

Projektbericht:

Kanton Aargau: Vollzugsmonitoring Surbtal 2023

- RTgill-W1-Zelllinien Test - ISO Standard 21115 - zur Bestimmung der akuten Fischtoxizität von 12 Wasserproben (ohne chemische Analyse)
- Biomarker-Genexpressionsanalyse in RTgill-W1-Zellen zur Erfassung von subletalen Effekten nach Exposition mit 12 Wasserproben (ohne chemische Analyse)

Auftraggeber:	Kanton Aargau Abteilung für Umwelt Abfallwirtschaft, Altlasten, Umweltlabor und Oberflächengewässer Entfelderstrasse 22 5001 Aarau
Firma:	aQuaTox-Solutions GmbH Else-Züblin-Strasse 11 8404 Winterthur Tel. +41 (0)76 778 12 80 stephan.fischer@aquatox-solutions.ch www.aquatox-solutions.ch
Projektleiter:	Dr. Stephan Fischer
Bericht:	Dr. Stephan Fischer
Projektdurchführende:	Dr. Jennifer Fitzgerald (RTgill-W1-Zelllinien Test) Katharina Klotz (Biomarker-Genexpressionsanalyse)
Qualitätsprüfung:	Melanie Fischer
Datum:	08.12.2025

Zusammenfassung

Das Ziel des Projekts Surbtal 2023 war die Bestimmung des toxischen Potenzials von Wasserproben aus vier verschiedenen Standorten aus dem Surbtal: Surb – Ehrendingen (CR94), ARA Oberes Surbtal, Surb – Endingen (CW98) und Surb – Endingen (CR97). Zwischen Juni und November 2023 wurden an jedem der vier Standorte zweiwöchige Mischproben entnommen, entweder in der Surb (CR94, CW98 und CR97) oder direkt nach der Behandlung im Auslauf der Kläranlage (ARA Oberes Surbtal). Ziel der Untersuchungen war es, sowohl akute als auch subletale Effekte auf Fische mithilfe der Kiemenzelllinie RTgill-W1 (Regenbogenforelle) zu erfassen und deren Entwicklung entlang der Fliessrichtung der Surb zu verfolgen.

Zur Untersuchung der akuten Fischtoxizität wurde der RTgill-W1-Zelllinientest gemäss ISO-Standard 21115 eingesetzt. Des Weiteren wurden die folgenden subletalen Effekte in den RTgill-W1 Zellen mittels Genexpressionsanalyse untersucht: 1) Biotransformation von organischen Schadstoffverbindungen, 2) allgemeiner Umweltstress, 3) Effekte auf das Fischimmunsystem, 4) Schwermetallbelastung, 5) Glukokortikoidbelastung, 6) Oxidativer-Stress, 7) endokrine Effekte und 8) Apoptose.

Ergebnisse akute Toxizität

Sämtliche Wasserproben zeigten Zellvitalitätswerte von mindestens 90 % oder höher, sodass keine akute fischtoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Ein leichter Matrixeffekt trat bei einigen Proben auf, wenn sie gemeinsam mit 3,4-Dichloroanilin (Positivkontrolle) getestet wurden. Die Gültigkeitskriterien wurden in diesen Fällen jedoch nur geringfügig unterschritten, weshalb dieser Befund als wenig kritisch eingestuft wird.

Ergebnisse subletale Effekte

Die Genexpressionsanalyse aller untersuchten Wasserproben ergaben folgende standortspezifische Ergebnisse entlang des Flussverlaufs (siehe Abb. 1):

1. Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA Oberes Surbtal)

An diesem oberhalb der ARA gelegenen Standort waren nur wenige subletale Effekte nachweisbar. Vereinzelt zeigten sich eine leicht erhöhte Biotransformationsaktivität sowie eine schwache Immunantwort.

2. ARA Oberes Surbtal (direkte Ausflussprobe)

In der Ausflussprobe der ARA Oberes Surbtal wurden für nahezu alle untersuchten subletalen Endpunkte, mit Ausnahme des oxidativen Stresses, deutlich erhöhte Biomarkerexpressionswerte festgestellt. Besonders ausgeprägt waren die Reaktionen auf organische Schadstoffverbindungen (Biotransformation) sowie auf Beeinträchtigungen der Fischgesundheit (Immunantwort).



3. Surb – Endingen (CW98, unterhalb der ARA Oberes Surbtal)

Unterhalb der ARA konnten die meisten in der Ausflussprobe gemessenen subletalen Effekte nicht mehr nachgewiesen werden. Ähnlich wie am Standort Surb – Ehrendingen (CR94) zeigten sich lediglich einige sehr geringe subletale Effekte in Form leicht erhöhter Biotransformationsaktivität und schwacher Immunreaktionen.

4. Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA Surbtal)

Im Vergleich zu den Standorten ober- und unterhalb der ARA Oberes Surbtal (CR94 und CW98) wurden hier leicht erhöhte Biomarkerexpressionen für Biotransformation und Immunantwort gemessen. Zudem ergaben sich Hinweise auf eine möglicherweise leicht erhöhte Metallbelastung.

Fazit

Die Ergebnisse aller untersuchten Wasserproben deuten auf eine insgesamt weitgehend unbedenkliche Wasserqualität im Hinblick auf akute toxische Effekte hin.

Für die Proben, die ober- und unterhalb der ARA Oberes Surbtal (CR94 und CW98) entnommen wurden, konnten überwiegend nur sehr geringe subletale Effekte festgestellt werden. Daher ist an diesen Standorten insgesamt nicht mit relevanten, höchstens mit minimalen subletalen Effekten zu rechnen.

Lediglich am Standort Surb – Endingen (CR97) traten teilweise leicht erhöhte Werte für die gemessenen subletalen Endpunkte auf. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist im Vergleich zu den Standorten CR94 und CW98 von leicht höheren Effekten bzw. einer möglichen Beeinträchtigung der Fischgesundheit auszugehen.

Gesondert betrachtet werden müssen jedoch die Wasserproben, die direkt am Auslauf der ARA Oberes Surbtal entnommen wurden. Diese sind hinsichtlich ihrer Belastungsprofile nicht mit den übrigen Flussproben vergleichbar und zeigten durchgängig erhöhte subletale Effekte in den RTgill-W1-Zellen.

Eine Übersichtsdarstellung aller Ergebnisse zur akuten Toxizität und zu subletalen Effekten in Abhängigkeit der Probenentnahmestellen entlang der Fliessrichtung der Surb ist in Abbildung 1 zusammengefasst.



Endpunkte	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA- Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
Akute Toxizität				
Biotransformation				
Allgemeiner Stress				
Immunantwort				
Metallstress				
Glukokortikoidbelastung				
Oxidativer Stress				
Endokrine Wirkung				
Apoptose				
Effektsumme	67	155	69	91

Effekte			
kein	leicht	erhöht	stark erhöht

Abb. 1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Untersuchungen zur akuten Toxizität und zu subletalen Effekten sämtlicher Proben aller Entnahmezeitpunkte an den Standorten entlang der Fliessrichtung der Surb. Zur besseren Veranschaulichung der Belastung an den einzelnen Standorten wird zusätzlich eine Effektsumme dargestellt, die aus den Einzelwerten aller untersuchten Endpunkte berechnet wurde.



INHALTSVERZEICHNIS

1	GEGENSTAND DES PROJEKTES	1
2	HAFTUNGSAUSSCHLUSS	2
3	RTGILL-W1 ZELLINIENTEST NACH ISO 21115	2
3.1	Hintergrund	2
3.2	Testkontrollen RTgill-W1 Test	2
3.2.1	Gültigkeitskriterien Positivkontrolle	3
3.3	Toxikologische Beurteilung der Proben	3
3.3.1	Bewertungskriterien:	3
3.4	Ergebnisse	4
3.4.1	Übersicht Ergebnisse akute Toxizität	4
4	SUBLETALE-EFFEKE / GENEXPRESSIONSANALYSE	5
4.1	Hintergrund	5
4.2	Testkontrollen und Auswertung	5
4.3	Biotransformation	5
4.3.1	Zusammenfassung Ergebnisse Biotransformation	5
4.3.2	Markergene	7
4.3.3	Genexpressionsergebnisse Biotransformation	7
4.4	Allgemeine Stressantwort	9
4.4.1	Zusammenfassung Ergebnisse allgemeine Stressantwort	9
4.4.2	Markergene	10
4.4.3	Genexpressionsergebnisse allgemeine Stressantwort	10
4.5	Zelluläre Immunantwort	11
4.5.1	Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Immunantwort	11
4.5.2	Markergene	13
4.5.3	Genexpressionsergebnisse zelluläre Immunantwort	13
4.6	Zelluläre Metallbelastung	14
4.6.1	Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Metallbelastung	14
4.6.2	Markergene	15
4.6.3	Genexpressionsergebnisse Metallbelastung	16



4.7	Glukokortikoidbelastung	17
4.7.1	Markergene	17
4.7.2	Genexpressionsergebnisse Glukokortikoidbelastung	17
4.8	Oxidativer Stress	18
4.8.1	Markergene	18
4.8.2	Genexpressionsergebnisse oxidativer Stress	18
4.9	Endokrine Wirkung	19
4.9.1	Markergene	19
4.9.2	Genexpressionsergebnisse endokrine Wirkung	19
4.10	Apoptose (programmierter Zelltod)	20
4.10.1	Markergene	20
4.10.2	Genexpressionsergebnisse Apoptose	20
5	PRINCIPAL COMPONENT ANALYSE (PCA)	21
6	ANMERKUNG	23
APPENDIX		23
A1: REFERENZEN		24
A2: INFORMATIONEN UNTERSUCHTE WASSERPROBEN		25
A3: DETAILLIERTE DARSTELLUNG ERGEBNISSE AKUTE TOXIZITÄT		28
A4 DETAILLIERTE BESCHREIBUNG ERGEBNISSE GENEXPRESSION		37



1 GEGENSTAND DES PROJEKTES

Von Anfang Juni bis Anfang November 2023 wurden in der Surb im Kanton Aargau an vier Stand-orten (siehe Abbildung 2) zweiwöchige Mischproben gesammelt. Die vier Probenahmestellen sind wie folgt:

- CR94, Surb - Ehrendingen, oberhalb der ARA Oberes Surbtal
- ARA Oberes Surbtal, nach der Behandlung am ARA-Ausfluss
- CW98, Surb - Endingen, unterhalb der ARA Oberes Surbtal und oberhalb der ARA Surbtal
- CR97, Surb - Endingen, unterhalb der ARA Surbtal, ca. 4 km vor der Mündung in der Aare

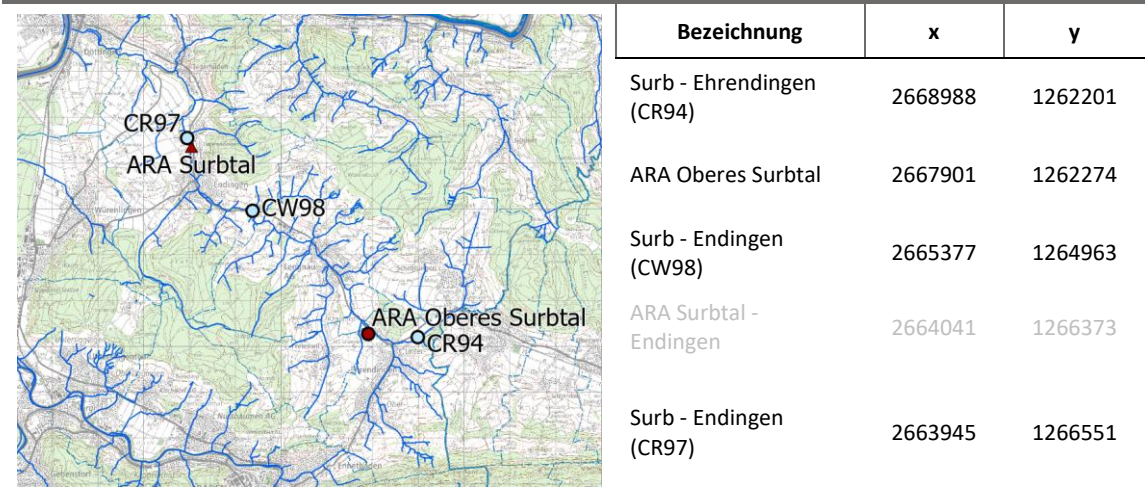


Abb. 2. Probenahmeorte für die Fischzellinientests während des Vollzugsmonitoring 2023 im Surbtal (Kreise). Die ARA Surbtal (rotes Dreiecks-Symbol) wurde nicht beprobt, in der ARA Oberes Surbtal (roter Kreis) wurde der Kläranlagenauslass beprobt. Die anderen Messstellen (blaue Kreise) befinden sich im Fluss selbst. Die Abbildung listet die Messstellen inklusive Koordinaten in Fließrichtung entlang der Surb auf.

Die Proben wurden im Rahmen des Vollzugsmonitoringprogramm des Kanton AG in der Surb im Jahr 2024 genommen, dass ein umfangreiches biologisches und chemisches Monitoring beinhaltet.

Im Zwei-Wochen-Takt wurden gekühlte Wasserproben (14-Tage-Mischproben, insgesamt ca. 30 Einzelproben) von den vier Standorten durch den Auftraggeber an die aQuaTox-Solutions GmbH geschickt. Nach Erhalt wurden die Wasserproben im Labor der aQuaTox-Solutions GmbH bei - 20 ± 4 °C eingelagert. Alle Proben wurden vom Auftraggeber chemisch analysiert, um die Konzentrationen von ca. 100 Mikroverunreinigungen zu bestimmen. Basierend auf den gewonnenen Daten wurden 12 Wasserproben ausgewählt (jeweils vier Proben aus drei Probennahmekampagnen), die von aQuaTox-Solutions wie folgt in 2024 untersucht wurden:



- Durchführung des RTgill-W1-Zelllinien-Tests gemäss ISO-Standard 21115 zur Bestimmung der akuten toxischen Wirkung der 12 ausgewählten Wasserproben (ohne chemische Analyse).
- Genexpressionsanalysen in RTgill-W1-Zellen zur Erfassung subletaler Effekte nach Exposition gegenüber den 12 Wasserproben (ohne chemische Analyse).

2 HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Dieser Bericht wurde von der aQuaTox-Solutions GmbH erstellt und ist ausschliesslich für den auf der Titelseite genannten Auftraggeber bestimmt. Eine Haftung gegenüber Dritten, die sich auf diesen Bericht stützen, wird ausgeschlossen.

3 RTGILL-W1 ZELLINIENTEST NACH ISO 21115

3.1 Hintergrund

Beim Testen akuter Fischtoxizität kann das Kiemenepithel als primäre Aufnahme- und Angriffsstelle von Wasserverunreinigungen angesehen werden. Ein geschädigtes Kiemenepithel führt zu einer eingeschränkten Funktionsweise des Organismus bis hin zum Tod. Beides spiegelt sich in einer reduzierten Lebensfähigkeit der Zellen wieder, welche im RTgill-W1 Zellinientest quantifiziert wird. Die permanente Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) RTgill-W1 kann, nach Anpassung der Osmolalität, direkt der Wasserprobe ausgesetzt werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen wird mit einer Kombination fluoreszierender Indikatorfarbstoffe ermittelt, welche drei verschiedene Toxizitätsparameter auf demselben Zellsatz nachweisen.

Der Test wird in 24-well Platten durchgeführt. Es werden bis zu 6 Verdünnungsstufen (100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % und 10 %) der Wasserprobe hergestellt. Nach 24 Stunden Exposition erfolgt die photometrische Messung der Fluoreszenz der Indikatorfarbstoffe. Dabei werden AlamarBlue, CFDA-AM und Neutral Rot jeweils als Maß für die metabolische Aktivität, die Integrität der Zellmembran und die Integrität der Lysosomen-Membranen verwendet. Die Ergebnisse werden als % Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ausgedrückt.

Bei der Untersuchung von Wasserproben nach ISO 21115 wird der LID-Wert (lowest ineffective dilution) berechnet.

3.2 Testkontrollen RTgill-W1 Test

Die Daten wurden wie in der ISO-Standard 21115 angegeben ausgewertet. Alle Qualitätskriterien anhand der vorgeschriebenen Kontrollen wurden wie folgt erfüllt:

- Die Wasserproben zeigten keine Eigenfluoreszenz auf. Damit konnte eine Interferenz mit den fluoreszierenden Zellvitalitätsindikatoren ausgeschlossen werden.
- Nach jedem sechsten Test wurde eine Testkontrolle (Positivkontrolle / Standardmedium: Zellen exponiert mit einer Konzentrationsreihe an 3,4-Dichloroanilin in



Standardmedium) durchgeführt. Die gemessenen Effektkonzentrationen von allen Testkontrollen waren im vorgeschriebenen Kontrollbereich.

3.2.1 Gültigkeitskriterien Positivkontrolle

Gemäss ISO 21115 muss der mittlere EC50-Wert der Positivkontrolle, 3,4-Dichloroanilin, für jeden Zellviabilitätsindikator-Farbstoff zwischen zweieinhalb Standardabweichungen (SD) von den unten angegebenen EC50-Werten liegen.

AlamarBlue: 42,9 mg/L $\pm$ 5,7 mg/L (2,5 SD-Bereich: 28,7 mg/L bis 57,1 mg/L)

CFDA-AM: 62,6 mg/L $\pm$ 24,9 mg/L (2,5 SD Bereich: 0,4 mg/L bis 124,9 mg/L)

Neutralrot: 48,8 mg/L $\pm$ 10,0 mg/L (2,5 SD Bereich: 23,7 mg/L bis 73,8 mg/L)

3.3 Toxikologische Beurteilung der Proben

Jede Wasserprobe wurde in zwei Ansätzen getestet:

- In Stufen von 100 % bis 10 % Wasserprobe, verdünnt mit dem Standardmedium L-15/ex → dient der Bestimmung der Toxizität der Wasserprobe (siehe Appendix A3)
- Unverdünnte Wasserprobe mit Zusatz einer Konzentrationsreihe von 3,4-Dichloroanilin (3,4-DCA - Positivkontrolle / Wasserprobe) → dient als Indikator für eine Wechselwirkung von Chemikalien mit der Matrix der Wasserprobe, d.h. ob die Matrix einen Chemikalieneffekt verstärkt oder vermindert (siehe Appendix A3).

3.3.1 Bewertungskriterien:

1. Akute Toxizität
 - Signifikanter Abfall der Zellvitalität (< 90 %) für alle Endpunkte
 - Positivkontrolle in unverdünnter Wasserprobe ergibt keine Dosis-Wirkungs-Kurve
2. Keine akute Toxizität
 - Zellvitalität $\geq$ 90 % für alle Endpunkte
 - Positivkontrolle in unverdünnter Wasserprobe erfüllt Gültigkeitskriterien
3. Subletal / Leicht akut toxisch
 - Abfall der Zellvitalität (< 90 %) für einzelne Endpunkte
 - Positivkontrolle in unverdünnter Wasserprobe erfüllt Gültigkeitskriterien
4. Toxizität durch Matrixeffekt
 - Positivkontrolle in unverdünnter Wasserprobe erfüllt Gültigkeitskriterien für alle Endpunkte nicht
5. Leichte Toxizität durch Matrixeffekt
 - Positivkontrolle in unverdünnter Wasserprobe erfüllt Gültigkeitskriterien für einzelne Endpunkte nicht



3.4 Ergebnisse

3.4.1 Übersicht Ergebnisse akute Toxizität

Im Folgenden ist eine Übersicht der Ergebnisse zur Untersuchung der akuten Toxizität dargestellt. Eine detailliertere Darstellung findet sich in Appendix A3

Bei den untersuchten Wasserproben konnten weder akute Toxizität noch subletale Effekte gemessen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen können alle Standorte über die gesamte Kampagne hinweg als nicht akut fischtoxisch eingestuft werden.

Bei den Proben Surb - Ehrendingen (CR94, Oktober 2023, ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslaufprobe, August & Oktober 2023), Surb - Endingen (CW98) (Oktober 2023) und Surb - Endingen (CR97, Oktober) wurde ein leichter Matrixeffekt festgestellt.

In diesem Fall erfüllte die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe die Gültigkeitskriterien für alle Endpunkte mit Ausnahme von AlamarBlue (metabolische Aktivität). Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Wasserproben die toxische Wirkung von Chemikalien leicht verstärken. Allerdings wurden die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue in allen Fällen nur geringfügig unterschritten, sodass dieser Befund als wenig kritisch eingestuft werden sollte.

Auffällig ist, dass der leicht erhöhte Matrixeffekt in sämtlichen Wasserproben im Zeitraum Oktober 2023 festgestellt wurde. Nach den vom Auftraggeber bereitgestellten Informationen traten insbesondere während dieses Zeitraums verstärkte Niederschlagsereignisse auf. Es ist daher plausibel, dass regenbedingte Einträge zu dem beobachteten Anstieg des Matrixeffekts beigetragen haben. Eine endgültige Bewertung dieser Zusammenhänge obliegt jedoch dem Auftraggeber, da AquaTox-Solutions hierzu keine eigenen Datengrundlagen vorliegen.

Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
05.06. - 19.06.2023				
28.08. - 11.09.2023				
23.10. - 05.11.2023				

Akute Toxizität		
Keine	Leicht	Toxisch

Abb. 3. Übersichtsdiagramm akute Toxizität von allen untersuchten Wasserproben.

Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
05.06. - 19.06.2023				
28.08. - 11.09.2023				
23.10. - 05.11.2023				

Matrixeffekt		
Keine	Leicht	Toxisch

Abb. 4. Übersichtsdiagramm Toxizität durch Matrixeffekt von allen untersuchten Wasserproben



4 SUBLETALE-EFFEKE / GENEXPRESSIONSANALYSE

4.1 Hintergrund

Durch die Exposition der RTgill-W1 Zellen werden nicht nur Informationen über akut toxische Effekte gewonnen, auch die Erfassung von subletalen Effekten durch die Analyse der Expression von Biomarkergenen ist möglich. Dadurch kann man mehr über frühe Reaktionen im Fisch auf mögliche Umweltverunreinigungen in den Wasserproben in Erfahrung bringen und somit eine genauere Einschätzung über die Wasserqualität erhalten. Spezifische Biomarkergene liefern Informationen über z.B. Metall- und oxidativen Stress, Immunregulation und Abwehr von Krankheitserregern, Biotransformation und vieles mehr (Solhaug et al. 2023; Kienle et al. 2022; Zoellig et al. 2017).

4.2 Testkontrollen und Auswertung

Es wurden 17 Biomarkergene untersucht. Diese wurden im Vergleich zur Negativkontrolle mit dem Standardmedium L-15/ex ausgewertet. Als relevanter sublethaler Effekt ist generell - im Vergleich zur Kontrolle - eine 1.5-fache Regulation der Genexpression als Grenzwert festgelegt. Dieser Wert kann abhängig vom untersuchten Marker anders sein.

Die Ergebnisse der Genexpression aller Probezeitpunkte sind einerseits als vereinfachte Übersichtsglyphiken («Heatmaps») pro Gen oder über die Summe der Genexpression aller jeweils gemessenen Markergene dargestellt.

4.3 Biotransformation

4.3.1 Zusammenfassung Ergebnisse Biotransformation

Zur Untersuchung sublethaler Effekte, die durch organische Verbindungen hervorgerufen werden, wurde die Regulation von sechs Markergenen analysiert. Diese ausgewählten Markergene sind essenzielle Bestandteile der zellulären Detoxifizierung (Phase I und Phase II) organischer Schadstoffverbindungen (detaillierte Funktionen siehe Abschnitt 4.3.2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Probeentnahme entlang der Fließrichtung der Surb dargestellt

1. Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA Oberes Surbtal)

Die Wasserproben von diesem Standort zeigten in der Gesamtheit der Genexpressionswerte im Vergleich zur Kontrolle die geringsten Unterschiede, was auf eine insgesamt geringere Belastung an diesem Standort hinweist.

2. ARA Oberes Surbtal (ARA-Ausflussprobe)

Die Ergebnisse der ARA-Auslaufproben zeigten für die meisten Markergene eine erhöhte Expression und deuten auf eine generell erhöhte Belastung mit organischen Schadstoffen hin.



3. Surb – Endingen (CW98, unterhalb der ARA Oberes Surbtal)

An diesem Standort wurden in einer Probe (Juni 2023) leicht erhöhte Genexpressionswerte gemessen. Dies weist auf eine geringfügig erhöhte Belastung mit organischen Schadstoffverbindungen zu diesen Zeitpunkten hin.

4. Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA Surbtal)

An diesem Standort wurden in zwei Proben (Juni und Oktober 2023) leicht erhöhte Genexpressionswerte gemessen. Dies weist auf eine geringfügig erhöhte Belastung mit organischen Schadstoffverbindungen zu diesen Zeitpunkten hin.

Es ist zudem hervorzuheben, dass in allen Proben und zu allen Zeitpunkten das Markergen Cyp1a erhöht bis stark erhöht exprimiert war, was auf eine erhöhte Belastung mit Substraten von Cyp1a hindeutet (siehe Abb. 5).

Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
05.06. - 19.06.2023				
28.08. - 11.09.2023				
23.10. - 05.11.2023				

Summe Genexpression			
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 5. Übersichtsgraphik der Biotransformationsergebnisse entlang der Fliessrichtung: Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen sechs gemessenen Markergenen zur Untersuchung von zellulären Biotransformationseffekten.



4.3.2 Markergene

Tabelle 1. Biomarkergene für die Untersuchung von Biotransformationseffekten

Biomarkergene	Funktion
Cyp1a (Cytochrom P450 1A)	Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist in die Metabolisierung verschiedenster Chemikalien involviert, einschliesslich Polzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs), alkylierte-PAKs, Polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Dioxinen.
Cyp3a (Cytochrom P450 3A)	Dieses Phase I-Enzym der zellulären Detoxifizierung ist in die Metabolisierung vorrangig aliphatischer Kohlenwasserstoffe oder Xenohormone involviert. Zudem metabolisiert es circa die Hälfte aller Medikamentenwirkstoffe welche oxidative Biotransformation unterlaufen (siehe auch Cyp3a drug substrate database https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT003824#drugs)
Cyp51 (Cytochrom P450 51)	Die Genexpression dieses Phase I-Enzyms der zellulären Detoxifizierung wird im Vorhandensein von Azolen (Fungizide) sensitiv reguliert, wie z.B. Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol oder Ketaminazol.
GST (Glutathion-S-Transferase)	Die Konjugationsaktivität von Glutathion-S-Transferase spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Detoxifizierung chemotherapeutischer Substanzen, sowie verschiedener Medikamentenwirkstoffe, Pestizide und Karzinogene.
UGT (UDP-glukuronosyl transferases)	Die UDP-Glukuronosyltransferase ist verantwortlich für die Bindung von Glukuronsäure an Xenobiotika. Das resultierende Konjugat ist hydrophiler und kann dadurch von der Zelle einfacher ausgeschieden werden als das Substratmolekül. Typische Substrate sind z.B. verschiedene Medikamentenwirkstoffe (Paracetamol, Phenylbutazon oder Thyroxin) sowie diverse Steroide und Pestizide.
SULT (Sulfotransferase)	Sulfotransferase ist verantwortlich für die Bindung von Sulfogruppen an Xenobiotika., welche dadurch ebenfalls einfacher von der Zelle ausgeschieden werden können.

4.3.3 Genexpressionsergebnisse Biotransformation

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.



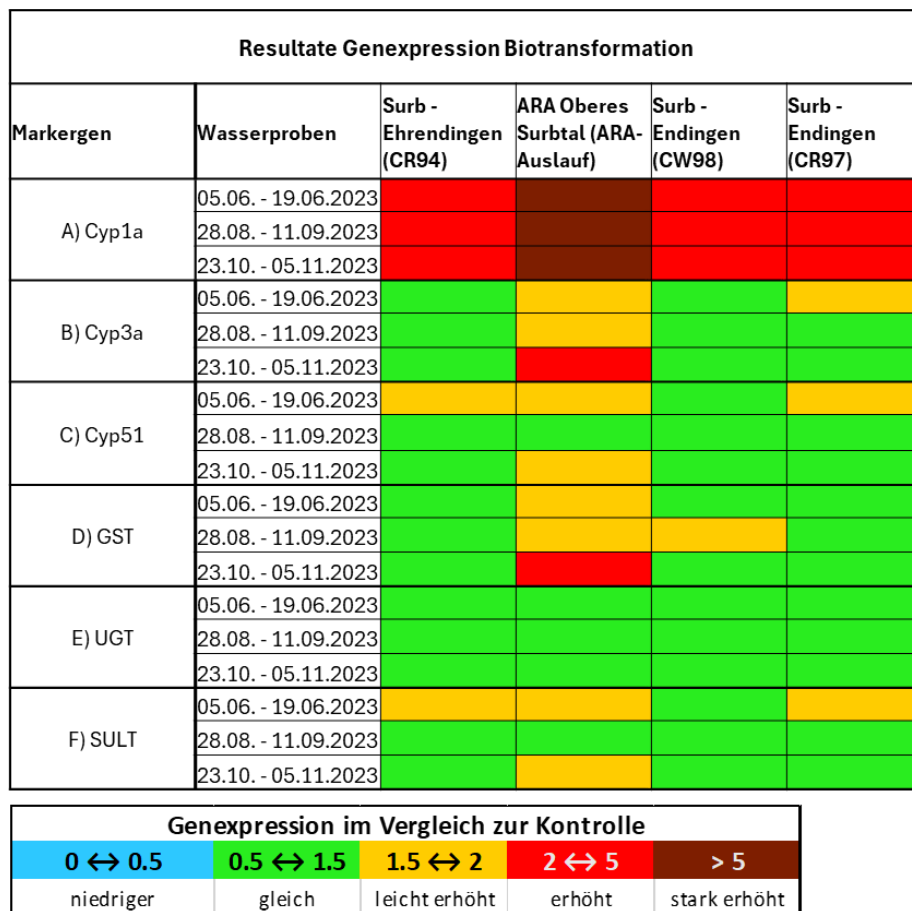


Abb. 6. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von den Biomarkergenen für zelluläre Biotransformation A) Cyp1a, B) Cyp3a, C) Cyp51, D) GST, E) UGT und F) SULT

Vergleich der Ergebnisse der Markergene der Biotransformation:

Generell wurden die höchsten Genexpressionswerte für das Gen Cyp1a gemessen, gefolgt von Cyp3a, GST, Cyp51 und SULT. Keine erhöhte Expression wurde für UGT gemessen.

Vergleich der Standorte und des zeitlichen Verlaufs:

Der Standort ARA Oberes Surbtal wies zu allen untersuchten Zeitpunkten eine erhöhte bis stark erhöhte Expression der meisten Markergene auf. Da es sich dabei um ARA-Auslaufproben handelt kann man davon ausgehen das diese Proben generell, nicht jahreszeitlich bedingt, erhöhte Konzentrationen von organischen Verbindungen aufweisen, die als Substrate dieser Enzyme fungieren.

Die anderen Standorte oberhalb und unterhalb der ARA zeigen insgesamt eine geringere Expression der meisten Markergene, was auf eine niedrigere Belastung an diesen Abschnitten der Surb hinweist.

Die leicht erhöhte Expression von Cyp51 in den Proben Surb – Ehrendingen (CR94), ARA Oberes Surbtal und Surb – Endingen (CR97) im Juni 2023 könnte auf eine verstärkte Belastung mit Azol-Fungiziden hindeuten, da diese typische exogene Substrate von Cyp51 darstellen. Alternativ könnte die Induktion auch durch Störungen in der Sterolbiosynthese infolge der Exposition der Zellen mit den Wasserproben verursacht worden sein. Zudem ist eine unspezifische Regulation denkbar, die im Zusammenhang mit der gleichzeitig stark erhöhten Expression von Cyp1a steht.



Eine starke Induktion von Cyp1a weist auf eine Belastung mit lipophilen organischen Substanzen hin (z. B. PAK, Pestizide, Azole). Solche Substanzen können auch die zelluläre Membranintegrität und die Lipidhomöostase beeinflussen, was wiederum eine sekundäre Induktion von Cyp51 auslösen kann.

Darüber hinaus fällt auf, dass SULT in denselben Proben zum gleichen Zeitpunkt eine erhöhte Expression aufwies, während UGT keine Induktion zeigte. Dies beruht möglicherweise darauf, dass SULT-Enzyme bevorzugt hydroxylierte und aromatische Substanzen sulfatieren, die häufig als Abbauprodukte von PAK, Pestiziden oder Azolen auftreten. Damit reagieren sie schneller auf lipophile Fremdstoffe, die zuvor durch CYP-Enzyme oxidiert werden. UGT-Enzyme hingegen sind stärker auf die Konjugation von polaren Substraten spezialisiert und werden erst in späteren Detoxifikationsschritten relevant. Die fehlende UGT-Induktion könnte daher auch auf eine Dominanz von Substanzen hinweisen, die bevorzugt über SULT abgebaut werden.

Besonders auffällig ist, dass Cyp1a in allen untersuchten Proben und zu allen Zeitpunkten erhöht exprimiert war. Dies spricht für eine jahreszeitlich unabhängige Belastung mit Substraten dieses Enzyms an allen Standorten. Dass Cyp1a auch an den vergleichsweise „unbelasteten“ Standorten oberhalb der ARA hochreguliert war, könnte mehrere Ursachen haben. Da dies laut Auftraggeber nicht direkt mit den Daten der chemischen Analysen korreliert, ist in diesem Fall am ehesten von einer unspezifischen Stressantwort der Zellen auf mögliche Mischbelastungen auszugehen, die nicht zwingend mit einzelnen Schadstoffkonzentrationen in Zusammenhang stehen.

4.4 Allgemeine Stressantwort

4.4.1 Zusammenfassung Ergebnisse allgemeine Stressantwort

Für die Untersuchung von subletalen Effekten, hervorgerufen durch allgemeinem Umweltstress (z.B. Proteinfaltung/-integrität, Belastung mit natürlichen Umwelttoxinen usw.), wurde die Regulation von zwei Markergenen untersucht. Die ausgewählten Markergene sind ein essenzieller Bestandteil zur Gewährleistung der Zellvitalität (genaue Funktion siehe Abschnitt 4.4.2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Probeentnahme entlang der Fließrichtung der Surb dargestellt.

1. Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA Oberes Surbtal)

Die Wasserproben von diesem Standort zeigten in der Gesamtheit der Genexpressionswerte im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Dies deutet auf keine allgemeine Stressbelastung hin.

2. ARA Oberes Surbtal (direkte Ausflussprobe)

Die Ergebnisse der ARA-Auslaufproben auf eine leicht verstärkte allgemeine Stressbelastung am den Zeiträumen Juni und Oktober-November 2023 hin.

3. Surb – Endingen (CW98, unterhalb der ARA Oberes Surbtal)

Die Wasserproben von diesem Standort zeigten in der Gesamtheit der Genexpressionswerte im Vergleich zur Kontrolle die keine Unterschiede. Dies deutet auf keine allgemeine Stressbelastung hin.



4. Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA Surbtal)

Die Wasserproben von diesem Standort zeigten nur eine leicht verstärkte allgemeine Stressbelastung für den Zeitraum Juni 2023 an.

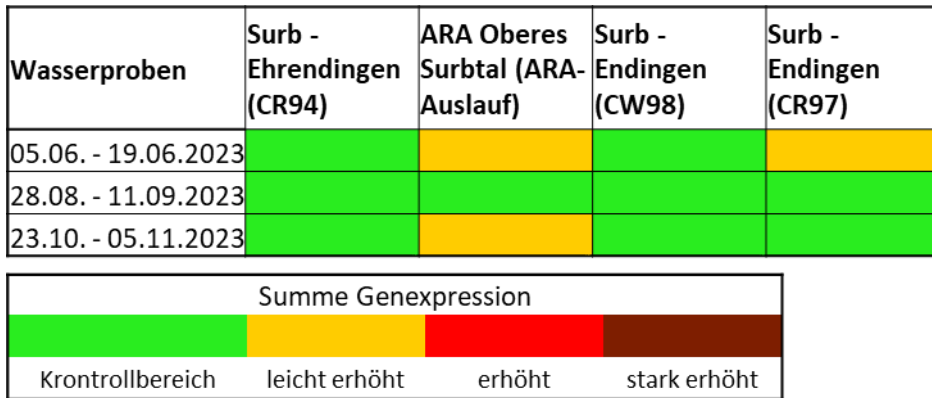


Abb. 7. Übersichtsgraphik der Allgemeinen Stressantwort entlang der Fließrichtung: Dargestellt ist die Summe der Genexpression der beiden gemessenen Markergene zur Untersuchung der allgemeinen zellulären Stressantwort.

4.4.2 Markergene

Tabelle 2. Biomarkergene für die Untersuchung der allgemeinen Stressantwort

Biomarkergene	Funktion
PXR (Pregnan-X-Receptor)	Dieser nukleare Rezeptor fungiert als Sensor für toxische Nebenprodukte des endogenen Metabolismus sowie exogener Chemikalien und verbessert deren Eliminierung aus der Zelle durch die Regulierung verschiedener Detoxifizierungsgene. PXR wird durch eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen aktiviert, wie z.B. Steroide, Antibiotika, verschiedenste pflanzliche und andere Substanzen.
HSP70 (Heat shock protein)	Die Bewahrung der Proteinintegrität erfolgt durch die Verhinderung von Aggregationen und Fehlfaltungen. Solche Störungen können nicht nur durch die Einwirkung von thermischem Stress hervorgerufen werden, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Prozesse, die die Proteinintegrität beeinflussen, beispielsweise oxidativer Stress, chemische Belastungen oder Änderungen des intrazellulären Milieus.

4.4.3 Genexpressionsergebnisse allgemeine Stressantwort

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.



Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
A) PXR	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				
B) HSP70	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 8.

Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für allgemeine Stressantwort; A) PXR und B) HSP70.

Vergleich der Ergebnisse der Markergene für allgemeinen Stress

Nur in einigen Wasserproben wurden leicht erhöhte Genexpressionswerte für PXR gemessen. Für HSP70 konnte in keiner der untersuchten Wasserproben eine erhöhte Genexpression festgestellt werden.

Vergleich der Standorte und des zeitlichen Verlaufs

Im zeitlichen Verlauf der Probenentnahme zeigten die Proben aus dem Juni 2023 an allen Standorten, mit Ausnahme von Surb – Endingen (CW98), leicht erhöhte Expressionswerte für PXR im Vergleich zur Kontrolle.

Zusätzlich wurde für die Auslaufproben des Standorts ARA Oberes Surbtal im Oktober 2023 eine erhöhte Expression gemessen.

Diese leichte Erhöhung der Genexpression könnte auf eine geringfügig erhöhte Belastung mit potenziellen Substraten von PXR hindeuten oder auf eine unspezifische Regulation, die im Zusammenhang mit der gleichzeitig erhöhten Expression von Cyp1a steht.

Die fehlende Regulation von HSP70 weist darauf hin, dass durch die Wasserproben die Proteinintegrität in den Zellen nicht beeinflusst wurde.

4.5 Zelluläre Immunantwort

4.5.1 Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Immunantwort

Für die Untersuchung subletaler Effekte auf das Immunsystem wurde die Regulation von drei Markergenen analysiert. Diese Markergene spielen eine zentrale Rolle in der Immunregulation von Fischen (genaue Funktion siehe Abschnitt 4.5.2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Probeentnahme entlang der Fließrichtung der Surb dargestellt



1. Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA Oberes Surbtal)

An diesem Standort wurde lediglich einmalig eine leicht erhöhte Immunantwort gemessen. Insgesamt kann dieser Abschnitt daher anhand der Ergebnisse hinsichtlich der Fischgesundheit als eher unbedenklich eingestuft werden.

2. ARA Oberes Surbtal (direkte Ausflussprobe)

Alle Proben von diesem Standort führten zu einer verstärkten Immunreaktion in den RTgill-W1-Zellen. Da es sich dabei um unverdünnte ARA-Auslaufproben handelt, müssen diese Ergebnisse gesondert betrachtet werden. Ein direkter Rückschluss auf die Fischgesundheit im Vorfluter ist nicht möglich, da die Proben im Fluss verdünnt werden. Würden jedoch auch direkte Flussproben vergleichbare Effekte hervorrufen, müsste von einer deutlichen Beeinträchtigung der Fischgesundheit ausgegangen werden.

3. Surb – Endingen (CW98, unterhalb der ARA Oberes Surbtal)

An diesem Standort wurde ebenfalls nur einmalig eine leicht erhöhte Immunantwort festgestellt. Auch hier können die Ergebnisse daher insgesamt als eher unbedenklich für die Fischgesundheit eingestuft werden.

4. Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA Surbtal)

Alle Proben von diesem Standort lösten eine leicht erhöhte Immunreaktion in den Zellen aus. Dies weist auf eine mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit hin.

Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
05.06. - 19.06.2023				
28.08. - 11.09.2023				
23.10. - 05.11.2023				
Summe Genexpression				
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht	

Abb. 9. Übersichtsgaphik der zellulären Immunantwort entlang der Fließrichtung: Dargestellt ist die Summe der Genexpression von allen drei gemessenen Markergenen zur Untersuchung der zellulären Immunantwort in der Fischzelle.



4.5.2 Markergene

Tabelle 3. Biomarkergene für die Untersuchung der zellulären Immunantwort

Biomarkergene	Funktion
IL-1b (Interleukin-1 beta)	Das Zytokin Interleukin-1b ist Entzündungsmediator 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.
NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)	NF-kB ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor und Entzündungsmediator, welcher über die Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription abhängiger Gene beeinflusst.
TNF alpha (tumor necrosis factor alpha)	Der Tumornekrosefaktor-alpha reguliert Zytokine und andere Immunzellen, sowie den apoptotischen Zelltod (programmierter Zelltod) und inhibiert die Tumorgenese.

4.5.3 Genexpressionsergebnisse zelluläre Immunantwort

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Ehrendingen (CW98)	Surb - Ehrendingen (CR97)
A) IL-1b	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				
B) NFkB	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				
C) TNFa	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 10. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für zelluläre Immunantwort: A) IL-1b, B) NFkB und C) TNFa.



Vergleich der Ergebnisse der Markergene der zellulären Immunantwort:

Für alle untersuchten Wasserproben der gesamten Messkampagne wurden die höchsten Genexpressionswerte für IL1-b, gefolgt von NFkB und TNFa, gemessen.

Vergleich der Standorte und des zeitlichen Verlaufs:

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Probenentnahme, so führten alle Proben vom Standort ARA Oberes Surbtal zu einer erhöhten Expression von IL1-b sowie zu einer leichten bis moderaten Erhöhung von NFkB und TNFa. Da es sich hierbei um unverdünnte ARA-Auslaufproben handelt, müssen diese Ergebnisse gesondert betrachtet werden. Im natürlichen Vorfluter kommt es durch Verdünnung zu einer Absenkung der Konzentrationen, sodass ein direkter Rückschluss auf mögliche Beeinträchtigungen der Fischgesundheit nicht ohne weiteres möglich ist.

Die Proben unmittelbar oberhalb und unterhalb der ARA Oberes Surbtal (Surb – Ehrendingen, CR94, und Surb – Endingen, CW98) zeigten überwiegend nur leicht erhöhte Expressionswerte für NFkB, während IL1-b und TNFa lediglich geringfügig erhöht waren. Dies deutet auf die insgesamt geringste Beeinträchtigung der Fischgesundheit an diesen beiden Standorten hin. Die Ergebnisse zeigen zudem deutlich, dass die Verdünnung im Fluss einen grossen Einfluss hat, da die Proben vom Standort Surb – Endingen (CW98) die erhöhten Werte aus der direkten ARA-Auslaufprobe nicht mehr widerspiegeln.

Die Proben vom Standort Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA) führten zu einer generell leicht erhöhten Expression von NFkB und TNFa. Dies weist auf eine dauerhaft leichte Stimulation des Fischimmunsystems hin, die durch exogene Faktoren ausgelöst sein könnte. Auffällig ist zudem, dass die Werte an diesem Standort insgesamt höher lagen als an den beiden anderen Flusstandorten (Surb – Ehrendingen, CR94, und Surb – Endingen, CW98).

4.6 Zelluläre Metallbelastung

4.6.1 Zusammenfassung Ergebnisse zelluläre Metallbelastung

Für die Untersuchung von subletalen Effekten, die durch eine erhöhte Metallbelastung hervorgerufen werden, wurde die Regulation von zwei Markergenen analysiert. Diese Markergene spielen eine essenzielle Rolle bei der zellulären Bindung und Detoxifizierung von Schwermetallen (genaue Funktion siehe Abschnitt 4.6.2).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Probeentnahme entlang der Fliessrichtung der Surb dargestellt.

1. Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA Oberes Surbtal)

Alle Wasserproben von diesem Standort zeigten in der Gesamtheit der Genexpressionswerte im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Dies deutet auf keine erhöhte Metallbelastung hin.



2. ARA Oberes Surbtal (direkte Ausflussprobe)

Alle Proben zeigten eine leicht erhöhte Expression der untersuchten Markergene. Dies weist auf eine ganzjährig erhöhte Metallbelastung an diesem Standort hin.

3. Surb – Endingen (CW98, unterhalb der ARA Oberes Surbtal)

Alle Wasserproben von diesem Standort zeigten in der Gesamtheit der Genexpressionswerte im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Dies deutet auf keine erhöhte Metallbelastung hin.

4. Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA Surbtal)

Die Wasserproben von diesem Standort zeigten nur im Zeitraum Juni 2023 eine leicht erhöhte Expression der Markergene. Dies weist auf eine temporär erhöhte Metallkonzentration zu diesem Zeitpunkt hin.

Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
05.06. - 19.06.2023				
28.08. - 11.09.2023				
23.10. - 05.11.2023				
Summe Genexpression				
Kontrollbereich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht	

Abb. 11. Übersichtsdarstellung der zellulären Metallbelastung entlang der Fließrichtung. Dargestellt ist die Summe der Genexpression der beiden gemessenen Markergene zur Untersuchung der zellulären Metallbelastung im Fisch.

4.6.2 Markergene

Tabelle 4. Biomarkergene für die Untersuchung der zellulären Metallbelastung

Biomarkergene	Funktion
MTa (Metallothionein A)	Metallothionein A ist für die Bindung von sowohl physiologischen (z.B. Zink, Kupfer, Selenium), als auch xenobiotischen (z.B. Kadmium, Quecksilber, Silber, Arsen) Schwermetallen verantwortlich. Die Bindung erfolgt über die Thiolgruppen an den Cysteinenden 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) Schwermetallen verantwortlich. Die Bindung erfolgt über die Thiolgruppen an den Cysteinenden des Proteins.



4.6.3 Genexpressionsergebnisse Metallbelastung

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
A) Mta	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				
B) MTb	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 12. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse von Biomarkergenen für zelluläre Metallbelastung: A) MTa, B) MTb.

Bei diesen Markern ist zu beachten das man von einer potentiell erhöhten Metallbelastung ausgehen kann, wenn beide Marker gleichzeitig eine erhöhte Expression aufzeigen. Ist nur MTa reguliert, könnte dies auch ein Hinweis für eine mögliche Glukokortikoidexposition sein (siehe Tabelle 4).

Vergleich der Ergebnisse der Markergene zur Metallbelastung:

Für alle untersuchten Wasserproben der gesamten Messkampagne wurden vergleichbare Genexpressionswerte für die Gene MTa und MTb gemessen (Genfunktionen siehe Tabelle 4).

Vergleich der Standorte und des zeitlichen Verlaufs:

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Probenentnahme, so wiesen alle Proben vom Standort ARA Oberes Surbtal eine leicht erhöhte Expression von MTa und MTb auf. Dies deutet auf eine kontinuierlich leicht erhöhte Metallbelastung in den Proben aus dem ARA-Auslauf hin.

Die Proben unmittelbar oberhalb und unterhalb der ARA Oberes Surbtal (Surb – Ehrendingen, CR94, und Surb – Endingen, CW98) zeigten keine erhöhte Expression der beiden Markergene. Dies weist darauf hin, dass an diesen Standorten keine erhöhte Metallbelastung vorliegt.

Am Standort Surb – Endingen (CR97) wurde eine leichte Erhöhung beider Markergene in den Proben vom Juni sowie eine Erhöhung von MTa in den Proben vom August 2023 festgestellt. Dies deutet auf eine temporär erhöhte Metallbelastung zu diesen Zeitpunkten hin.

Ein Verdacht auf eine erhöhte Glukokortikoidbelastung besteht nicht, da das Markergen GR2 (siehe Abschnitt 4.7) zu keinem Zeitpunkt reguliert war.



4.7 Glukokortikoidbelastung

4.7.1 Markergene

Tabelle 5. Biomarkergen für die Untersuchung von Glukokortikoidbelastung

Biomarkergen	Funktion
GR2 (Glukokortikoidrezeptor 2)	GR, ist ein intrazellulärer Hormonrezeptor, der Glukokortikoide wie Dexamethason Cortisol/Hydrocortison, Prednisolon und andere bindet. Nach der Bindung folgt die Regulierung nach geschalteter Gene.

4.7.2 Genexpressionsergebnisse Glukokortikoidbelastung

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgaphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
GR2	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 13. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens GR2 zur Bestimmung der Glukokortikoidbelastung.

Vergleich von Standort und Zeitverlauf:

Eine leicht erhöhte Expression von GR2 wurde ausschliesslich am Standort ARA Oberes Surbtal für die Proben vom August sowie Oktober 2023 gemessen. Dies weist auf eine möglicherweise erhöhte Glukokortikoidbelastung in diesen Proben zu diesen Zeitpunkten hin.

Die Proben unmittelbar oberhalb und unterhalb der ARA Oberes Surbtal (Surb – Ehrendingen, CR94, und Surb – Endingen, CW98) zeigten keine erhöhte Expression, dies weist auf das Ausbleiben einer Glukokortikoidbelastung hinweist.



Für den Standort Surb – Endingen (CR97) rief nur die Probe vom Juni 2023 eine erhöhte Expression hervor. Dies könnte auf eine geringfügig erhöhte Glukokortikoidbelastung zu diesem Zeitpunkt hindeuten.

4.8 Oxidativer Stress

4.8.1 Markergene

Tabelle 6. Biomarkergen für die Untersuchung von oxidativem Stress

Biomarkergen	Funktion
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.

4.8.2 Genexpressionsergebnisse oxidativer Stress

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgraphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
NrF2	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb.14. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomakergens für oxidativen Stress: NrF2

Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Es wurde in keiner der untersuchten Proben eine erhöhte Expression von NrF2 gemessen. Dies weist darauf hin, dass an keinem der Standorte ein erhöhter oxidativer Stress vorliegt.



4.9 Endokrine Wirkung

4.9.1 Markergene

Tabelle 7. Biomarkergen für die Untersuchung von endokriner Wirkung

Biomarkergen	Funktion
ERa (Estrogen receptor alpha)	Der Estrogenrezeptor ERa ist ein Steroidrezeptor der durch Steroidhormone wie Estrogen oder Xenoestrogen aktiviert wird.

4.9.2 Genexpressionsergebnisse endokrine Wirkung

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probenzeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgaphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
ERa	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 15. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens ERa für endokrine Wirkung.

Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine leicht erhöhte Expression von ERα wurde ausschliesslich in den Proben vom Standort ARA Oberes Surbtal im Juni und Oktober 2023 gemessen. Dies könnte auf eine geringfügig erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen in diesen Zeiträumen hindeuten.

Alle anderen Proben von den Flussstandorten zeigten keine erhöhte Expression, was auf das Fehlen einer Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen hinweist.



4.10 Apoptose (programmierter Zelltod)

4.10.1 Markergene

Tabelle 8. Biomarkergen für die Untersuchung Apoptose

Biomarkergen	Funktion
p53 (Tumor suppressor p53)	Der Tumorsuppressor p53 spielt eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose (programmierter Zelltod) sowie der DNA-Reparatur.

4.10.2 Genexpressionsergebnisse Apoptose

Die Ergebnisse der Genexpression pro Gen von allen Probezeitpunkten sind im Folgenden als vereinfachte Übersichtsgaphiken – «Heatmaps» dargestellt.

Detaillierte Auswertung siehe Appendix A4.

Resultate Genexpression					
Markergen	Wasserproben	Surb - Ehrendingen (CR94)	ARA Oberes Surbtal (ARA-Auslauf)	Surb - Endingen (CW98)	Surb - Endingen (CR97)
p53	05.06. - 19.06.2023				
	28.08. - 11.09.2023				
	23.10. - 05.11.2023				

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle				
0 ↔ 0.5	0.5 ↔ 1.5	1.5 ↔ 2	2 ↔ 5	> 5
niedriger	gleich	leicht erhöht	erhöht	stark erhöht

Abb. 16. Heatmap-Analyse der Genexpressionsergebnisse des Biomarkergens p53 für Apoptose-Effekte.

Vergleich Standort und Zeitverlauf:

Eine leicht erhöhte Expression von p53 wurde in allen Proben vom Standort ARA Oberes Surbtal gemessen. Dies weist auf eine Belastung mit genotoxisch wirkenden Substanzen hin, wie beispielsweise aromatische Amine, Nitrosamine, Mykotoxine, Schwermetalle, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Organophosphate, Carbamate, bestimmte Herbizide oder Fungizide. Da es sich hierbei um ARA-Auslaufproben handelt, kann eine mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit nicht direkt beurteilt werden, da die Proben im Fluss verdünnt werden.

Am Standort Ehrendingen (CR94) oberhalb der ARA Surbtal wurde in den Proben vom Juni 2023 eine erhöhte Expression von p53 gemessen. Am Standort unterhalb der ARA (CW98) war dieser Effekt jedoch nicht nachweisbar. Dies deutet auf eine leicht erhöhte Belastung mit genotoxisch wirkenden Substanzen oberhalb der ARA hin, die nicht durch die Abwassereinleitung verursacht wurde.



Auch am Standort Surb – Endingen (CR97) wurde im Juni 2023 eine erhöhte Expression von p53 festgestellt. Dies weist darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt an diesem Standort eine geringfügig erhöhte Belastung mit genotoxisch wirkenden Substanzen vorlag.

5 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSE (PCA)

Die PCA-Analyse wurde mit allen Daten aus allen Proben durchgeführt, sowohl für die Bestimmung der akuten Toxizität als auch für die Genexpressionsdaten sämtlicher Biomarkergene. Im Folgenden sind alle gemessenen Endpunkte für alle Proben zu allen Zeitpunkten in einem PCA-Plot dargestellt (Abb. 16). Zusätzlich wurden die einzelnen Standorte zur besseren Übersicht in Bezug auf die zeitliche Verteilung separat dargestellt (Abb. 17).

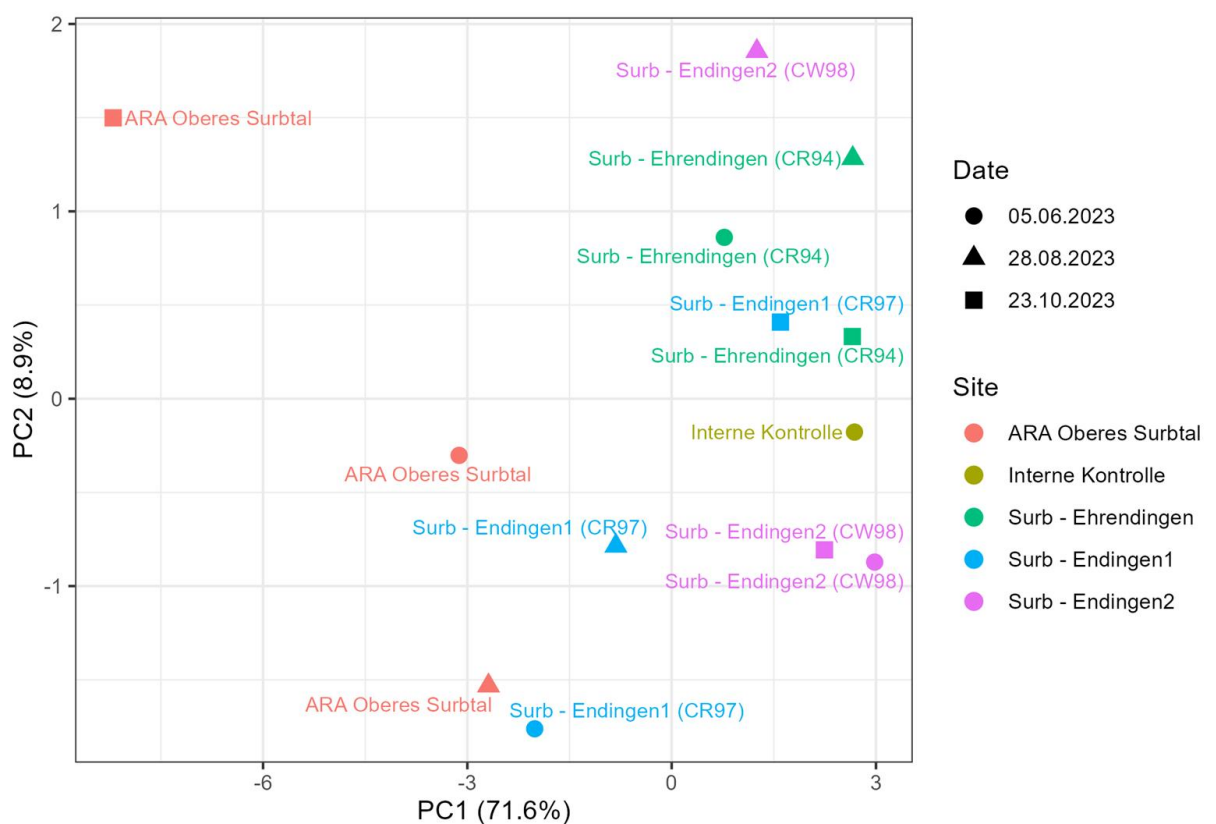


Abb. 17. Principal Component Analyse aller Endpunkte für die akute Toxizität und Genexpressionsdaten aller getesteten Biomarker für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte.



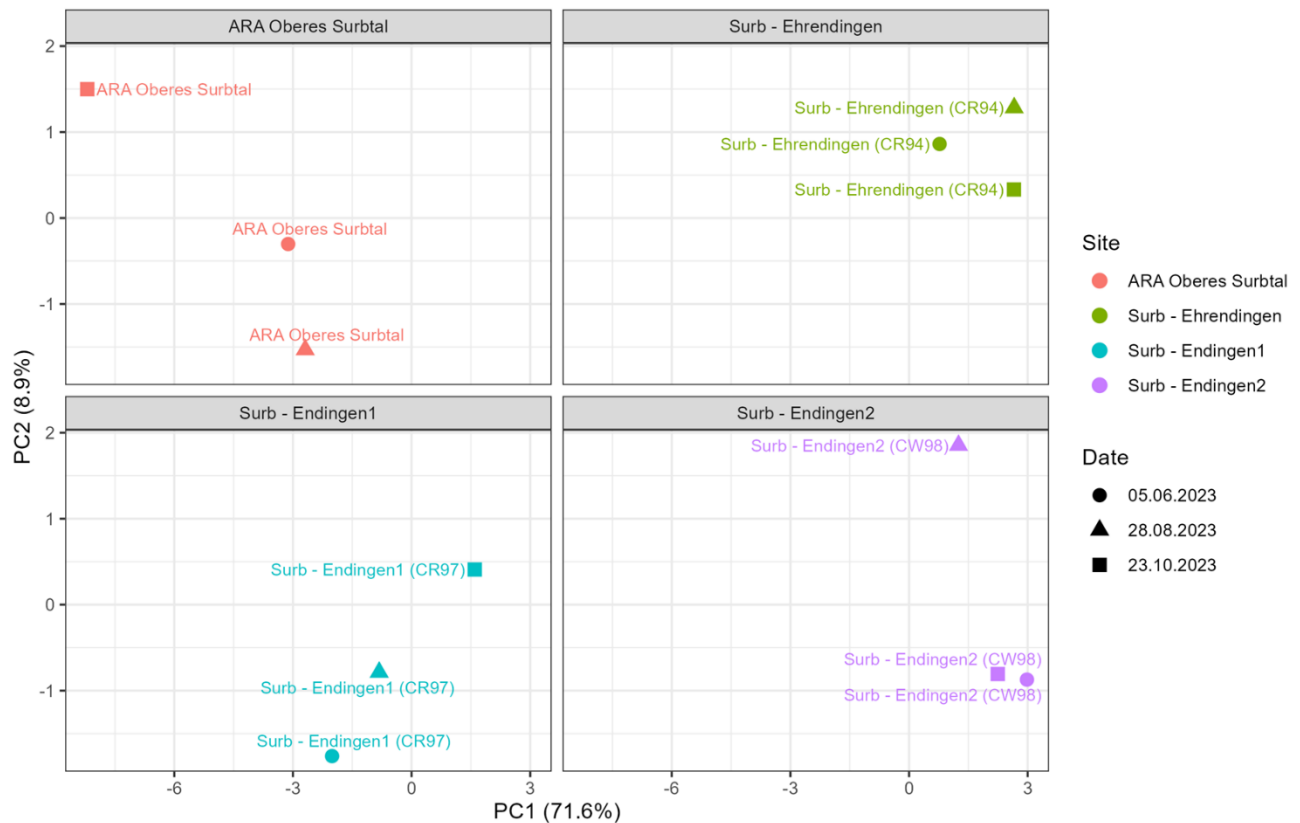


Abb. 18. Principal Component Analyse aller Endpunkte für die akute Toxizität und Genexpressionsdaten aller getesteten Biomarker für alle Beprobungsstandorte und Zeitpunkte. Facettierte Darstellung nach den einzelnen Standorten.

Erklärung der Achsen:

PC1 (71.6 %) erklärt den weitaus grössten Teil der Varianz. Die Trennung entlang dieser Achse ist daher am aussagekräftigsten.

PC2 (8.9 %) trägt deutlich weniger bei, zeigt aber kleinere Unterschiede zwischen Zeitpunkten und Standorte

Standortmuster und Deutung:

Am Standort Surb – Ehrendingen (CR94, oberhalb der ARA) liegen die Proben geschlossen im positiven Bereich von PC1 und gruppieren sich relativ nahe an der internen Kontrolle. Dies weist darauf hin, dass oberhalb des ARA-Ausflusses die Genexpressionsmuster sowie die akute Toxizität weitgehend der internen Kontrolle entsprechen. Insgesamt deutet dies auf eine geringe Belastung und damit auf eine geringe Beeinträchtigung der Fischgesundheit hin.

Für die Proben des Standorts ARA Oberes Surbtal zeigt sich eine deutliche Abgrenzung von allen anderen Proben. Sie liegen klar im negativen Bereich von PC1. Auf Grundlage der Genexpressionsdaten sowie der klaren Separation im PCA-Plot weisen diese Proben auf eine erhöhte Belastung durch organische Schadstoffe hin.

Die Proben vom Standort Surb – Endingen (CW98, direkt unterhalb der ARA Oberes Surbtal) liegen näher an der internen Kontrolle als an den ARA-Proben, zeigen jedoch eine ausgeprägtere saisonale Streuung. Dies deutet auf einen Verdünnungseffekt des ARA-Ausflusses bis zu



diesem Standort hin, was mit einer geringeren Schadstoffbelastung und einer entsprechend reduzierten Beeinträchtigung der Fischgesundheit einhergeht.

Am Standort Surb – Endingen (CR97, unterhalb der zweiten, nicht beprobten ARA) gruppieren sich die Proben näher bei den ARA-Auslaufproben (auf der negativen Seite von PC1) als die Proben von CW98. Dies weist auf einen stärkeren Einfluss durch Abwasser hin. Gleichzeitig ist die zeitliche Variabilität zwar vorhanden, jedoch weniger stark ausgeprägt als bei CW98. Dies spricht eher für eine kontinuierliche Belastung durch die zweite ARA.

Zusammenfassend bestätigt die PCA, dass die Proben der ARA Oberes Surbtal die stärkste Belastung aufweisen, was angesichts der Herkunft aus dem ARA-Ausfluss zu erwarten war. Oberhalb bestehen keine Auffälligkeiten, unterhalb sind ebenfalls geringere Effekte erkennbar. Allerdings zeigt CR97 eine stärkere Nähe zu den ARA-Proben, was auf einen kontinuierlichen Einfluss einer weiteren ARA hinweist, während CW98 näher an der internen Kontrolle liegt.

6 ANMERKUNG

Die Aussagekraft der Genexpressionsanalyse könnte mittels Korrelation von Daten durchgeführten Begleitanalytik oder anderen gemessenen Wasserparametern verstärkt bzw. bestätigt werden.

Winterthur, 08.12.2025

aQuaTox-Solutions GmbH



Dr. Stephan Fischer

APPENDIX

A1: Referenzen

A2: Informationen untersuchte Wasserproben

A3: Detaillierte Darstellung Ergebnisse akute Toxizität

A4: Detaillierte Darstellung Ergebnisse Genexpression

A5: Rohwerte und ausgewertete Werte Genexpressionsanalyse (separate Excel-Datei)



A1: REFERENZEN

Solhaug, K. A., Lindholm, L., Vike, A. K., Goksøyr, A., & Olsvik, P. A. (2023). The piscicide rotenone is cytotoxic to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelial cells (RTgill-W1). *Toxicology in Vitro*, 85, 105530. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105530>

Zoellig, E., Eggen, R. I. L., Junghans, M., & Schirmer, K. (2017). Combined assessment of estrogenic activity in wastewater and surface water samples by chemical analysis and in vitro bioassays (aQua & GAS project). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(11), 3018–3028. <https://doi.org/10.1002/etc.3890>

Kienle, C., Werner, I., Fischer, S., Lüthi, C., Schifferli, A., Besselink, H., Langer, M., McArdell, C. S., & Vermeirssen, E. L. M. (2022). Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant with ozonation and different post-treatments using a broad range of in vitro and in vivo bioassays. *Water Research*, 212, 118084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118084>

ISO 21115:2019. Water quality — Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1). International Organization for Standardization, Geneva. <https://www.iso.org/standard/70081.html>



A2: INFORMATIONEN UNTERSUCHTE WASSERPROBEN

Allgemeine Informationen

Tabelle A1. Allgemeine Informationen zu den Wasserproben

	RTgill-W1 Zelllinientest nach ISO 21115 und zusätzliche Genexpressionsanalyse in RTgill-W1 Zellen	
Wasserproben:	Lieferant:	Abteilung für Umwelt Abfallwirtschaft, Altlasten, Umweltlabor und Oberflächengewässer Entfelderstrasse 22 5001 Aarau
	Inhalt:	ca. 500 mL pro Wasserproben (gekühlt)
	Lagerung:	-20 ± 4 °C
	Probenerhalt:	Siehe Punkt 3.2
	Testorganismus:	RTgill-W1 Zellen (Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>))
Testort:	aQuaTox-Solutions GmbH / Else-Züblin Strasse 11/CH-8404 Winterthur	



Wasserprobeneingang und Probenbezeichnung

Tabelle A2. Wasserprobeneingang und Probenbezeichnung aQuatox-solutions GmbH

Datum der Probenahme		Probenbezeichnung Auftraggeber	Probeneingang aQuatox-Solutions	Probenbezeichnung aQuatox-Solutions
05.06. 19.06.2023	-	ARA Oberes Surbtal	20.06.2023	ABPTS0001_1
05.06. 19.06.2023	-	Surb - Endingen (CR97)	20.06.2023	ABPTS0001_2
05.06. 19.06.2023	-	Surb - Ehrendingen (CR94)	20.06.2023	ABPTS0001_3
05.06. 19.06.2023	-	Surb - Endingen (CW98)	20.06.2023	ABPTS0001_4
28.08. 11.09.2023	-	ARA Oberes Surbtal	12.09.2023	ABPTS0001_23
28.08. 11.09.2023	-	Surb - Endingen (CR97)	12.09.2023	ABPTS0001_24
28.08. 11.09.2023	-	Surb - Ehrendingen (CR94)	12.09.2023	ABPTS0001_25
28.08. 11.09.2023	-	Surb - Endingen (CW98)	12.09.2023	ABPTS0001_26
23.10. 05.11.2023	-	ARA Oberes Surbtal	07.11.2023	ABPTS0001_34
23.10. 06.11.2023	-	Surb - Ehrendingen (CR94)	07.11.2023	ABPTS0001_35
23.10. 06.11.2023	-	Surb - Endingen (CR97)	07.11.2023	ABPTS0001_36
23.10. 06.11.2023	-	Surb - Endingen (CW98)	07.11.2023	ABPTS0001_37



Daten Testdurchführung

Tabelle A3. Informationen zur Testdurchführung

Wasserprobe	RTgill-W1-Test	Genexpressionsanalyse
ABPTS0001_1	24.04.24 – 25.04.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 15.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_2	24.04.24 – 25.04.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 15.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_3	24.04.24 – 25.04.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 15.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_4	13.05.24-14.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 15.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_23	13.05.24-14.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 15.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_24	16.05.24-17.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_25	16.05.24-17.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_26	16.05.24-17.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_34	27.05.24-28.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_35	27.05.24-28.05.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_36	03.06.24-04.06.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24 / Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25
ABPTS0001_37	03.06.24-04.06.24	Exposition:20.06.24-21.06.24 qPCR-Messung: 17.10.24/ Wiederholung für ERa und Cyp3a 28.01.25



A3: DETAILLIERTE DARSTELLUNG ERGEBNISSE AKUTE TOXIZITÄT

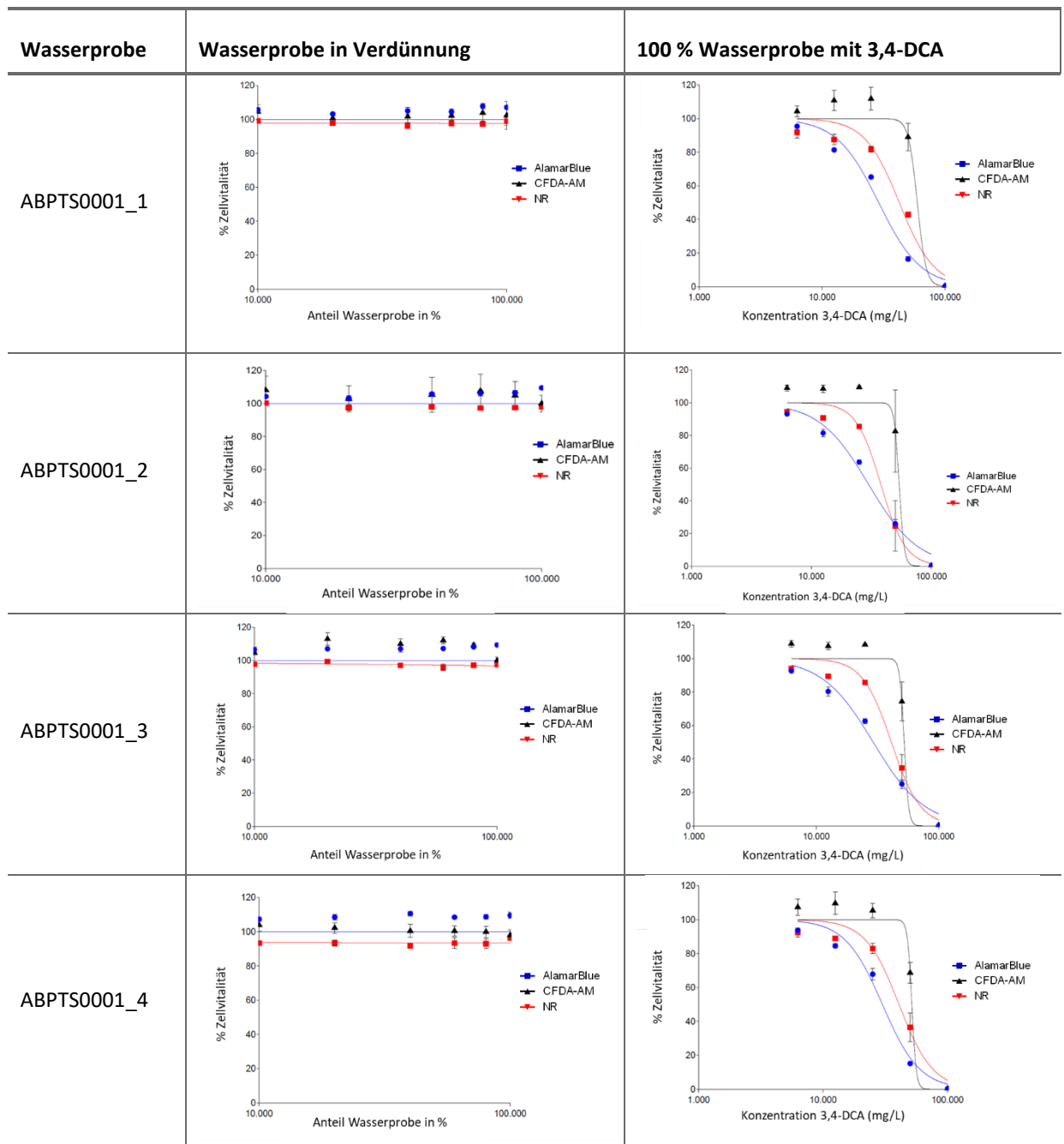
Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität Wasserproben vom 05.06. - 19.06.2023

Tabelle A4. Zusammenfassung RTgill-W1-Zelllinientest-Ergebnisse der Wasserproben vom 05.06. - 19.06.2023

Probe	Standort	Resultat	Kommentar
AB-PTS0001_1	ARA Oberes Surbtal	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien
AB-PTS0001_2	Surb - Endingen (CR97)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien
AB-PTS0001_3	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien
AB-PTS0001_4	Surb - Endingen (CW98)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien



Tabelle A5. Konzentrations-Wirkungskurven, gemessen nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 05.06. - 19.06.2023



Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungskurven der Wasserprobe in Verdünnungen (linke Spalte) und der 100 % Wasserprobe versetzt mit einer Konzentrationsreihe von 3,4-DCA Positivkontrolle (rechte Spalte). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Triplikate an, die für jede Testkonzentration bestimmt wurden.



Tabelle A6. Bestimmung der Zellviabilität nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 05.06. - 19.06.2023

Wasserprobe	Wasserprobe in Verdünnung				100 % Wasserprobe mit 3,4-DCA			
	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
ABPTS0001_1	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	28.85	59.43	42.43
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_2	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	29.95	53.90	37.89
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_3	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	29.17	52.27	41.06
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_4	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	29.95	51.62	40.71
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				

*EC50-Werte in grüner Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien, EC50-Werte in roter Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien nach ISO-Standard 21115 nicht (siehe 3.4.1)



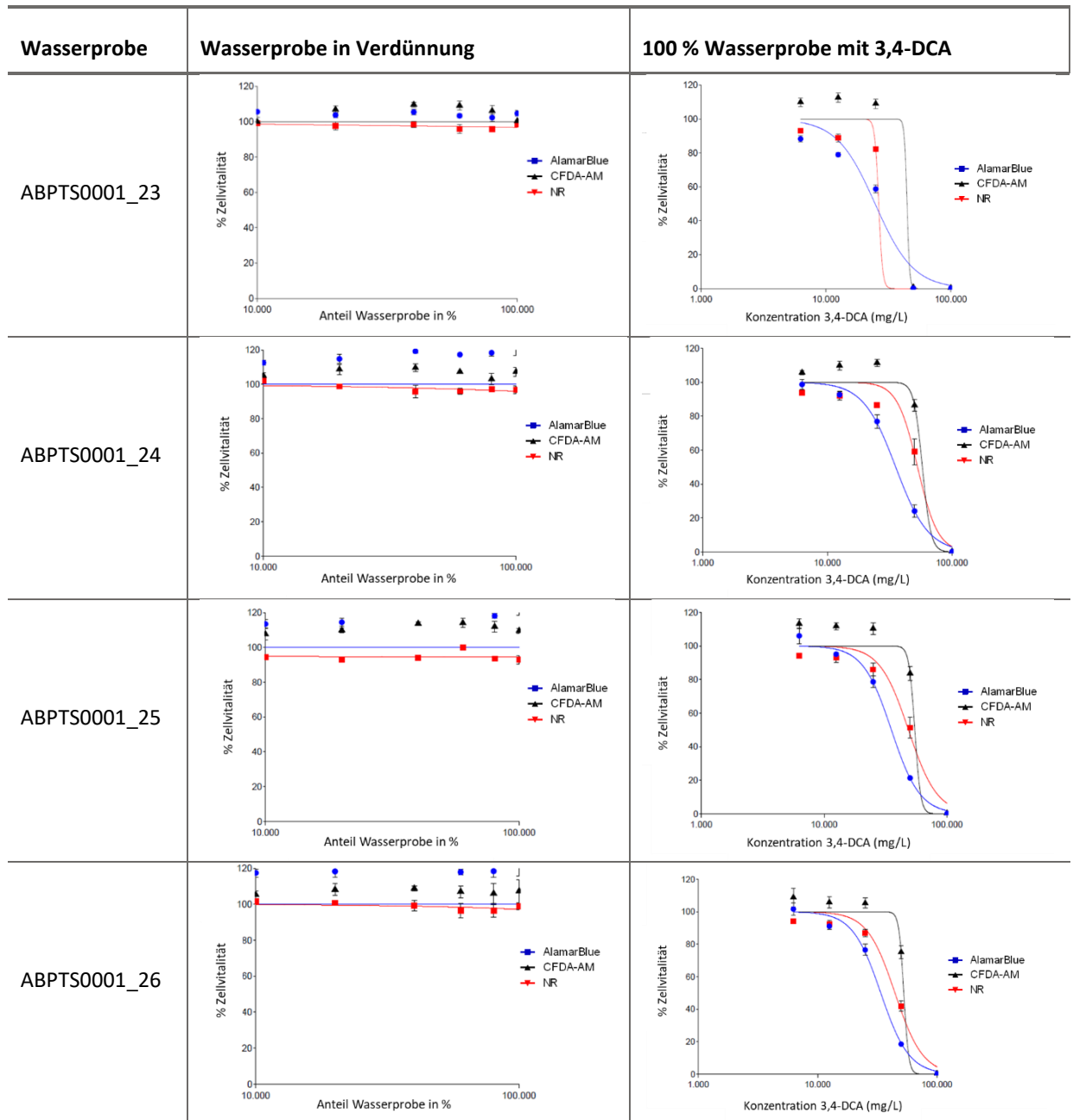
Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität Wasserproben vom 28.08. - 11.09.2023

Tabelle A7. Auswertung RTgill-W1-Zellinientest der Wasserproben vom 28.08. - 11.09.2023

Probe	Standort	Resultat	Kommentar
AB-PTS0001_23	ARA Oberes Surbtal	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Leichter Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue (metabolische Aktivität) nicht
AB-PTS0001_24	Surb - Endingen (CR97)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien
AB-PTS0001_25	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien
AB-PTS0001_26	Surb - Endingen (CW98)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Kein Matrixeffekt	• Zellvitalität $\geq 90\%$ • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien



Tabelle A8. Konzentrations-Wirkungskurven, gemessen nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 28.08. - 11.09.2023



Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungskurven der Wasserprobe in Verdünnungen (linke Spalte) und der 100 % Wasserprobe versetzt mit einer Konzentrationsreihe von 3,4-DCA Positivkontrolle (rechte Spalte). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Triplikate an, die für jede Testkonzentration bestimmt wurden.



TabelleA9. Bestimmung der Zellviabilität nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 28.08. - 11.09.2023

Wasserprobe	Wasserprobe in Verdünnung				100 % Wasserprobe mit 3,4-DCA			
	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
ABPTS0001_23	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	24.73	44.54	26.42
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_24	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	35.31	57.77	52.85
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_25	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	35.24	54.63	48.52
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_26	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	33.76	52.66	44.41
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				

EC50-Werte in grüner Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien, EC50-Werte in roter Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien nach ISO-Standard 21115 nicht (siehe 3.4.1)



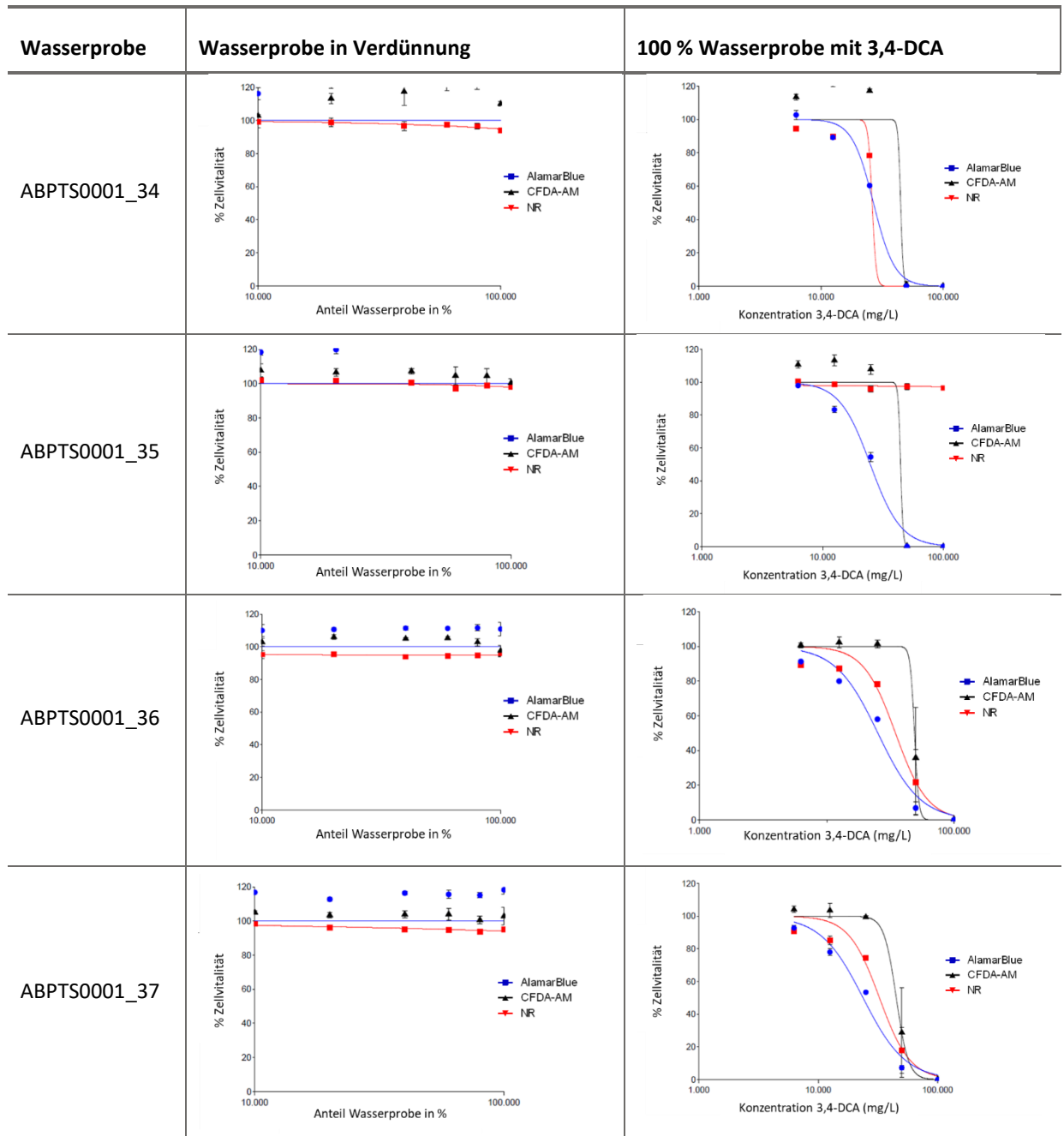
Detaillierte Ergebnisdarstellung akute Toxizität Wasserproben vom 23.10. - 06.11.2023

Tabelle A10. Auswertung RTgill-W1-Zellinientest der Wasserproben vom 23.10. - 06.11.2023

Probe	Standort	Resultat	Kommentar
AB-PTS0001_34	ARA Oberes Surbtal	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Leichter Matrixeffekt	• Zellvitalität ≥ 90 % • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue (metabolische Aktivität) nicht
AB-PTS0001_35	Surb - Endingen (CR97)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Leichter Matrixeffekt	• Zellvitalität ≥ 90 % • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue (metabolische Aktivität) nicht
AB-PTS0001_36	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Leichter Matrixeffekt	• Zellvitalität ≥ 90 % • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue (metabolische Aktivität) nicht
AB-PTS0001_37	Surb - Endingen (CW98)	Keine akute Toxizität Keine subletalen Effekte Leichter Matrixeffekt	• Zellvitalität ≥ 90 % • Die Positivkontrolle in der 100 %-Wasserprobe erfüllt die Gültigkeitskriterien für AlamarBlue (metabolische Aktivität) nicht



Tabelle A11. Konzentrations-Wirkungskurven, gemessen nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 23.10. - 06.11.2023



Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungskurven der Wasserprobe in Verdünnungen (linke Spalte) und der 100 % Wasserprobe versetzt mit einer Konzentrationsreihe von 3,4-DCA Positivkontrolle (rechte Spalte). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der technischen Triplikate an, die für jede Testkonzentration bestimmt wurden.



Tabelle A12. Bestimmung der Zellviabilität nach 24 h Exposition mit den Wasserproben vom 23.10. - 06.11.2023

Wasserprobe	Wasserprobe in Verdünnung				100 % Wasserprobe mit 3,4-DCA			
	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red	Endpunkt	AlamarBlue	CFDA-AM	Neutral Red
ABPTS0001_34	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	24.73	44.54	26.42
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_35	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	24.82	44.24	N.A.
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_36	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	25.22	48.89	34.67
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				
ABPTS0001_37	Zellvitalität (%)	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	Alle Konz. ≥ 90 %	EC50 (mg/L)*	23.71	44.98	32.53
	LID (Vol %)	> 100	> 100	> 100				

EC50-Werte in grüner Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien, EC50-Werte in roter Farbe erfüllen die Testgültigkeitskriterien nach ISO-Standard 21115 nicht (siehe 3.4.1)



A4 DETAILLIERTE BESCHREIBUNG ERGEBNISSE GENEXPRESSION

Tabelle A13. Auswertung Genexpression Biotransformation

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	Cyp1a, Cyp3a, Cyp51, GST und SULT	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a, Cyp3a, Cyp51, GST und SULT
	Surb - Endingen (CR97)	Cyp1a, Cyp3a, Cyp51 und SULT	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a, Cyp3a, Cyp51 und SULT
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Cyp1a, Cyp51 und SULT	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a, Cyp51 und SULT
	Surb - Endingen (CW98)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	Cyp1a, Cyp3a und GST	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a, Cyp3a und GST
	Surb - Endingen (CR97)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a
	Surb - Endingen (CW98)	Cyp1a und GST	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a und GST
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	Cyp1a, Cyp3a, Cyp51, GST und SULT	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a, Cyp3a, Cyp51, GST und SULT
	Surb - Endingen (CR97)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a
	Surb - Endingen (CW98)	Cyp1a	Erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp1a



Tabelle A14. Auswertung Genexpression allgemeine Stressantwort

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	PXR	Hinweis auf leicht erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von PXR
	Surb - Endingen (CR97)	PXR	Hinweis auf leicht erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von PXR
	Surb - Ehrendingen (CR94)	PXR	Hinweis auf leicht erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von PXR
	Surb - Endingen (CW98)	Keine	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	PXR	Hinweis auf leicht erhöhte Belastung mit potentiellen Substraten von PXR
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Kein Hinweis auf erhöhte allg. Stressantwort



Tabelle A15. Auswertung Genexpression zelluläre Immunantwort

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	IL1-b, NFkB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	Surb - Endingen (CR97)	IL1-b und NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Ehrendingen (CR94)	IL1-b und NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine Beeinträchtigung der Fischgesundheit
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	IL1-b, NFkB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	Surb - Endingen (CR97)	IL1-b und NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Ehrendingen (CR94)	NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Endingen (CW98)	NFkB und TNFa	Leicht erhöhte Immunreaktion
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	IL1-b, NFkB und TNFa	Erhöhte Immunreaktion. Bei längerer Belastung mögliches Auftreten von Entzündungsreaktionen einhergehend mit Gewebeschädigungen.
	Surb - Endingen (CR97)	IL1-b und NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Ehrendingen (CR94)	NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion
	Surb - Endingen (CW98)	NFkB	Leicht erhöhte Immunreaktion



Tabelle A16. Auswertung Genexpression Metallbelastung

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	MTa und MTb	Leicht erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	MTa und MTb	Leicht erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Metallbelastung
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	MTa und MTb	Leicht erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	MTa	Eventuell erhöhte Schwermetallbelastung? Keine Regulierung Glukokortikoidmarker GR2!
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	MTa und MTb	Leicht erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Schwermetallbelastung



Tabelle A17. Auswertung Genexpression Glukokortikoidbelastung

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	GR 2	Leicht erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	GR2	Leicht erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung!
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	GR2	Leicht erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Glukokortikoidbelastung



Tabelle A18. Auswertung Genexpression oxidativen Stress

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter oxidativer Stress



Tabelle A19. Auswertung Genexpression endokrine Wirkung

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	ERa	Leicht erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	ERa	Leicht erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhte Belastung mit östrogen-aktiven Substanzen



Tabelle A20. Auswertung Genexpression Apoptose

Wasserproben	Standort	Erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle	Deutung
05.06. - 19.06.2023	ARA Oberes Surbtal	p53	Leicht erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
	Surb - Endingen (CR97)	p53	Leicht erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
	Surb - Ehrendingen (CR94)	p53	Leicht erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
28.08. - 11.09.2023	ARA Oberes Surbtal	p53	Leicht erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar
23.10. - 06.11.2023	ARA Oberes Surbtal	ERa	Leicht erhöhter Apoptose-Effekte messbar.
	Surb - Endingen (CR97)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar
	Surb - Ehrendingen (CR94)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar
	Surb - Endingen (CW98)	Keine erhöhte Regulation messbar	Keine erhöhter Apoptose-Effekte messbar

