |
| tetMf (154)           | 0.45                          |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| tetMr (155)           | 0.45                          |                     | 60 °C 01:00                 |               |
| JOE-tetMs-BHQ-1       | 0.1                           |                     |                             |               |
| erm (B)-91f (R-28)    | 0.35                          |                     | 95 °C 00:30                 | 50            |
| erm (B)-454r (R-29)   | 0.35                          |                     | 63 - 58 °C (1 °C/sec) 00:30 |               |
|                       |                               |                     | 72 °C 00:30                 |               |
| blaCTX-F (R-18)       | 0.4                           |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| blaCTX-R (R-19)       | 0.4                           |                     | 60 °C 00:25                 |               |
| qnrA32F (R1)          | 0.5                           |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| qnrA 155R (R2)        | 0.5                           |                     | 57 °C 00:25                 |               |
|                       |                               |                     | 72 °C 00:30                 |               |
| qSUL2_595f (R-53)     | 0.25                          |                     | 95 °C 00:15                 | 45            |
| qSUL2_654r (R-54)     | 0.25                          |                     | 53 °C 00:15                 |               |
| tpSUL2_614_FAM (R-48) | 0.25                          |                     |                             |               |

**Tab. 23: Plasmide und Inserts der qPCR-Quantifizierungsstandards**

| Gen                          | Insert Grösse (bp) | Vektor / Zellen                   | Klonierung Primer (wenn abweichend von PCR-Primer) | Primer Sequenz (5'-3')                       |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>16S</b>                   | 1465               | pGEMT easy JM109                  | 27f<br>1492r                                       | AGAGTTTGATCMTGGCT-CAG<br>GGCTACCTTGTTACGACTT |
| <i>int1</i>                  | 196                | pGEMT easy JM109                  |                                                    |                                              |
| <i>sul1</i>                  | 965                | pGEMT easy JM109                  | R388sul1F (R20)<br>R388sul1R (R21)                 | TTCATGGGCAAAAGCTT-GATG GGCCGGAAGGT-GAATGCTA  |
| <i>tetW</i>                  | 58                 | pGEMT easy JM109                  |                                                    |                                              |
| <i>tetM</i>                  | 58                 | pGEMT easy(3015bp) JM109          |                                                    |                                              |
| <i>ermB</i>                  | 364                | pGEMT easy JM109                  |                                                    |                                              |
| <i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i> | 103                | pGEMT easy JM109                  |                                                    |                                              |
| <i>qnrA</i>                  |                    |                                   |                                                    |                                              |
| <i>sul2</i>                  | 60                 | PCR2.1 vector (3.9kb) Top10 cells |                                                    |                                              |

### 16S rRNA Genamplikon-Sequenzierung

Die 16S-Amplikons wurden mittels AMPure XP Beads (Beckman, USA) aus dem PCR-Reaktionsmix abgetrennt. Dazu wurden die Beads zwei Mal mit 70 % EtOH gewaschen, bevor die Amplikons in 10 µL 10mM Tris-HCl pH 8.0 für 2 min inkubiert und letztendlich eluiert wurden. Nach der Konzentrationsmessung mittels NanoDrop One Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) wurden die zwölf mit Barcodes markierten DNA-Extrakte der Proben in äquimolaren Verhältnissen gepoolt. Die Sequenzierung wurde auf der GridION Plattform (Oxford Nanopore Technologies, UK) mittels MinION flow cell der Version R9.4.1 für ca. 48 h durchgeführt.

Die Anzahl der generierten Reads nach ca. 48 h ist in Tab. 24 aufgeführt.

**Tab. 24: Auflistung der sequenzierten Reads pro Probe auf der GridION Plattform (Oxford Nanopore Technologies, UK) mit R9.4.1 MinION flow cells nach ca. 48 h sequenziert.**

US = Dünnern oberhalb ARA-Ablauf, EFF = ARA-Ablauf, DS1 und DS2 = Dünnern unterhalb ARA-Ablauf

| Kampagne | Messstelle | Anzahl Reads |
|----------|------------|--------------|
| No. 1    | US         | 1'648'000    |
| No. 1    | EFF        | 1'600'000    |
| No. 1    | DS1        | >4'000       |
| No. 1    | DS2        | 912'000      |
| No. 2    | US         | 944'000      |
| No. 2    | EFF        | 1'484'000    |
| No. 2    | DS1        | 1'592'000    |
| No. 2    | DS2        | 1'176'000    |
| No. 3    | US         | 1'016'000    |
| No. 3    | EFF        | 900'000      |
| No. 3    | DS1        | 1'136'000    |
| No. 3    | DS2        | 1'500'000    |



### **Metagenomische Charakterisierung des Resistoms an ausgewählten Proben**

Die Analyse folgt weitgehend dem in Dai et al. (2022) beschriebenen Vorgehen. Sequenziert wurden die Proben der Kampagne 2. Die Library für die metagenomische Sequenzierung wurde mit dem Ligation sequencing DNA V14 (SQK-LSK114) Kit vorbereitet. Die R10.4.1 MinION flow cells (Oxford Nanopore Technologies, UK) wurden mit 75 µL der vorbereiteten Library beladen. Die Sequenzierung auf der GridION Plattform wurde für ca. 72 h laufen gelassen, bis keine neuen Reads mehr produziert wurden.

Die Datenanalyse wurde cloud-basiert mit dem Fastq Antimicrobial Resistance Workflow der Epi2Me Software (Oxford Nanopore, <https://nanoporetech.com/resource-centre/epi2me-arma-workflow-real-time-antimicrobial-resistance-profiling>) durchgeführt. Die Resultate wurden dem Software-generierten Report entnommen und extern (Excel, R) weiter analysiert. Gene mit hoher Übereinstimmung (durchschnitt > 80 %) mit den Genen der CARD-Datenbank wurden separiert («HiFi80» Workbooks im Datensatz) und in R weiterbearbeitet (Desambiguierung, Zusammenfügen, Sortieren nach durchschnittlicher Zahl der Übereinstimmung in allen Proben) und ausgewertet.

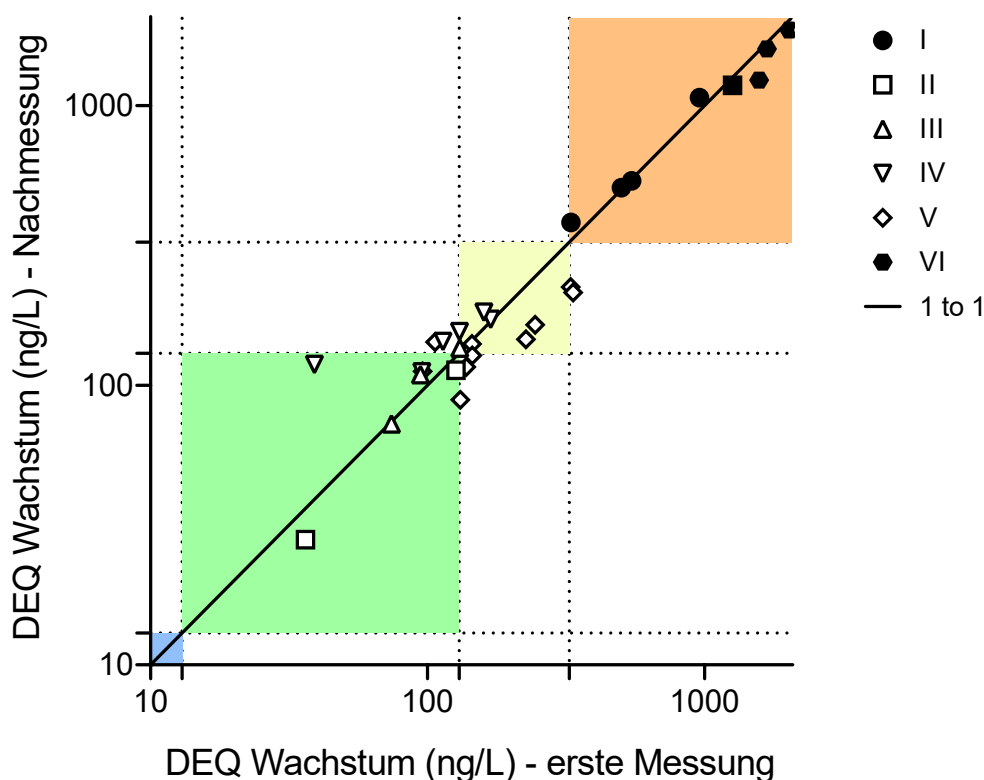
## Anhang 3 Ergebnisse: Ergänzende Informationen

### Kombinierter Algentest

**Tab. 25: Ergebnisse des kombinierten Algentests (ungerundet)**

PSII-DEQ<sub>bio</sub> = Diuron-Äquivalenzkonzentration für PSII-Hemmung, Wachstums-DEQ<sub>bio</sub> = Diuron-Äquivalenzkonzentration für Wachstums-Hemmung.

| Probenahmestelle      | Abk.  | PSII<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>1 | PSII<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>2 | PSII<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>Mittelwert | Wachstums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>1 | Wachstums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>2 | Wachstums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>Mittelwert |
|-----------------------|-------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| ARA Falkenstein       | EFF   | 281.58                                    | 186.94                                    | 234.26                                             | 1261.64                                         | 1181.74                                         | 1221.69                                                  |
| Dünnern oberhalb ARA  | US    | 5.55                                      | 4.02                                      | 4.79                                               | 36.28                                           | 28.02                                           | 32.15                                                    |
| Dünnern unterhalb ARA | DS1   | 21.49                                     | 16.27                                     | 18.88                                              | 126.67                                          | 113.11                                          | 119.89                                                   |
| Field Blank           | FB    | _*                                        | _*                                        | _*                                                 | _**                                             | _**                                             | _**                                                      |
| SPE Blank             | Blank | _*                                        | _*                                        | _*                                                 | _**                                             | _**                                             | _**                                                      |
|                       |       | * = <10% Effekt                           |                                           |                                                    | ** = <20% Effekt                                |                                                 |                                                          |



**Abb. 25: Kombiniertes Algentest: Doppelte Bestimmung des Wachstums-DEQ in 29 Proben aus 6 verschiedenen Projekten (Projekt II = Kanton Solothurn ARA Falkenstein)**

Farbige Kästchen: Wasserqualitätsklassen (blau: sehr gut, grün: gut, gelb: mässig, orange: unbefriedigend).  $r$ -Wert Oberflächengewässer = 0.83 ( $n=21$ ; weisse Symbole);  $r$ -Wert alle Proben = 0.99 ( $n=29$ ; 8 Abwasserproben sind schwarz gekennzeichnet). Vor allem die hohen Werte streuen eng um die 1 zu 1 Linie, es gibt keinen systematischeren Fehler. Wenige Proben werden nicht der gleichen Beurteilungsklasse zugeordnet.



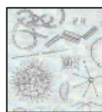
## ER $\alpha$ -CALUX®

**Tab. 26: Ergebnisse des ER $\alpha$ -CALUX®**

EEQ = Estradiol-Äquivalenzkonzentration

| Probenahmestelle      | Abk.  | EEQ (ng/L) 1      | EEQ (ng/L) 2 | EEQ (ng/L)<br>Mittelwert |
|-----------------------|-------|-------------------|--------------|--------------------------|
| ARA Falkenstein       | EFF   | 0.39              | 0.43         | 0.41                     |
| Dünnern oberhalb ARA  | US    | 0.20              | 0.16         | 0.18                     |
| Dünnern unterhalb ARA | DS1   | 0.20              | 0.17         | 0.18                     |
| Field Blank           | FB    | -*                | -*           | -*                       |
| SPE Blank             | Blank | -*                | -*           | -*                       |
|                       |       | * = < 10 % Effekt |              |                          |

## Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen (Kurzbericht)



**Soluval Santiago**

Analyses environnementales

Rue Edouard-Dubied 2

Tél: 032 863 43 60

CH - 2108 COUVET

e-mail: ssantiago@bluewin.ch

*Bioassays of toxicity*

*Summary of results*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------|--|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--|----------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------|--|----------------|--|--|--|--|--|
| <b>Identification</b><br>Origin : Solothurn 2023 - ARA + receiving surface waters<br>Sample type : ARA Falkenstein ; Oberhalb + Unterhalb surface waters<br>Sampling : <input type="checkbox"/> instantaneous <input checked="" type="checkbox"/> composite<br>Date : ( 22 - 08 - 2023 )<br>Sample nr : A. ARA Auslauf<br>B. Oberhalb<br>C. Unterhalb                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  | Recipient : Mrs. Cornelia KIENLE<br>Society : Oekotoxzentrum<br>Address : CH - 8600 Dübendorf<br>Analyse(s) plan : Ceriodaphnia<br>Reception date : 14 - 11 - 2023<br>Registration nr : 8867<br>Responsible : S. Santiago |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| Remarks : Samples stored in OZ freezer on 24-08-2023; reduced number of replicates due to small volumes of samples.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| <b>Ceriodaphnia dubia</b><br>(ISO 20665 ; AFNOR T90-376 ;<br>Environment Canada SPE 1/RW21)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |                         |  |                            | Organism : Ceriodaphnia dubia (IFAF-Cemagref)<br>PP beakers (25 ml); 25±1°C; 0,4±0,1 Klux (photoper.16h:8h)<br>Dilution : medium AFNOR T90-376 modified; food A, Y, xt.T |                                                              |  |                            |  | Date : 14-11-2023<br>Carried out by : SS<br>Controlled by :                                                                                                                                                               |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| Sample nr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  | Concentration           |  | Mortality at 7 days        |                                                                                                                                                                          | Chronic toxicity : inhibition of growth population at 7 days |  |                            |  | Growth (%)                                                                                                                                                                                                                |  | Inhibition (%)         |  |                |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          | Number of offspring ; ♀ = dead mother ; ♂ = + unhatched egg  |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          | Replicates                                                   |  |                            |  | Σ offs.                                                                                                                                                                                                                   |  | Average                |  |                |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  | Std. dev.                                                                                                                                                                                                                 |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| Controls<br>(synthetic medium =<br>dilution medium)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | 0 / 20<br>= 0 %         |  | 17<br>21<br>14<br>19<br>15 |                                                                                                                                                                          | 20<br>16<br>15<br>17<br>19                                   |  | 17<br>19<br>21<br>17<br>15 |  | 351                                                                                                                                                                                                                       |  | 17.6<br>2.1<br>= 12.2% |  | 100%<br>0%     |  |  |  |  |  |
| A. ARA<br>Falkenstein (SO)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | 90.0%<br>0 / 8<br>= 0 % |  | 15<br>9<br>11              |                                                                                                                                                                          | 18<br>11<br>17                                               |  | 9<br>15                    |  | 105                                                                                                                                                                                                                       |  | 13.1<br>3.6            |  | 74.8%<br>25.2% |  |  |  |  |  |
| B. Oberhalb                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  | 90.0%<br>0 / 9<br>= 0 % |  | 15<br>8<br>13              |                                                                                                                                                                          | 11<br>13<br>9                                                |  | 13<br>16<br>12             |  | 110                                                                                                                                                                                                                       |  | 12.2<br>2.6            |  | 69.6%<br>30.4% |  |  |  |  |  |
| C. Unterhalb                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  | 90.0%<br>0 / 9<br>= 0 % |  | 14<br>13<br>12             |                                                                                                                                                                          | 16<br>12<br>14                                               |  | 12<br>14<br>17             |  | 124                                                                                                                                                                                                                       |  | 13.8<br>1.8            |  | 78.5%<br>21.5% |  |  |  |  |  |
| Remarks : pH : A = 7,8 ; B = 8,1 ; C = 8,3 ; control = 7,7 ;<br>electrical conductivity [µS/cm] : A = 978 ; B = 372 ; C = 460 ; control = 305 µS/cm.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| <b>Conclusions - Comments</b><br><div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>SO - ARA + River</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>Valid test <input checked="" type="checkbox"/> yes - <input type="checkbox"/> no</p> <p>Controls (at 8 days) :<br/>                     Mortality of the mothers ≤ 20% <input checked="" type="checkbox"/><br/>                     Proportion of males ≤ 20% <input checked="" type="checkbox"/><br/>                     Min. 3 broods for ≥ 60% of alive mothers <input checked="" type="checkbox"/><br/>                     Average nb. offspring born per live mother ≥ 15 <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>A - ARA, B - Oberhalb and C - Unterhalb :<br/>                     • All samples Toxic<br/>                     none effect of mortality ;<br/>                     significant inhibition on reproduction at 7 days when compared to controls</p> <p>MSD = Minimum statistical difference<br/>                     (as % of inhibition over control) = 12,9 %</p> </div> </div> |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |
| Couvet, 27-11-2023<br>S. Santiago                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |                         |  |                            |                                                                                                                                                                          |                                                              |  |                            |  |                                                                                                                                                                                                                           |  |                        |  |                |  |  |  |  |  |



## Toxizität und Genexpression in Fischzelllinien

**Tab. 27: Zellvitalität nach Exposition mit den Wasserproben (Zellen + Wasserprobe ARA), den 100%igen Wasserproben plus Positivkontrolle (Zellen + Wasserprobe ARA + 3,4-DCA) und der Positivkontrolle im Zellexpositionsmedium L-15/ex**

| A1: Zellen + Wasserprobe Oberhalb ARA  |                  |                  |                  | A2: Zellen + Wasserprobe Oberhalb ARA + 3,4-DCA  |               |               |               |
|----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                                        | Alamar Blue      | CFDA-AM          | Neutral Red      |                                                  | Alamar Blue   | CFDA-AM       | Neutral Red   |
| Zellvitalität (%)                      | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. > 100 | EC <sub>50</sub> (mg/L)                          | 24.44         | 39.24         | 32.14         |
|                                        |                  |                  |                  | 95% CI (mg/L)                                    | 19.97 - 29.90 | 33.97 - 45.32 | 26.54 - 38.92 |
| B1: Zellen + Wasserprobe Ablauf ARA    |                  |                  |                  | B2: Zellen + Wasserprobe Ablauf ARA + 3,4-DCA    |               |               |               |
|                                        | Alamar Blue      | CFDA-AM          | Neutral Red      |                                                  | Alamar Blue   | CFDA-AM       | Neutral Red   |
| Zellvitalität (%)                      | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. ≥ 94  | EC <sub>50</sub> (mg/L)                          | 29.92         | 48.46         | 35.86         |
|                                        |                  |                  |                  | 95% CI (mg/L)                                    | 27.12 - 33.01 | 27.12 - 33.01 | 27.12 - 33.01 |
| C1: Zellen + Wasserprobe Unterhalb ARA |                  |                  |                  | C2: Zellen + Wasserprobe Unterhalb ARA + 3,4-DCA |               |               |               |
|                                        | Alamar Blue      | CFDA-AM          | Neutral Red      |                                                  | Alamar Blue   | CFDA-AM       | Neutral Red   |
| Zellvitalität (%)                      | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. > 100 | Alle Konz. ≥ 93  | EC <sub>50</sub> (mg/L)                          | 22.9          | 34.16         | 21.19         |
|                                        |                  |                  |                  | 95% CI (mg/L)                                    | 19.31 - 27.16 | 30.06 - 38.81 | 17.91 - 25.06 |
|                                        |                  |                  |                  | D: Zellen + Positivkontrolle 3,4-DCA in L-15/ex  |               |               |               |
|                                        |                  |                  |                  |                                                  | Alamar Blue   | CFDA-AM       | Neutral Red   |
|                                        |                  |                  |                  | EC <sub>50</sub> (mg/L)                          | 32.9          | ~ 53.39*      | ~ 48.62*      |
|                                        |                  |                  |                  | 95% CI (mg/L)                                    | 29.53 - 36.67 | (sehr weit)   | (sehr weit)   |

\*Das Tilde-Zeichen in GraphPad zeigt an, dass der Wert "mehrdeutig" ist. "Mehrdeutig" ist ein von GraphPad geprägter Begriff zur Beschreibung einer Anpassung, die keine genaue Schätzung des Werts zulässt. Prism stellt "~" vor die Werte der besten Anpassung und meldet "sehr weit" für die entsprechenden Konfidenzintervalle. Für weitere Informationen siehe auch [https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/reg\\_analysischeck\\_nonlin\\_ambiguous.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/reg_analysischeck_nonlin_ambiguous.htm).