



# Analyse von vier Wasserproben mit ökotoxikologischen Biotests (ER $\alpha$ -CALUX® und Grünalgentest)

## Kurzbericht

---

|                 |                                                                                                                        |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Auftraggeber:   | Kanton Aargau, Department Bau, Verkehr, und Umwelt, Abteilung für Umwelt, Entfelderstrasse 22, 5001 Aarau              |
| Kontaktperson:  | Jennifer Schollee, jennifer.schollee@ag.ch                                                                             |
| Erstellt durch: | Cornelia Kienle, Nadine Bramaz, Andrea Schifferli, Etienne Vermeirssen<br>(Kontakt: cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch) |
| Erstellt am:    | 08.01.2024                                                                                                             |

---

## 1 Einleitung

Im Kanton Aargau wurde 2023 das Vollzugsmonitoring des Kantons Aargau im Einzugsgebiet der Surb durchgeführt. Im Einzugsgebiet befinden sich zwei Abwasserreinigungsanlagen (ARA), die ARA Oberes Surbtal und die ARA Surbtal - Endingen. Es ist geplant, dass eine der beiden Anlagen in den nächsten fünf Jahren mit einer weitergehenden Reinigungsstufe ausgebaut wird, die zweite Anlage wird aufgehoben. Neben den beiden ARA und den Siedlungen gibt es weitere Einflüsse wie die Landwirtschaft. Das aktuelle Monitoring soll die Situation vor dem Ausbau erfassen und einen Überblick über die wichtigsten Eintragsquellen geben. Die Untersuchungsergebnisse sollen als Entscheidungsgrundlage für Massnahmen dienen. Diese sollen dort umgesetzt werden, wo sie am erfolgversprechendsten sind.

An fünf Messstellen im Einzugsgebiet wurden Mikroverunreinigungen in 14-Tages-Sammelproben gemessen. Zusätzlich wurden Proben für Nährstoffmessungen genommen und an ausgewählten Proben Biomarkermessungen in Fischzelllinien durchgeführt. Ergänzend zu diesen Messungen wurden Abwasserproben der beiden ARA mit zwei Biotests untersucht, die im Rahmen der Arbeiten zum Modulstufenkonzept im Grobbeurteilungskonzept vorgeschlagen wurden (Kienle et al. 2018): der ER $\alpha$ -CALUX® zur Erfassung östrogenen Effekte und der kombinierte Algentest zur Erfassung von Effekten auf die Photosynthese und das Wachstum einzelliger Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*). Die Ergebnisse der Biotestuntersuchungen werden im vorliegenden Bericht zusammengefasst.

In beiden Biotests wurden Abwasserproben untersucht, die im Zeitraum vom 29.06.-29.09.2023 genommen wurden. Es handelte sich um 24 h-Mischproben. Die Ergebnisse erlauben eine Aussage über die Belastung des Abwassers östrogen-wirksamen und algentoxischen Stoffen und deren Wirkung. Zu einem späteren Zeitpunkt können die Biotestergebnisse mit den Ergebnissen der chemischen Analytik verglichen werden. Dies ermöglicht Aussagen darüber, welche Stoffe für die Effekte verantwortlich sein könnten. Zudem kann über die Verdünnung des Abwassers im Gewässer die zu erwartende Belastung unterhalb der ARA berechnet werden, wie in Kienle et al. (2018) beschrieben.



## 2 Methoden und Beurteilungsansätze

### 2.1 Probenahme und Probentransport

Die Proben wurden durch von den Kläranlagenbetreibern mit der bestehenden Probenahmeinfrastruktur genommen. Es wurden 24 h-Mischproben an zwei ARA und zu zwei Zeitpunkten (am 26.06. und am 26.09.2023) genommen. Die Wasserproben wurden nach Probenahme bei 2 - 8 °C gelagert und gekühlt ans Oekotoxzentrum geliefert. Dort wurden sie eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Am Tag vor der Festphasenextraktion (SPE) wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln aufgetaut und am 07.11.2023 per SPE angereichert.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Proben.

**Tabelle 1 Messkampagnen, Probenahmedaten und Probenbezeichnungen.**

| Mess-kampagne | Probenahmedaten 2023 | Gewässer               | Proben-ID | Testdatum  |                        |
|---------------|----------------------|------------------------|-----------|------------|------------------------|
|               |                      |                        |           | ERα-CALUX® | Kombinierter Algentest |
| 1             | 26.06.               | ARA Surbtal - Endingen | AG_ASE_1  | 15.11.     | 07.12.                 |
|               | 26.06.               | ARA Oberes Surbtal     | AG_AOS_1  | 15.11.     | 07.12.                 |
| 2             | 26.09.               | ARA Surbtal - Endingen | AG_ASE_2  | 15.11.     | 07.12.                 |
|               | 26.09.               | ARA Oberes Surbtal     | AG_AOS_2  | 15.11.     | 07.12.                 |

### 2.2 Festphasenextraktion

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

Die Anreicherung der Proben erfolgte anhand einer Standardarbeitsanweisung (Ecotox Centre 2023): Je 500 mL der Umweltproben wurden mittels Strata XL-Kartuschen (Phenomenex) angereichert. Fünfhundert 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 500fach angereichert. Danach wurden die Extrakte bei -20 °C bis zur Analyse im Biotest gelagert.

### 2.3 Kombiniertes Algentest mit einzelligen Grünalgen zur Messung der Photosynthese- und Wachstumshemmung

#### 2.3.1 Testdurchführung

##### 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.

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 (Schreiber et al. 2007; Escher et al. 2008)). 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.

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

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

### Testorganismus

Der ER $\alpha$ -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 ER $\alpha$ -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 den Verfahren von ISO (ISO 19040-3) durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde das Östrogen 17 $\beta$ -Östradiol (E2) verwendet und DMSO als negative Lösungsmittelkontrolle. Die Probenextrakte wurden in DMSO überführt und um den Faktor 10 auf 5'000-fach weiter aufkonzentriert.

Von der Referenzsubstanz wurden neun Konzentrationen 17 $\beta$ -Östradiol ( $1.0 \times 10^{-9}$  M bis  $1.0 \times 10^{-13}$  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 er-



mittelten Luziferase-Aktivitäten ohne Einschränkung verwendet werden. Das Medium wurde anschliessend entfernt. Durch Zugabe von 30 µL Lysis-Puffer (mit Triton) wurden die Zellen lysiert und das Enzym Luciferase freigesetzt.

Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer gemessen (Infinite M Plex, Tecan, Schweiz) und als relative Lichteinheit (RLU) wiedergegeben.

## Datenauswertung

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

## 2.5 Bewertung der Wasserqualität in fünf Zustandsklassen

Die Beurteilung einer Belastung der Oberflächengewässer mit Herbiziden, welche die Photosynthese und/oder das Wachstum von Algen beeinträchtigen und von östrogen-wirksamen Stoffen kann anhand von effektbasierten Schwellenwerten erfolgen. Das sind Werte, unterhalb derer schädigende Auswirkungen auf Organismen (bezüglich des gemessenen Effekts) unwahrscheinlich sind. Aktuell liegen diese Werte für PSII-Hemmung bei 70 ng DEQ<sub>bio</sub>/L (Kienle et al. 2018; Escher 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)<sup>2</sup>.

In Kienle et al. (2018) wird eine Einteilung der Wasserqualität für PSII-hemmende und östrogen-wirksame Stoffe analog zum Modulstufenkonzept (Liechti et al. 1998; Baumann and Langhans 2010) anhand von fünf Beurteilungsklassen vorgeschlagen (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Vorschlag für eine Einteilung in fünf Zustandsklassen anhand der gemessenen Diuron-Äquivalenzkonzentrationen (DEQ)-Werte (ng/L) für Photosynthese- und Wachstumshemmung nach Kienle et al. (2018)<sup>3</sup>.**

| Beurteilung |                | PSII-Hemmung<br>Konzentration (ng/L) |         |     | Wachstums-<br>Hemmung<br>Konzentration (ng/L) |         |      | Östrogene Aktivität<br>Konzentration (ng/L) |         |      | Einhaltung Ziel-<br>vorgabe |
|-------------|----------------|--------------------------------------|---------|-----|-----------------------------------------------|---------|------|---------------------------------------------|---------|------|-----------------------------|
|             |                |                                      |         |     |                                               |         |      |                                             |         |      |                             |
|             | 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 < | 175 | 130                                           | ≤ DEQ < | 325  | 0.4                                         | ≤ EEQ < | 1    | Überschritten               |
|             | Unbefriedigend | 175                                  | ≤ DEQ < | 700 | 325                                           | ≤ DEQ < | 1300 | 1                                           | ≤ EEQ < | 4    |                             |
|             | Schlecht       |                                      | DEQ ≥   | 700 |                                               | DEQ ≥   | 1300 |                                             | EEQ ≥   | 4    |                             |

<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 and 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 ein wirkungsbasiertes Wasserqualitätskriterium auf etwa 0.07 ng/L reduzieren.

<sup>3</sup> Die Einteilung der mittleren Zustandsklasse (mässig) wurde inzwischen leicht angepasst, um die gleichen Klassengrößen wie bei der chemisch-analytischen Risikobewertung abzubilden (Götz et al. 2010). Da die bisherige Bewertung für den Kanton Aargau nach obigem Schema erfolgte, wurde es aus Gründen der Konsistenz auch für diese Studie so beibehalten.



## 2.6 Abflussdaten der ARA und der Surb während der Probenahme

Das Department Bau, Verkehr und Umwelt (Abteilung für Umwelt) des Kantons Aargau rapportierte folgende Abflüsse der ARA Surbtal – Endingen und Oberes Surbtal während der Probenahmen (Tabelle 3). Die Verdünnung des Abwassers war während beider Probenahmen vergleichbar.

**Tabelle 3: Abflüsse der ARA und der Surb (ungerundet) und errechnete Verdünnungsfaktoren für die Probenahme von 2023.**

Messung des ARA-Abflusses von 7.00 Uhr bis 7.00 Uhr zum Datum der jeweiligen Probenahme.

| Code     | Bezeichnung            | Datum in 2023 | ARA-Abfluss in 24 h (m <sup>3</sup> ) | ARA-Abfluss (m <sup>3</sup> /s) | Abfluss Surb vor ARA (m <sup>3</sup> /s) | Berechneter Abfluss Surb nach ARA (m <sup>3</sup> /s) | Abwasseranteil in der Surb nach ARA (%) nicht kumulativ | Verdünnungsfaktor |
|----------|------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------|
| AG_ASE_1 | ARA Surbtal - Endingen | 26.06.        | 1634 (Zufluss)                        | 0.01891 (Zufluss)               | 0.18 <sup>§</sup>                        | 0.20                                                  | 9.5                                                     | 10.6              |
| AG_AOS_1 | ARA Oberes Surbtal     | 26.06.        | 4066                                  | 0.081                           | 0.0794 <sup>*</sup>                      | 0.160                                                 | 50.6                                                    | 2.0               |
| AG_ASE_2 | ARA Surbtal - Endingen | 26.09.        | 1617 (Zufluss)                        | 0.01817 (Zufluss)               | 0.195 <sup>§</sup>                       | 0.21                                                  | 8.7                                                     | 11.6              |
| AG_AOS_2 | ARA Oberes Surbtal     | 26.09.        | 3795                                  | 0.075                           | 0.0835 <sup>*</sup>                      | 0.159                                                 | 47.2                                                    | 2.1               |

<sup>§</sup>Abflusstagesmittel FG\_0585, Surb – Niederweningen

<sup>\*</sup>Abflusstagesmittel FG\_0380, Surb – Lengnau



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kombiniertes Algentest

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

*Photosynthesehemmung nach 2 h:* Die DEQ<sub>bio</sub>-Werte für die Hemmung des Photosystems II lagen bei 134 und 36 ng/L im Abwasser der ARA Surbtal - Endingen und bei 296 und 78 ng/L im Abwasser der ARA Oberes Surbtal (Tabelle 4). Auffallend ist, dass die Werte in den Proben vom Juni 2023 deutlich höher sind als die Werte in den Proben vom September 2023.

**Tabelle 4: Photosystem II-Hemmung: Gemessener DEQ<sub>bio</sub>-Wert im kombinierten Algentest (Mittelwert aus zwei Durchführungen), sowie durch den Verdünnungsfaktor errechneter DEQ<sub>bio</sub> in der Surb. In der letzten Spalte ist der errechnete DEQ anhand des vorgeschlagenen effektbasierten Schwellenwertes (70 ng/L) in fünf Zustandsklassen eingeteilt.**

*Blau und grün = Einhaltung der Zielvorgabe, gelb = Zielvorgabe geringfügig überschritten. Beim errechneten DEQ wurde die potentielle Vorbelastung in der Surb nicht einbezogen.*

| Code     | Bezeichnung            | Datum Probenahme in 2023 | 2 h PS II-Hemmung DEQ (ng/L) | Verdünnungsfaktor | errechneter DEQ in der Surb nach ARA Einfluss | Vergleich mit vorgeschlagenem Qualitätskriterium 70 ng/L |
|----------|------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| AG_ASE_1 | ARA Surbtal - Endingen | 26.06.                   | 127                          | 10.6              | 12                                            | grün                                                     |
| AG_AOS_1 | ARA Oberes Surbtal     | 26.06.                   | 285                          | 2.0               | 143                                           | gelb                                                     |
| AG_ASE_2 | ARA Surbtal - Endingen | 26.09.                   | 34                           | 11.6              | 3                                             | blau                                                     |
| AG_AOS_2 | ARA Oberes Surbtal     | 26.09.                   | 72                           | 2.1               | 34                                            | grün                                                     |

Berechnet man aus den im Abwasser gemessenen DEQ-Werten und der Verdünnung des Abwassers im Fluss die zu erwartenden DEQ-Werte in der Surb, so wurde der effektbasierte Schwellenwert in der Surb unterhalb der ARA Surbtal - Endingen bei beiden Probenahmen eingehalten, was einer guten bis sehr guten Wasserqualität bezüglich PSII-hemmender Stoffe entspricht. In der Surb unterhalb der ARA Oberes Surbtal wurde der Schwellenwert im Juni überschritten und im September eingehalten, was einer mässigen bis guten Wasserqualität entspricht. Eine allfällige Vorbelastung der Surb wurde dabei nicht berücksichtigt.

*Wachstumshemmung nach 24 h:* Die DEQ<sub>bio</sub>-Werte für die Hemmung des Wachstums lagen bei 551 und 329 ng/L in den Proben der ARA Surbtal - Endingen und bei 958 und 545 ng/L in den Proben der ARA Oberes Surbtal (Tabelle 5). Auch für diesen Parameter sind die im Juni gemessenen Werte deutlich höher als die im September gemessenen Werte.



**Tabelle 5: Wachstumshemmung: Gemessener  $DEQ_{bio}$  Wert im kombinierten Algentest, sowie durch den Verdünnungsfaktor errechneter  $DEQ_{bio}$  in der Surb. In der letzten Spalte ist der errechnete DEQ anhand des vorgeschlagenen effektbasierten Schwellenwertes (130 ng/L) in fünf Zustandsklassen eingeteilt.**

grün = Einhaltung der Zielvorgabe, orange = Zielvorgabe deutlich überschritten. Beim errechneten DEQ wurde die potentielle Vorbelastung in der Surb nicht einbezogen.

| Code     | Bezeichnung             | Datum Probenahme in 2023 | 24 h Wachstumshemmung DEQ (ng/L) | Verdünnungsfaktor | errechneter DEQ in der Surb nach ARA Einfluss | Vergleich mit vorgeschlagenem Qualitätskriterium 130 ng/L |
|----------|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| AG_ASE_1 | ARA Surbtal - Eendingen | 26.06.                   | 505                              | 10.6              | 48                                            | grün                                                      |
| AG_AOS_1 | ARA Oberes Surbtal      | 26.06.                   | 1013                             | 2                 | 507                                           | orange                                                    |
| AG_ASE_2 | ARA Surbtal - Eendingen | 26.09.                   | 355                              | 11.6              | 31                                            | grün                                                      |
| AG_AOS_2 | ARA Oberes Surbtal      | 26.09.                   | 542                              | 2.1               | 258                                           | gelb                                                      |

Die Berechnung der zu erwartenden DEQ-Werte in der Surb ergab, dass der effektbasierte Schwellenwert in der Surb unterhalb der ARA Surbtal - Eendingen bei beiden Probenahmen eingehalten wurde, d.h. die Wasserqualität bezüglich wachstumshemmender Stoffe kann als gut beurteilt werden. In der Surb unterhalb der ARA Oberes Surbtal wurde der Schwellenwert bei beiden Probenahmen überschritten. Aufgrund der relativ hohen Werte im Ablauf der ARA und der geringen Verdünnung ergibt sich eine mässige bis unbefriedigende Wasserqualität.

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 Tabelle 7 im Anhang).

Die gemessenen DEQ-Werte für PSII- und Wachstumshemmung sind im Vergleich zu anderen ARA in der Schweiz im unteren bis mittleren Bereich (Kienle et al. 2019).

### 3.2 ER $\alpha$ -CALUX®

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

In Tabelle 6 sind die gemessenen EEQ-Werte aufgeführt. Sie zeigt ausserdem die erwarteten EEQs in der Surb, welche auf Basis von Abwasserverdünnungsfaktoren (Tabelle 3) errechnet wurden.



**Tabelle 6: Östrogene Aktivität: Gemessener EEQ-Wert im ER $\alpha$ -CALUX<sup>®</sup> sowie durch den Verdünnungsfaktor errechneter EEQ in der Surb. In der letzten Spalte ist der errechnete EEQ anhand des vorgeschlagenen effektbasierten Schwellenwertes (0.4 ng/L) in fünf Zustandsklassen eingeteilt.**

grün = Einhaltung der Zielvorgabe. Beim errechneten EEQ wurde die potentielle Vorbelastung in der Surb nicht einbezogen.

| Code     | Bezeichnung            | Datum Probenahme in 2023 | Östrogene Aktivität EEQ (ng/L) | Verdünnungsfaktor | errechneter EEQ in der Surb nach ARA Einfluss | Vergleich mit vorgeschlagenem Qualitätskriterium 0.4 ng/L |
|----------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| AG_ASE_1 | ARA Surbtal - Endingen | 29.06.                   | 0.49                           | 10.6              | 0.05                                          |                                                           |
| AG_AOS_1 | ARA Oberes Surbtal     | 29.06.                   | 0.67                           | 2                 | 0.34                                          |                                                           |
| AG_ASE_2 | ARA Surbtal - Endingen | 29.09.                   | 0.73                           | 11.6              | 0.06                                          |                                                           |
| AG_AOS_2 | ARA Oberes Surbtal     | 28.09.                   | 0.69                           | 2.1               | 0.33                                          |                                                           |

Die Messwerte der beiden ARA liegen in einer ähnlichen Grössenordnung. Im Gegensatz zu den Auswirkungen auf die Algen ist bei der östrogenen Aktivität kein so deutlicher Unterschied zwischen den Probenahmen im Juni und September zu erkennen. Da der Eintrag östrogen-wirksamer Stoffe aus ARA eher kontinuierlich erfolgt und nicht wie die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln einem saisonalen Eintragsmuster folgt, entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen. Im Vergleich zu anderen ARA liegen die Werte eher im unteren Bereich (Kienle et al. 2019).

Die Umrechnung der im Abwasser gemessenen EEQ-Werte auf die im Gewässer zu erwartenden Werte ergab für beide ARA und Probenahmen eine gute Wasserqualität bezüglich östrogen-wirksamer Stoffe<sup>4</sup>.

## 4 Schlussfolgerungen

Die Messungen der Abwässer der ARA Surbtal - Endingen und der ARA Oberes Surbtal im kombinierten Algentest zur Untersuchung der Wirkung von PSII- und wachstumshemmenden Stoffen und im ER $\alpha$ -CALUX<sup>®</sup> zur Erfassung östrogen-wirksamer Stoffe ergaben für beide Stoffgruppen unterschiedliche Belastungen und jahreszeitliche Muster.

Die DEQ-Werte für PSII- und Wachstumshemmstoffe waren in beiden ARAs im Juni deutlich höher als im September, was auf einen verstärkten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln im Juni hinweist. Aufgrund der geringen Verdünnung des Abwassers unterhalb der ARA Oberes Surbtal wurde die resultierende Wasserqualität für PSII-hemmende Stoffe im Juni als mässig und für wachstumshemmende Stoffe im Juni und September als unbefriedigend beurteilt.

Bei den EEQ-Werten für die östrogene Aktivität wurden hingegen keine saisonalen Unterschiede festgestellt. Die Wasserqualität bezüglich dieser Stoffgruppe konnte bei allen Probenahmen als gut bewertet werden.

<sup>4</sup> Es ist zu beachten, dass bei einem effektbasierten Schwellenwert von 0.07 ng/L die Wasserqualität bezüglich östrogen-wirksamer Stoffe in der Surb unterhalb der ARA Oberes Surbtal als «unbefriedigend» eingestuft würde.



## 5 Referenzen

- Baumann, Peter, and Simone D. Langhans. 2010. "Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Synthese der Beurteilungen auf Stufe F (flächendeckend)." In *Umwelt-Vollzug*, 47. Bundesamt für Umwelt, Bern.
- EC. 2022. "Proposal for a DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy." In, edited by European Commission.
- Ecotox Centre. 2023. "Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays - Strata-XL." In, 20.
- Escher, B. I., N. Bramaz, J. F. Mueller, P. Quayle, S. Rutishauser, and E. L. M. Vermeirssen. 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: 612-21.
- Escher, Beate I., Selim Aït-Aïssa, Peter A. Behnisch, Werner Brack, François Brion, Abraham Brouwer, Sebastian Buchinger, Sarah E. Crawford, David Du Pasquier, Timo Hamers, Karina Hettwer, Klára Hilscherová, Henner Hollert, Robert Kase, Cornelia Kienle, Andrew J. Tindall, Jochen Tuerk, Ron van der Oost, Etienne Vermeirssen, and Peta A. Neale. 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: 748-65.
- Glauch, L., and B. I. Escher. 2020. 'The Combined Algae Test for the Evaluation of Mixture Toxicity in Environmental Samples', *Environ Toxicol Chem*, 39: 2496-508.
- Götz, Christian W., Robert Kase, Cornelia Kienle, and Juliane Hollender. 2010. 'Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser - Kombination von Expositions- und ökotoxikologischen Effektdaten', *Gas, Wasser, Abwasser*, 7: 575-85.
- 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." In.
- Kienle, Cornelia, Etienne Vermeirssen, Petra Kunz, and Inge Werner. 2018. 'Grobbeurteilung der Wasserqualität mit Biotests - Ökotoxikologische Biotests zur Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern', *Aqua & Gas*, 98(4): 40-48.
- Kienle, Cornelia, Etienne L. M. Vermeirssen, Andrea Schifferli, Heinz Singer, Christian Stamm, and Inge Werner. 2019. 'Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams – Unravelling the contribution of chemicals causing effects', *PLoS ONE*, 14: e0226278.
- Könemann, Sarah, Robert Kase, Eszter Simon, Kees Swart, Sebastian Buchinger, Michael Schlüsener, Henner Hollert, Beate I. Escher, Inge Werner, Selim Aït-Aïssa, Etienne Vermeirssen, Valeria Dulio, Sara Valsecchi, Stefano Polesello, Peter Behnisch, Barbora Javurkova, Olivier Perceval, Carolina Di Paolo, Daniel Olbrich, Eliska Sychrova, Rita Schlichting, Lomig Leborgne, Manfred Clara, Christoph Scheffknecht, Yves Marneffe, Carole Chalon, Petr Tušil, Přemysl Soldán, Brigitte von Danwitz, Julia Schwaiger, Maria Isabel San Martín Becares, Francesca Bersani, Klára Hilscherová, Georg Reifferscheid, Thomas Ternes, and Mario Carere. 2018. 'Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102: 225-35.
- Liechti, Paul, Ueli Sieber, Ulrich von Blücher, Hans Peter Willi, Ueli Bundi, Andreas Frutiger, Michael Hütte, Armin Peter, Christian Göldi, Urs Kupper, Walo Meier, and Pius Niederhauser. 1998. "Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer in der Schweiz, Modul-Stufen-Konzept." In *Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr. 26*. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern.
- Murk, A. J., J. Legler, M. M. van Lipzig, J. H. Meerman, A. C. Belfroid, A. Spenkelink, B. van der Burg, G. B. Rijs, and D. Vethaak. 2002. 'Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays', *Environ Toxicol Chem*, 21: 16-23.
- Neale, P. A., N. A. Munz, S. Aït-Aïssa, R. Altenburger, F. Brion, W. Busch, B. I. Escher, K. Hilscherova, C. Kienle, J. Novak, T. B. Seiler, Y. Shao, C. Stamm, and J. Hollender.



2017. 'Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams', *Sci Total Environ*, 576: 785-95.

Schreiber, U., P. Quayle, S. Schmidt, B. I. Escher, and J. F. Mueller. 2007. 'Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging', *Biosens Bioelectron*, 22: 2554-63.

## Anhang 1 Ergebnisse des kombinierten Algentests

**Tabelle 7: Ergebnisse des kombinierten Algentests**

$PSII-DEQ_{bio}$  = Diuron-Äquivalenzkonzentration für PSII-Hemmung,  $Wachstums-DEQ_{bio}$  = Diuron-Äquivalenzkonzentration für Wachstums-Hemmung.

| Probenahme-<br>stelle     | Code     | PSII<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>1 | PSII<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>2 | PSII DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>mean | Wachs-<br>tums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>1 | Wachs-<br>tums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>2 | Wachstums-<br>DEQ <sub>bio</sub><br>(ng/L)<br>mean |
|---------------------------|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| ARA Surbtal<br>Endingen 1 | AG_ASE_1 | 133.88                                    | 120.98                                    | 127.43                                    | 500.87                                               | 509.09                                               | 504.98                                             |
| ARA Oberes<br>Surbtal 1   | AG_AOS_1 | 295.81                                    | 274.20                                    | 285.00                                    | 958.20                                               | 1068.40                                              | 1013.30                                            |
| ARA Surbtal<br>Endingen 2 | AG_ASE_2 | 36.37                                     | 32.18                                     | 34.27                                     | 329.26                                               | 381.62                                               | 355.44                                             |
| ARA Oberes<br>Surbtal 2   | AG_AOS_2 | 77.52                                     | 66.20                                     | 71.86                                     | 545.18                                               | 538.69                                               | 541.94                                             |
| Field Blank               | FB       | _*                                        | _*                                        | _*                                        | _**                                                  | _**                                                  | _**                                                |
| SPE Blank                 | B        | _*                                        | _*                                        | _*                                        | _**                                                  | _**                                                  | _**                                                |