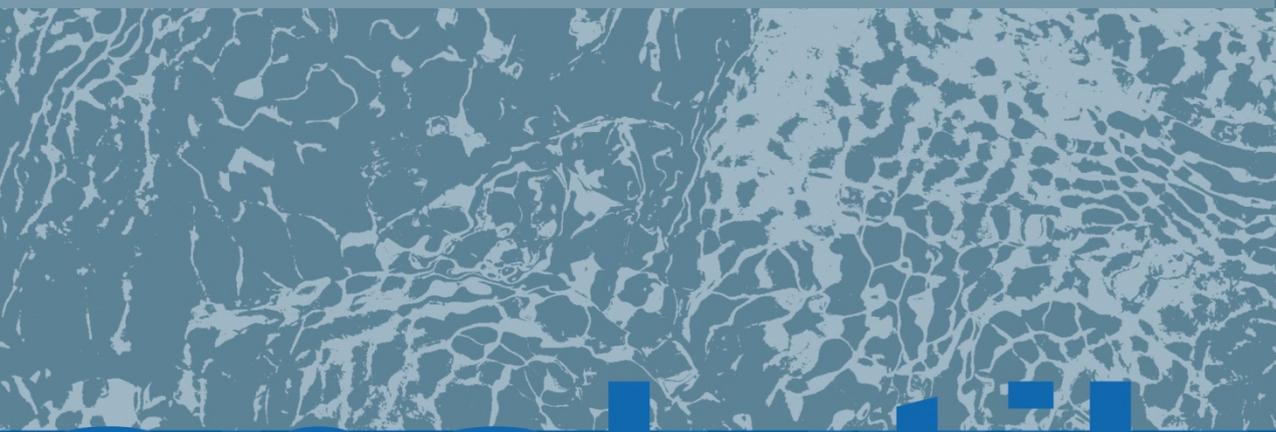




Bayerisches Landesamt für  
Umwelt



# Ermittlung des Potenzials weitergehender Abwasserreinigungsmaßnahmen auf die Reduktion endokrin wirksamer Substanzen



# analytik





Bayerisches Landesamt für  
Umwelt



# **Ermittlung des Potenzials weitergehender Abwasserreinigungsmaßnahmen auf die Reduktion endokrin wirksamer Substanzen**

## Impressum

Ermittlung des Potenzials weitergehender Abwasserreinigungsmaßnahmen auf die Reduktion endokrin wirksamer Substanzen

### Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: 0821 9071-0

Fax: 0821 9071-5556

E-Mail: [poststelle@lfu.bayern.de](mailto:poststelle@lfu.bayern.de)

Internet: [www.lfu.bayern.de](http://www.lfu.bayern.de)

### Bearbeitung/Text/Konzept:

LfU, Referat 77, Dr. Stefanie Huber, Willi Kopf, Dr. Margit Schade

### Redaktion:

LfU, Referat 77, Dr. Stefanie Huber, Willi Kopf, Dr. Margit Schade

### Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt

### Stand:

Mai 2013

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Der YES (Yeast Estrogen Screen)-Test</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Normung</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
4.1	Proben, Probenvorbereitung, Aufkonzentrierung	6
4.2	Testmedien	8
4.3	Teststamm	10
4.4	Testdurchführung	10
4.4.1	Hefekultur	10
4.4.2	Vorarbeiten und Plattenbelegung	10
4.4.3	Erster Testteil	11
4.4.4	Zweiter Testteil	12
4.4.5	Auswertung	12
4.4.6	Besonderheit bei der Untersuchung der Konzentrate	13
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>14</b>
5.1	Etablierung des Testsystems, Ringversuch	14
5.2	Auswirkungen von Probenlagerung und Filtration	14
5.3	Kommunale Abwässer	14
5.3.1	Zuläufe kommunaler Kläranlagen – native Proben	14
5.3.2	Abläufe kommunaler Kläranlagen – native Proben	15
5.3.2.1	Anlagen ohne weitergehende Abwasserreinigung	16
5.3.2.2	Anlagen mit weitergehender Abwasserreinigung	17
5.3.3	Flusswasser und Abläufe kommunaler Anlagen – Konzentrate	18
5.3.3.1	Methodenetablierung	18
5.3.3.2	Anlage ohne weitergehende Abwasserreinigung, Vergleich YES-Test und E-Screen Assay	19
5.3.3.3	Anlagen mit weitergehender Abwasserreinigung	20
5.4	Industrielle Abwässer	23

---

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>24</b>
6.1	Probenlagerung und Filtration	24
6.2	Kommunale Kläranlagen	24
6.2.1	Untersuchung nativer Proben	24
6.2.2	Untersuchung aufkonzentrierter Proben	25
6.2.2.1	Etablierung der Methode und erste Anwendungen	25
6.2.2.2	Weitergehende Abwasserreinigung	27
6.2.3	Reduktion estrogener Wirkungen in den Kläranlagen	28
6.3	Industrielle Kläranlagen	29
6.4	Eignung des YES-Testsystems zur Untersuchung von Abwasser	30
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>31</b>
	<b>Literatur</b>	<b>32</b>

## 1 Einleitung

Oberflächengewässer werden über kommunale und industrielle Abwässer mit einer Vielzahl von anthropogenen Spurenstoffen belastet. Eine wichtige Gruppe sind dabei hormonell (endokrin) wirksame Substanzen. Hormone regulieren im tierischen und menschlichen Organismus zahlreiche physiologische Prozesse, wie z. B. Stoffwechsel und Entwicklung. Für Entwicklungsprozesse sind die Sexualhormone von zentraler Bedeutung. Wichtige männliche Sexualhormone sind Androgene, wichtige weibliche Hormone Estrogene und Gestagene. Neben den natürlichen Hormonen gelangen auch synthetische Sexualhormone (z. B. aus Medikamenten zur Empfängnisverhütung) über menschliche Ausscheidungen ins Abwasser. Daneben gibt es Industriechemikalien (z. B. Bisphenol A, Phthalate, Alkylphenole), Pestizide und Phytohormone, die ebenfalls endokrin wirksam sind.

Anthropogene Spurenstoffe werden bei der konventionellen Abwasserreinigung häufig nur unvollständig abgebaut oder entfernt. Daher stellt sich die Frage, ob zusätzliche Maßnahmen zur weitergehenden Abwasserreinigung eingesetzt werden sollen. Als Techniken stehen beispielsweise UV-Bestrahlung, Aktivkohlebehandlung und Ozonierung zur Verfügung.

Ein Hauptvertreter der hormonell wirksamen Stoffe sind die estrogen wirksamen Substanzen. Neben der chemischen Analytik können biologische Wirktests zur Detektion eingesetzt werden. Wirktests ermöglichen die Erfassung von Schadwirkungen in Umweltproben unbekannter Zusammensetzung und bilden die Grundlage für die ökotoxikologische Bewertung von Substanzen. Mit ihnen können zudem additive und synergistische Effekte verschiedener Chemikalien erfasst werden.

In diesem Projekt wurde ein biologischer Test zur Erfassung estrogener Wirkungen in Umweltproben, der YES (Yeast Estrogen Screen)-Test, etabliert und im Rahmen des DIN-Arbeitskreises „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ an der internationalen Normung des Verfahrens mitgearbeitet. Um einen Überblick über die aktuelle Belastungssituation in Bayern zu erhalten, wurden zahlreiche Zu- und Ablaufproben von verschiedenen Kläranlagen und einige Proben aus Fließgewässern mit dem YES-Test untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Beantwortung der Frage, inwieweit bereits vorhandene Maßnahmen zur weitergehenden Abwasserreinigung ungezielt auch die estrogen Aktivität in den Kläranlagenabläufen reduzieren.

## 2 Der YES (Yeast Estrogen Screen)-Test

Der YES-Test gehört zu einer Gruppe von Tests, die als rekombinante Reporter-Gen-Assays bezeichnet werden. Für den YES-Test gibt es verschiedene methodische Ansätze und Testorganismen (z. B. McDonnell et al. 1991a, McDonnell et al. 1991b, ROUTLEDGE & SUMPTER 1996). Im Rahmen dieses Projekts wurden mit der Vorschrift und dem Teststamm, die auf McDonnell zurückgehen, gearbeitet.

Testorganismus ist ein gentechnisch veränderter Stamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit zwei Plasmiden. Das Rezeptorplasmid trägt das Gen für den menschlichen Estrogenrezeptor. Das Reporterplasmid enthält ein estrogenes Antwortgen, an welches das sogenannte lacZ-Gen gekoppelt ist. Das lacZ-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Bindet eine estrogen Substanz an den Estrogenrezeptor, wird das lacZ-Gen induziert. Die daraufhin von den Hefezellen produzierte  $\beta$ -Galaktosidase setzt einen im Testmedium enthaltenen Farbstoff (2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, s. 4.2) um. Die Intensität des gebildeten Farbstoffes (Gelbfärbung) korreliert direkt mit dem Vorhandensein estrogen wirksamer Substanzen in der Probe.

### 3 Normung

Nachdem in den 2000er Jahren der Versuch einer Normung des YES-Verfahrens gescheitert war, wurde im November 2010 der DIN-Arbeitskreis „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ (NA 119-01-03-05-09) neu gegründet. Die Mitglieder des Arbeitskreises wenden verschiedene *in vitro*-Testverfahren zum Nachweis estrogenen Wirkungen an. Daher wurde beschlossen, neben einem internationalen Normentwurf für den YES-Test parallel auch andere Verfahren wie E-Screen Assay, ER-Calux® Assay und A-YES®-Test zu standardisieren.

Besonders beim YES-Test gibt es eine Vielzahl von Testvorschriften, die meist Variationen der ursprünglichen Verfahren nach McDonnell und Sumpter (s. 2) darstellen. Der Arbeitskreis versucht daher, aus den existierenden Methoden-Protokollen ein einheitliches Verfahren zu erstellen, das als „New Work Item Proposal (NWIP)“ bei ISO (International Organization for Standardization) eingereicht werden kann.

Im Unterschied zu vielen anderen Schadstoffen können endokrin wirksame Substanzen schon in äußerst geringen Konzentrationen schädliche Auswirkungen haben. Daher müssen die Nachweissysteme besonders empfindlich sein. Die Frage, ob Proben auch in aufkonzentrierter Form untersucht werden sollten, stellt sich in diesem Zusammenhang auch im Hinblick auf eine Normung immer wieder. Dabei wurde auch ein Forschungsbedarf zu methodischen Aspekten der Aufkonzentrierung von Umweltproben für biologische Wirktests offensichtlich.

Während der gesamten Projektlaufzeit wurden neben der Untersuchung von Abwasserproben immer wieder Versuche zu Fragestellungen, die sich im Arbeitskreis ergaben, durchgeführt. Diese Versuche werden hier nicht im Einzelnen dargestellt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Proben, Probenvorbereitung, Aufkonzentrierung

Es wurden Zu- und Ablaufproben von zehn kommunalen Kläranlagen sowie Ablaufproben von industriellen Kläranlagen und Flusswasserproben untersucht. Acht der kommunalen Anlagen waren mit weitergehenden Reinigungsstufen ausgestattet (s. Tab. 1), die jedoch nicht gezielt zur Elimination von polaren Spurenstoffe bestimmt waren. Dennoch sollte der Beitrag solcher Anlagen zur Reduzierung estrogen wirksamer Substanzen betrachtet werden. Auf KA 3 bis 7 wurden vor einigen Jahren UV-Bestrahlungsanlagen installiert, um die mikrobiologisch-hygiensche Qualität des gereinigten Abwassers zu verbessern. Zur Bestrahlung der mit dem Belebungsverfahren gereinigten Abläufe werden Quecksilber-Niederdruckstrahler verwendet, deren Intensitätsmaximum bei einer Wellenlänge von 254 nm liegt. Bei KA 8 handelt es sich um eine VRM® (Vacuum Rotation Membrane)-Membranbelebungsanlage. Die Feststoffabtrennung im Belebungsbecken erfolgt hier durch Ultrafiltration mit Hilfe rotierender Plattenmembranen. Auf KA 9, einer Tropfkörperanlage, wird mit der Ultraschall-Ozonierung ein Pilotverfahren zur weitergehenden Abwasserreinigung angewandt. Zunächst werden im gereinigten Abwasser Schwebstoffe und Bakterienflocken durch Ultraschallimpulse zersprengt. Anschließend wird Ozon eingebracht und zur Verstärkung der Wirkung erneut Ultraschall eingesetzt. In KA 10 erfolgt die Reinigung des Abwassers ebenfalls im Tropfkörperverfahren. Der Ablauf des Nachklärbeckens wird in eine Aktivkohleadsorptionsanlage, die aus Reaktions- und Sedimentationsbecken besteht, gepumpt. Die Pulveraktivkohle wird vor dem Reaktionsbecken, Flockungs- und Flockungshilfsmittel werden vor dem Sedimentationsbecken zudosiert. Der Ablauf des Sedimentationsbeckens, in den erneut Flockungsmittel gegeben werden, fließt schließlich in die Kammern der Flockungsfiltration.

Tab. 1: Ausbaugröße, Art der biologischen und der weitergehenden Reinigungsstufe der untersuchten bayerischen kommunalen Kläranlagen (KA)

	Ausbaugröße (EW)	biologische Stufe	weitergehende Reinigung
KA 1	> 10.000 ≤ 100.000	Tropfkörper	keine
KA 2	> 100.000	Belebung	keine
KA 3	> 100.000	Belebung	UV-Bestrahlung
KA 4	≤ 10.000	Belebung	UV-Bestrahlung
KA 5	≤ 10.000	Belebung	UV-Bestrahlung
KA 6	≤ 10.000	Belebung	UV-Bestrahlung
KA 7	> 100.000	Belebung	UV-Bestrahlung
KA 8	> 10.000 ≤ 100.000	Membranbelebung	
KA 9	≤ 10.000	Tropfkörper	Ultraschall-Ozonierung
KA 10*	> 100.000	Tropfkörper	Aktivkohleadsorption

\*: KA 10 liegt in Baden-Württemberg

Die Probenahme erfolgte in Glas- oder Aluminiumflaschen. Es wurden keine automatischen Probennehmer eingesetzt, da sich aus den Schlauchmaterialien endokrin wirksame Substanzen (z. B. Weichmacher) lösen könnten, die das Ergebnis verfälschen würden. Die Proben wurden nach gekühltem Transport entweder sofort in den YES-Test eingesetzt oder vor der Untersuchung für wenige Tage bei 4 °C bzw. für längere Zeiträume bei -20 °C gelagert.

Kläranlagenzuläufe wurden vor dem Test immer filtriert (Sterilfilter mit 0,45 µm Porengröße), Flusswasser wurde nicht filtriert. Kläranlagenabläufe wurden sowohl in filtrierter als auch unfiltrierter Form untersucht. Der pH-Wert der Proben wurde mit HCl bzw. NaOH auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt.

Zur Senkung der Nachweisgrenze des Verfahrens wurden im zweiten Projektjahr (2012) Flusswasser- und Kläranlagenablauf-Proben durch Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) aufkonzentriert. Je ein Liter Probe wurde zunächst mit Glasfaserfiltern (Grade GF/C, Whatman™) vorfiltriert, dann wurde die filtrierte Probe mit Hilfe einer Vakuumkammer (Visiprep SPE Vacuum Manifold mit Visiprep Large Volume Sampler; Supelco, Sigma-Aldrich) auf die Festphase aufgetragen. Als Festphase kamen C18-Säulen (Bond Elut C18, 500 mg, 6 ml; Agilent Technologies) zum Einsatz, die zuvor mit 1 x 2 ml n-Heptan (LiChrosolv®, Merck), 1 x 2 ml Aceton (SupraSolv®, Merck), 2 x 3 ml Methanol (SupraSolv®) und 2 x 4 ml destilliertem Wasser konditioniert wurden. Nach dem Auftragen der Proben wurden die Säulen im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend mit 4 x 1 ml Aceton eluiert. Die Eluate wurden in Röhrchen aufgefangen, die jeweils 100 µl Dimethylsulfoxid (SupraSolv®) enthielten. Zum Schluss wurde das Elutionsvolumen unter Stickstoff bei 40 °C auf 100 µl eingengt. Die Konzentrate wurden bei -20 °C gelagert.

## 4.2 Testmedien

### Glucose-Yeast Nitrogen Base-Lösung

16,76 g Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco™, BD), gelöst in 200 ml dest. Wasser  
50 g Glucose (Merck), gelöst in 200 ml dest. Wasser

Nach Sterilfiltration wurde das Gemisch bei 4 bis 8 °C bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### Aminosäure-Lösungen

0,225 g L-Lysin (Sigma-Aldrich), gelöst in 50 ml dest. Wasser  
0,15 g L-Histidin-HCl-Monohydrat (Sigma-Aldrich), gelöst in 50 ml dest. Wasser

Nach Sterilfiltration wurden die Lösungen bei -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt.

### Selektionsmedium-Konzentrat

400 ml Glucose-Yeast Nitrogen Base-Lösung  
20 ml Lysin-Lösung  
20 ml Histidin-Lösung

Das Konzentrat wurde bei -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt.

### Selektionsmedium

11 ml Selektionsmedium-Konzentrat (s.o.)  
51,5 ml steriles dest. Wasser

Das Medium wurde bei -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt.

### Glucose-Lösung

9,0 g Glucose (Merck), gelöst in 50 ml dest. Wasser

Nach Sterilfiltration wurde die Lösung bei 4 bis 8 °C bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### FAU-Mix

1 Teil Selektionsmedium-Konzentrat  
1 Teil Glucose-Lösung

Der FAU-Mix wurde für jeden Test neu angesetzt.

### Kupfersulfat-Lösung

350 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (Merck), gelöst in 50 ml dest. Wasser

Nach dem Autoklavieren (121 °C, 20 min) wurde die Lösung bei Raumtemperatur bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### Antibiotikallösungen

500 mg Ampicillin-Natriumsalz (AppliChem), gelöst in 10 ml dest. Wasser  
500 mg Streptomycin-Sulfatsalz (Sigma-Aldrich), gelöst in 10 ml dest. Wasser

Die Lösungen wurden bei -20 °C bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### Reaktionsmedium

10 ml Selektionsmedium-Konzentrat  
67,5 µl Kupfersulfat-Lösung  
150 µl Ampicillin-Lösung  
150 µl Streptomycin-Lösung

Das Reaktionsmedium wurde für jeden Test neu angesetzt.

### Estradiol (E2)-Lösungen

1 mg 17β-Estradiol (Sigma-Aldrich), gelöst in 1 ml Ethanol (Emsure™, Merck)

Diese Estradiol-Stammlösung (Lösung 1) wurde bei -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt.

Die Stammlösung wurde für die Tests jeweils folgendermaßen verdünnt:

Version A (Ethanol-Endkonzentration 1 %):

Lösung 2A: 10 µl Lösung 1 + 990 µl Ethanol (Konzentration: 10 µg E2/ml Ethanol)  
Lösung 3A: 10 µl Lösung 2A + 990 µl Ethanol (Konzentration: 100 µg E2/l Ethanol)  
Lösung 4A: 100 µl Lösung 3A + 900 µl Ethanol (Konzentration: 10 µg E2/l Ethanol)  
Lösung 5A: 10 µl Lösung 4A + 990 µl dest. Wasser (Konzentration: 100 ng E2/l 1 %ige Ethanollösung)

Version B (Ethanol-Endkonzentration 0,3 %):

Lösung 4B: 333,3 µl Lösung 3A + 666,7 µl Ethanol (Konzentration: 33,3 µg E2/l Ethanol)  
Lösung 5B: 3 µl Lösung 4B + 997 µl dest. Wasser (Konzentration: 100 ng E2/l 0,3 %ige Ethanollösung)

### lacZ-Puffer

10,67 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Merck)  
0,75 g KCl (Merck)  
0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Merck)

Nach dem Lösen der Substanzen in 950 ml dest. Wasser wurde der pH-Wert mit ca. 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O auf 7,0 ± 0,2 eingestellt und das Volumen mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Nach Sterilfiltration wurde 1 g Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS, Sigma-Aldrich) zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### lacZ-Reaktionsgemisch

53,13 ml lacZ-Puffer  
106,25 mg 2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG, Sigma-Aldrich)  
17000 units Lyticase (Sigma-Aldrich)  
144,5 µl 2-Mercaptoethanol (Serva)

Das Reaktionsgemisch wurde für jeden Test neu hergestellt: ONPG und Lyticase wurden im lacZ-Puffer gelöst und anschließend wurde 2-Mercaptoethanol unter dem Abzug zugegeben.

### Stoppreagenz

105,99 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, gelöst in 1 l dest. Wasser

Nach Sterilfiltration wurde die Lösung bei Raumtemperatur bis zu zwölf Monate aufbewahrt.

### 4.3 Teststamm

Der hier verwendete Hefe-Teststamm nach McDonnell ist abgeleitet von *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 (MCDONNELL ET AL.1991a). Er wurde von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) in gefrorenem Zustand bezogen. Nach dem Auftauen wurde ein Röhrchen mit 5 ml Selektionsmedium (s. 4.2) mit 350 µl Teststamm beimpft und über Nacht unter starkem Schütteln bei 30 °C bebrütet. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:1 mit 30 %igem Glycerin vermischt und 350 µl-Aliquots bei -70 °C eingefroren.

### 4.4 Testdurchführung

#### 4.4.1 Hefekultur

Vor jedem Test wurde ein Röhrchen mit 5 ml Selektionsmedium (s. 4.2) mit einem 350 µl-Aliquot des Teststamms beimpft und über Nacht unter starkem Schütteln bei 30 °C bebrütet. Ein Aliquot dieser Kultur wurde 1:10 in Selektionsmedium verdünnt und die optische Dichte bei 595 nm bestimmt (Messung in einer Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte, Volumen: 300 µl; Messgerät: DigiScan, Asys Hitech). Zu 4 ml frischem Selektionsmedium wurde dann so viel Hefekultur zugegeben, dass eine Trübung von  $200 \pm 10$  FAU (Formazine Attenuation Units) erreicht wurde. Die Bebrütung dieser Vorkultur erfolgte wiederum unter starkem Schütteln bei 30 °C für sechs bis acht Stunden.

#### 4.4.2 Vorarbeiten und Plattenbelegung

Zwei bis drei Stunden vor Ende der Bebrütungszeit der Vorkultur wurde mit der Vorbereitung der Proben (s. 4.1) und der Testmedien (FAU-Mix, Reaktionsmedium, E2-Lösungen; s. 4.2) begonnen. Wird die Original-Plattenbelegung verwendet (s. Tab. 3), können zwei Proben auf einer 96-Well-Platte getestet werden. Dabei werden das unverdünnte Testgut und Verdünnungsstufen von 1:2 bis 1:64 (in dest. Wasser) eingesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass durch die Zugabe von FAU-Mix, Reaktionsmedium und Inokulum eine weitere Verdünnung von jeweils 1:1,5 erfolgte (s. Tab. 2). Von jeder Verdünnungsstufe wurden vier Parallelen untersucht.

Tab. 2: Verdünnungsstufen im YES-Test

Bezeichnung	Verdünnungen		
	Verdünnung der Probe	Verdünnung durch Medien + Inokulum	Verdünnung im Testansatz
V0	unverdünnt	1:1,5	1:1,5
V1	1:2	1:1,5	1:3
V2	1:4	1:1,5	1:6
V3	1:8	1:1,5	1:12
V4	1:16	1:1,5	1:24
V5	1:32	1:1,5	1:48
V6	1:64	1:1,5	1:96

Auf jeder Platte wurden Blindwerte (unverdünnte Probe, Medien, kein Inokulum), Negativkontrollen (dest. Wasser, Medien, Inokulum) und Positivkontrollen (15 ng/l E2 in 1 bzw. 0,3 %iger Ethanollösung (s. unten), Medien, Inokulum) mitgeführt (s. Tab. 3).

Tab. 3: Original-Plattenbelegung (96-Well-Mikrotiterplatte)

Sp. 1	Sp. 2	Sp. 3	Sp. 4	Sp. 5	Sp. 6	Sp. 7	Sp. 8	Sp. 9	Sp. 10	Sp. 11	Sp. 12
PK	H <sub>2</sub> O	NK	BW a	BW a	BW a	BW a	H <sub>2</sub> O	BW b	BW b	BW b	BW b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V6 a	V6 a	V6 a	V6 a	H <sub>2</sub> O	V6 b	V6 b	V6 b	V6 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V5 a	V5 a	V5 a	V5 a	H <sub>2</sub> O	V5 b	V5 b	V5 b	V5 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V4 a	V4 a	V4 a	V4 a	H <sub>2</sub> O	V4 b	V4 b	V4 b	V4 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V3 a	V3 a	V3 a	V3 a	H <sub>2</sub> O	V3 b	V3 b	V3 b	V3 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V2 a	V2 a	V2 a	V2 a	H <sub>2</sub> O	V2 b	V2 b	V2 b	V2 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V1 a	V1 a	V1 a	V1 a	H <sub>2</sub> O	V1 b	V1 b	V1 b	V1 b
PK	H <sub>2</sub> O	NK	V0 a	V0 a	V0 a	V0 a	H <sub>2</sub> O	V0 b	V0 b	V0 b	V0 b

Sp.: Spalte

PK: Positivkontrolle

NK: Negativkontrolle

BW: Blindwert

V: Verdünnungsstufe

a: Probe a

b: Probe b

Zur Quantifizierung der estrogenen Wirkung der zu untersuchenden Proben wurde bei jedem Test zusätzlich eine E2-Referenzplatte mitgeführt. Die Plattenbelegung erfolgte wie in Tab. 3 beschrieben. Die unverdünnte Probe entsprach hier einer E2-Lösung mit einer Konzentration von 100 ng/l (keine Unterscheidung a und b: acht Parallelen). Die folgenden 1:2-Verdünnungen wurden in 1 bzw. 0,3 %iger Ethanollösung (s. 4.2) durchgeführt. Für Blindwerte, Negativ- und Positivkontrollen wurde ebenfalls die entsprechende Ethanollösung verwendet.

Im Laufe des Projektzeitraums stellte sich heraus, dass in einigen Fällen von der Original-Plattenbelegung abgewichen werden konnte bzw. musste. Gering belastete Kläranlagenabläufe oder Flusswasserproben wurden beispielsweise nur in unverdünnter Form bzw. mit einer Verdünnungsstufe untersucht. So konnten auf einer Mikrotiterplatte wesentlich mehr Proben getestet werden. Bei gefärbten Proben war es nötig, auch für die Verdünnungen eigene Blindwerte mitzuführen.

#### 4.4.3 Erster Testteil

Zunächst wurden in die Vertiefungen der Spalten 2 und 8 der Mikrotiterplatten je 120 µl und der Spalte 3 (NK) je 80 µl dest. Wasser pipettiert. In die Vertiefungen der Verdünnungsstufen V1 bis V6 (s. Tab. 3) wurden ebenfalls je 80 µl dest. Wasser vorgelegt. Für die E2-Referenzplatte wurde die entsprechende Ethanollösung verwendet (s. 4.2.3). Dann wurden in die in Tab. 3 mit V0 gekennzeichneten Vertiefungen je 160 µl und in die mit BW gekennzeichneten Vertiefungen je 80 µl unverdünnte Probe bzw. E2-Referenzlösung gegeben. Anschließend wurden die Verdünnungsreihen mit einer Mehrkanalpipette direkt auf der Mikrotiterplatte pipettiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von je 80 µl Positivkontrolle in Spalte 1.

Nach sechs bis acht Stunden Bebrütung (s. 4.4.1) wurde ein Aliquot aus der Vorkultur 1:2 in Selektionsmedium verdünnt und die optische Dichte bei 595 nm bestimmt (Messung in einer Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte, Volumen: 300 µl). Ein geeignetes Volumen (ca. 0,5 ml Kultur für fünf Mikrotiterplatten) wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und die Hefezellen in einem äquivalenten Volumen FAU-Mix resuspendiert. Zum Einsatz in den Test wurde das Inokulum mit FAU-Mix auf  $45 \pm 5$  FAU eingestellt (benötigtes Volumen: ca. 8,5 ml für fünf Mikrotiterplatten). Zu der in FAU-Mix verdünnten Hefekultur wurde nun das äquivalente Volumen Reaktionsmedium zugegeben. Von dieser Mischung wurden jeweils 40 µl in alle mit PK, NK und V0 bis V6 bezeichneten Vertiefungen (s. Tab. 3) pipettiert. Zuletzt wurden je 20 µl FAU-Mix und 20 µl Reaktionsmedium in die BW-Vertiefungen gegeben.

Die Mikrotiterplatten wurden mit gasdurchlässigem Verschlussfilm (Roth) abgedeckt und in einem Schüttelinkubator (iEMS, Thermo Scientific) bei 30 °C und 650 rpm für 18 Stunden bebrütet.

#### 4.4.4 Zweiter Testteil

Kurz vor Ende der Bebrütungszeit wurde das lacZ-Reaktionsgemisch (s. 4.2) hergestellt und davon je 100 µl in alle Vertiefungen von neuen 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert. Nach Ende der Bebrütungszeit wurde jede Platte für 2 min bei 1400 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt und nach Abnahme des Verschlussfilms sofort die Trübung bei 595 nm gemessen. Anschließend wurden aus den Vertiefungen der Platte je 60 µl in die entsprechende Vertiefung einer neuen – mit lacZ-Reaktionsgemisch befüllten – Platte überführt. Die neue Platte wurde wieder mit Verschlussfilm abgedeckt und für eine Stunde bei 37 °C und 900 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Anschließend wurde der Verschlussfilm abgenommen und die Absorption bei 405 nm bestimmt. Außerdem erfolgte eine weitere Messung bei 595 nm zur Kontrolle der Zellyse.

#### 4.4.5 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der Absorptionsmessungen bei 595 nm (nur erste Messung) und 405 nm herangezogen. Die Messwerte bei 595 nm stellen ein Maß für die Zellzahl (bzw. das Hefewachstum) im 18stündigen Bebrütungszeitraum, die Werte bei 405 nm für die Gelbfärbung und somit die Aktivität des Reportergens (s. 2.) dar. Für jede Probe wurde eine Induktionsrate (IR) bestimmt. Sie berechnet sich als Quotient aus der Reportergergenaktivität der Probe und der Negativkontrolle nach Normierung auf die Zellzahl. Unter Normierung auf die Zellzahl versteht man hier die Bildung eines Quotienten aus Reportergergenaktivität und Zellzahl. Im Testgut enthaltene Substanzen könnten das Hefewachstum im Vergleich zur Negativkontrolle vermindern oder fördern und so die Induktionsrate verfälschen. Durch die Normierung wird dies ausgeglichen.

Neben der Bestimmung der Induktionsrate war auch eine Angabe des Ergebnisses in Estradiol-Äquivalenten (EEQ) möglich. Hierzu wurde bei jedem Test zusätzlich eine Estradiol (E2)-Standard-Mikrotiterplatte mitgeführt. Aus einer E2-Lösung mit einer Konzentration von 100 ng/l wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und in den YES-Test eingesetzt. So konnte bei der Auswertung eine E2-Standardkurve erstellt werden, die zur Quantifizierung der estrogenen Wirkung der Proben mit Hilfe von EEQ diente (s. Abb. 1).

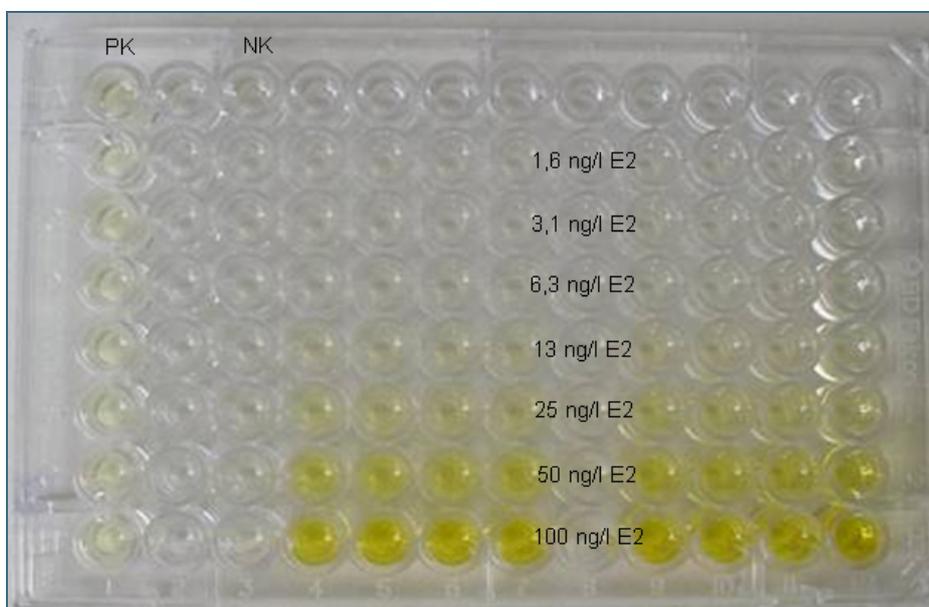


Abb. 1:  
E2-Standard-  
Mikrotiterplatte (PK:  
Positivkontrolle (15 ng/l  
E2); NK: Negativkon-  
trolle (Ethanollösung))

Induktionsraten über 1 zeigen im Prinzip eine estrogene Wirkung des eingesetzten Testguts an. Da aber selbst in der Negativkontrolle das Wachstum der Hefen und die Gelbfärbung gewissen natürlichen Schwankungen unterworfen sind, wurden erst Induktionsraten über 1,3 als positiv gewertet, d.h. als Nachweisgrenze festgelegt. Bei Induktionsraten über 1,8 war eine Quantifizierung der estrogenen Wirkung mit Hilfe von EEQ sinnvoll (Bestimmungsgrenze). Die Bestimmungsgrenze lag bei etwa 8 ng/l EEQ in nativen Proben. Dieser Wert konnte sich von Test zu Test leicht verschieben, da bei jedem Test eine eigene E2-Standard-Mikrotiterplatte mitgeführt wurde. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Wert während des Projekts weitestgehend konstant blieb.

#### **4.4.6 Besonderheit bei der Untersuchung der Konzentrate**

Die aus einer Probe aufkonzentrierten Stoffe waren nach der Festphasenextraktion in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (s. 4.1). Für den YES-Test wurden 10 µl Konzentrat mit 4990 µl dest. Wasser verdünnt. So ergab sich eine Konzentration von 0,2 % DMSO im Testgut. Daher musste auch das für Verdünnungen, Negativ- und Positivkontrollen sowie die Standardplatte verwendete dest. Wasser 0,2 % DMSO enthalten (0,2 %ige DMSO-Lösung).

Auch bei der Untersuchung von Konzentraten wurden nur Ergebnisse mit Induktionsraten über 1,8 in Estradiol-Äquivalente (EEQ) umgerechnet (s. 4.4.5). Daraus ergab sich eine Bestimmungsgrenze von ca. 0,4 ng/l.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung des Testsystems, Ringversuch

Zu Beginn des Projekts wurde der YES-Test im Labor des LfU bei Ref. 77 etabliert. Dies gelang relativ problemlos. In den ersten Versuchen wurden Ethinylestradiol-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen untersucht, später auch Lösungen anderer estrogen aktiver Substanzen (Estradiol, Estron, Bisphenol A, Nonylphenol). Für zwei interne Ringversuche des DIN-Arbeitskreises „Hormonelle Wirkungen“ verschickte die BfG im Jahr 2011 Lösungen der vorher genannten Substanzen (Reinsubstanzen und Gemische). Sämtliche Ergebnisse des LfU lagen in den erwarteten Bereichen.

### 5.2 Auswirkungen von Probenlagerung und Filtration

Die Temperatur, bei der Proben gelagert werden, die Dauer der Lagerung und die Probenvorbehandlung können Auswirkungen auf die im YES-Test ermittelten Ergebnisse haben. Tab. 4 zeigt exemplarisch die Werte für je zwei Zu- und Ablaufproben, von denen Aliquots parallel im Kühl- und im Gefrierschrank gelagert wurden. Aliquots der Ablaufproben wurden nach der unterschiedlichen Lagerung jeweils filtriert und nicht filtriert mit dem YES-Verfahren getestet.

	EEQ (ng/l)	
	4 °C (7 Tage)	-20 °C (7 Tage)
Zulauf 1 filtriert	14,5	20,2
Ablauf 1	< BG (IR = 1,5)	15,2
Ablauf 1 filtriert	< NG (IR = 1,3)	12,4
	4 °C (3 Tage)	-20 °C (3 Tage)
Zulauf 2 filtriert	218,6	192,0
Ablauf 2	11,4	12,0
Ablauf 2 filtriert	< BG (IR = 1,5)	< BG (IR = 1,7)

Tab. 4:  
Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in unterschiedlich gelagerten filtrierten und nicht filtrierten Proben

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

Meist waren die Ergebnisse der eingefrorenen Proben höher als die der gekühlten Aliquots. Die Filtration der Proben führte zur Reduktion der estrogenen Aktivität.

### 5.3 Kommunale Abwässer

#### 5.3.1 Zuläufe kommunaler Kläranlagen – native Proben

Es wurden insgesamt 49 Zuläufe von zehn verschiedenen Kläranlagen mit dem YES-Test untersucht. Die Proben wurden jeweils nach dem Rechen entnommen. In der Regel handelte es sich um Stichproben. Nur bei KA 3 wurden Mischproben getestet, die sich aus je drei Stichproben zusammensetzten, die im Verlauf eines Tages entnommen wurden. Vortests ergaben, dass eine Untersuchung von unfiltrierten Zulaufproben problematisch war, da sich die im Abwasser enthaltenen Mikroorganismen während des Tests vermehrten. Daher wurden die Proben vor dem Einsatz in den YES-Test stets filtriert (s. 4.1).

In allen zehn kommunalen KA konnte im Zulauf in der nativen Probe (d. h. ohne Anreicherung) eine estrogen Wirkung nachgewiesen werden. Bei den Ergebnissen fällt auf, dass die Mittelwerte der EEQ-Konzentrationen von KA 1 und 3 bei über 20 ng/l (Maximum 35,6 ng/l), von KA 4 bis KA 8 dage-

gen bei ca. 12 bis 13 ng/l (Maximum: 17,0 ng/l) lagen (s. ). KA 10 weist im Zulauf eine hohe Belastung mit estrogen wirksamen Stoffen auf. Der Messwert der zweiten Untersuchung lag bei 192 ng/l EEQ.

Tab. 5: Konzentration der Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in filtrierten Kläranlagenzulauf-Proben

	Mittelwert	Min	Max	n
KA 1	<b>23,5</b>	13,8	35,6	12
KA 2	<b>15,2</b>	11,4	19,0	2
KA 3	<b>20,4</b>	15,8	25,5	4
KA 4	<b>12,0*</b>	< BG	16,8	6
KA 5	<b>13,0</b>	8,1	17,0	6
KA 6	<b>12,1</b>	11,1	13,1	2
KA 7	<b>12,6</b>	12,0	13,0	3
KA 8	<b>11,7**</b>	< BG	14,3	10
KA 9	-	< BG	17,4	2
KA 10	<b>106</b>	20,2	192	2

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze

\*: Mittelwert aus fünf Ergebnissen (eine Probe unter Bestimmungsgrenze)

\*\* : Mittelwert aus acht Ergebnissen (eine Probe unter Bestimmungsgrenze, eine zytotoxisch)

n: Anzahl der Untersuchungen

Für vier der 49 untersuchten Proben konnte kein Ergebnis angegeben werden: Bei drei Proben lag die EEQ-Konzentration unter der Bestimmungsgrenze des Tests (ca. 8 ng/l). Eine Probe von KA 8 war in den Verdünnungsstufen bis 1:4 stark zytotoxisch. Die 1:8-Verdünnung war nur leicht zytotoxisch, eine estrogen Wirkung war hier aber nicht mehr feststellbar.

In KA 1 wurden an drei verschiedenen Tagen je drei Zulaufproben zu verschiedenen Tageszeiten (7:30, 10:30 und 13:30 Uhr) entnommen. Es konnte keine typische Tageszeit für die Belastungsspitze identifiziert werden (Tag 1: Maximum: 35,6 ng/l EEQ um 7:30 Uhr, Tag 2: Maximum: 34,3 ng/l EEQ um 13:30 Uhr, Tag 3: keine definierte Belastungsspitze: alle drei Werte zwischen 13,8 und 16,1 ng/l). Auch zwischen den unterschiedlichen Wochentagen und den Belastungsspitzen war kein Zusammenhang festzustellen.

### 5.3.2 Abläufe kommunaler Kläranlagen – native Proben

Die Belastung der zehn untersuchten kommunalen Kläranlagen mit estrogen wirksamen Substanzen ist im Ablauf deutlich geringer als im Zulauf. Dies deutet auf einen Eliminationsprozess nicht nur der Wirkung, sondern auch der Stoffe während der Kläranlagen-Passage hin. Für die meisten Kläranlagenablauf-Proben wurden im YES-Test zwar Induktionsraten über 1 ermittelt, jedoch erscheint hier eine Angabe von Estradiol-Äquivalenten in der nativen – nicht angereicherten – Probe als nicht sinnvoll, da die Werte im Bereich der Bestimmungsgrenze liegen. Daher werden im Folgenden nicht die EEQ-Konzentrationen, sondern die Induktionsraten für die Expression des Reportergens als Ergebnisse angegeben, wobei Raten über 1,3 gelb markiert sind (s. Tab. 6 bis Tab. 8).

Abb. 2 zeigt ein typisches Ergebnis eines YES-Tests. Die Gelbfärbung der Vertiefungen auf der rechten Seite der Mikrotiterplatte (Kläranlagen-Zulauf, Spalten 8 bis 12) ist schon mit bloßem Auge deutlich zu erkennen. Dagegen ist zwischen dem Kläranlagen-Ablauf (Spalten 4 bis 8) und der Negativkontrolle (Spalte 3) kein deutlicher Unterschied auszumachen.

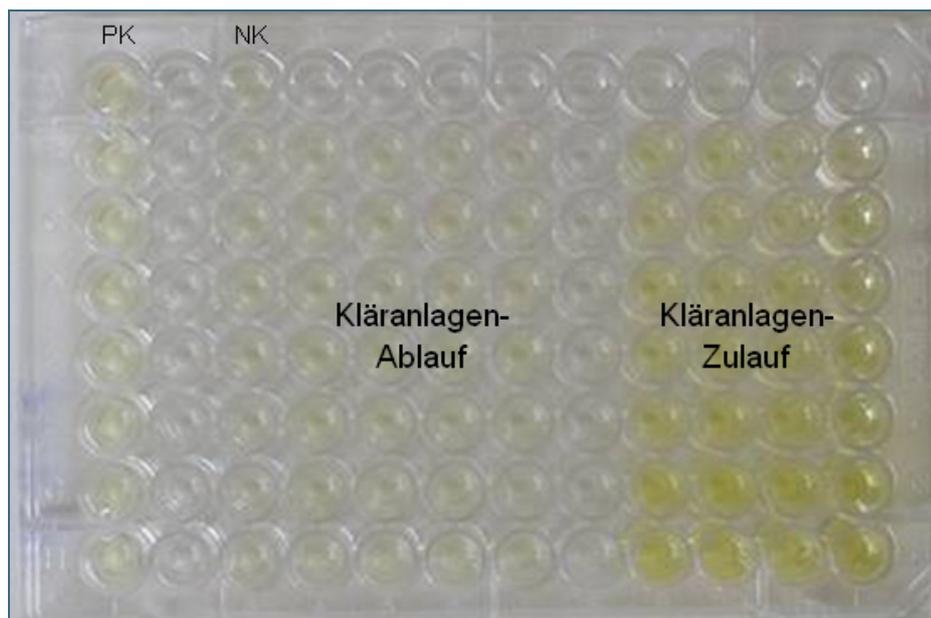


Abb. 2:  
Ergebnis eines YES-  
Tests (PK: Positivkon-  
trolle (15 ng/l E2); NK:  
Negativkontrolle (dest.  
Wasser))

Für manche Kläranlagenabläufe konnten plausible Ergebnisse nur mit filtrierten Proben erzielt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte werden daher hier nur die Ergebnisse der filtrierten Proben angegeben.

### 5.3.2.1 Anlagen ohne weitergehende Abwasserreinigung

Tab. 6 zeigt die im YES-Test ermittelten Induktionsraten von Ablauf-Stichproben zweier Kläranlagen ohne weitergehende Reinigungsstufe. KA1 ist eine Tropfkörper-, KA2 dagegen eine Belebungsanlage.

Die Induktionsraten der Abläufe von KA 1 waren in der Hälfte der Fälle leicht erhöht (1,4 bis 1,7), die Raten der zwei untersuchten Abläufe von KA 2 waren eher unauffällig. In beiden Anlagen erfolgte eine deutliche Elimination der estrogenen Wirkung im Vergleich zum Zulauf.

	Probendatum	Induktionsrate
KA 1	25.05.2011	1,7
	30.05.2011	0,8
	02.08.2011	1,4
	28.11.2011 a	1,6
	28.11.2011 b	1,6
	28.11.2011 c	1,2
	29.11.2011 a	1,1
	29.11.2011 b	1,2
	29.11.2011 c	1,4
	30.11.2011 a	1,3
KA 2	30.11.2011 b	1,3
	30.11.2011 c	1,6
	10.10.2011	1,2
	12.10.2011	1,3

Tab. 6:  
Induktionsraten der filtrierten Ablauf-  
proben von Kläranlagen ohne weiter-  
gehende Abwasserreinigung

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

### 5.3.2.2 Anlagen mit weitergehender Abwasserreinigung

In Tab. 7 sind die Induktionsraten der Abläufe von fünf Anlagen mit UV-Desinfektionsstufe, in Tab. 8 die Raten der Abläufe einer Membranbelebungsanlage dargestellt. Bei den Proben handelte es sich meist wiederum um Stichproben, nur von KA3 wurden Mischproben untersucht.

Bei den fünf Kläranlagen mit UV-Desinfektionsstufe wiesen leicht erhöhte Induktionsraten in fast der Hälfte der Ablaufproben auf eine estrogene Aktivität hin. Auch hier erfolgte eine Reduktion estrogen wirksamer Substanzen während der konventionellen Abwasserreinigung. Die UV-Behandlung der Kläranlagenabläufe zu Desinfektionszwecken bewirkte jedoch keine weitere Verringerung der estrogenen Wirkung.

	Probendatum	Induktionsrate	
		vor UV	nach UV
KA 3	07.06.2011	1,7*	1,6*
	28.06.2011	1,3*	1,5*
	12.07.2011	1,4*	1,3*
KA 4	16.05.2011	1,5	1,5
	27.09.2011	1,7	1,5
	24.10.2011	1,6	k. P.
	16.07.2012	1,3	1,1
	20.08.2012	0,7	1,0
	17.09.2012	1,0	0,9
KA 5	16.05.2011	1,5	1,4
	27.09.2011	1,3	1,3
	24.10.2011	1,5	k. P.
	16.07.2012	1,1	1,0
	20.08.2012	1,4	1,3
	17.09.2012	1,1	1,2
KA 6	27.09.2011	0,9	1,2
	24.10.2011	1,1	k. P.
KA 7	20.09.2012	1,1	1,2
	24.09.2012	1,0	1,1
	25.09.2012	1,4	1,4

Tab. 7:  
Induktionsraten der filtrierten Ablaufproben von Kläranlagen mit UV-Anlage

\*: Mischprobe aus drei Proben, die zu unterschiedlichen Tageszeiten entnommen wurden

k. P.: keine Probe (UV-Anlage nicht in Betrieb)

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

Nur zwei von zehn Ablaufproben der Membranbelebungsanlage KA 8 lieferten im YES-Test Induktionsraten über 1,3 (s. Tab. 8), obwohl im Zulauf nennenswerte EEQ-Konzentrationen vorhanden waren (s. Tab. 5).

	Probendatum	Induktionsrate
KA 8	13.09.2011	1,4
	27.09.2011	1,3
	24.10.2011	1,2
	14.11.2011	1,3
	12.12.2011	1,2
	17.01.2012	1,5
	12.06.2012	1,1
	10.07.2012	1,1
	13.08.2012	1,3
	11.09.2012	1,1

Tab. 8:  
Induktionsraten der filtrierten Ablaufproben einer Kläranlage mit Membranbelebungsverfahren

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

### 5.3.3 Flusswasser und Abläufe kommunaler Anlagen – Konzentrate

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Angabe von Estradioläquivalenten für native Kläranlagenabläufe nicht möglich ist (s. 5.3.2), wurde eine Methode zur Aufkonzentrierung der Proben etabliert. Einer solchen Probenvorbehandlung sind Grenzen gesetzt. Dabei kommt es darauf an, dass durch die Aufkonzentrierung aller Abwasserinhaltsstoffe die Wirkungen der ursächlich relevanten Stoffe noch differenziert werden können. Durch Festphasenextraktion wurde die Probe zunächst um den Faktor 10.000 eingeeengt (1 Liter Probe auf 100 µl DMSO-Konzentrat, s. 4.1). Insgesamt ergab sich jedoch nur eine 20fache Aufkonzentrierung, da das DMSO-Konzentrat vor Einsatz in den YES-Test 1:500 in dest. Wasser verdünnt werden musste (s. 4.4.6). Flussproben und Abläufe von einigen Kläranlagen wurden parallel nativ und aufkonzentriert mit dem YES-Test untersucht.

Um sicher zu stellen, dass keine falsch positiven Ergebnisse ermittelt wurden, wurden regelmäßig Kontrollen mitgeführt. Diese Leitungswasser-Kontrollen durchliefen den gesamten Prozess (Aufbewahrung in Probenahmeflasche bei -20 °C bzw. 4 °C, Glasfaser-Filtration, Aufkonzentrierung, YES-Test). Alle Kontrollen ergaben im YES-Test negative Ergebnisse.

#### 5.3.3.1 Methodenetablierung

In einem Vorversuch sollte geklärt werden, ob sich der pH-Wert der Probe und die Art des Elutionsmittels auf die Effizienz der Aufkonzentrierung auswirken. Dafür wurde je ein Liter Leitungswasser mit 100 ng/l E2 dotiert und der pH-Wert auf 3 bzw. 7 eingestellt. Als Elutionsmittel wurden Methanol, Ethylacetat und Aceton verwendet.

	pH 3	pH 7
Methanol	84,8	94,2
Ethylacetat	75,0	87,2
Aceton	86,6	100,6

Tab. 9:  
gemessene Konzentration der Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in mit 100 ng/l E2 dotiertem Leitungswasser

Bei neutralem pH-Wert wurden für alle drei Elutionsmittel höhere E2-Werte bestimmt, als effizientestes Elutionsmittel erwies sich Aceton (s. Tab. 9). Daher wurden im weiteren Projektverlauf die Proben vor der Aufkonzentrierung nicht angesäuert und als ausschließliches Lösungsmittel Aceton (s. 4.1) verwendet.

Nach der Untersuchung von dotiertem Leitungswasser wurden in der zweiten Phase der Etablierung der Konzentrierungsmethode die relativ hoch belastete Rückstellproben aus den Vitellogenin (VG)-Monitoring-Programmen 2009 und 2010 (LfU, Referat 78) getestet (s. Tab. 10).

Beim einzigen untersuchten Zulauf (KA 3, 27.11.09) waren die Ergebnisse mit ca. 16 bzw. 19 ng/l aus der aufkonzentrierten bzw. nativen Probe gut vergleichbar. Der Ablauf von KA 3 wies im YES-Test der nativen Probe eine erhöhte Induktionsrate auf, über das Konzentrat wurden 0,5 ng/l EEQ bestimmt. Die Flussprobe zeigte in nativer Form keinen Hinweis auf estrogenen Wirksamkeit. In aufkonzentrierter Form konnte estrogenen Aktivität nachgewiesen werden, das Ergebnis lag aber unter der Bestimmungsgrenze. Für KA 1 waren bei den ersten beiden Probenahmen die in den Konzentraten gemessenen EEQ-Werte mit ca. 30 und 29 ng/l im Vergleich zu den in den nativen Proben bestimmten Werten mit ca. 22 und 21 ng/l deutlich erhöht. Die dritte Ablaufprobe (23.11.10) wurde mit 20 ng/l E2 dotiert und anschließend aufkonzentriert bzw. nativ untersucht. Hier waren die Konzentrat-Werte erneut höher. Die Induktionsrate des YES-Tests für die native vierte Ablaufprobe (03.12.10) war unauffällig, aus dem Konzentrat ergaben sich 2,9 ng/l EEQ.

		EEQ (ng/l)	
		aufkonzentriert	nativ
KA 3	27.11.2009		
	Zulauf	15,8*	18,8
	Ablauf	0,5	< BG (IR = 1,6)
	Fluss uh. KA	< BG (IR = 1,4)	< NG (IR = 1,1)
KA 1	11.11.2010		
	Ablauf	30,1	21,8
	17.11.2010		
	Ablauf	29,3	21,1
	23.11.2010		
Ablauf	n. u.	< BG (IR = 1,8)	
Ablauf + 20 ng/l E2	25,7	21,1	
03.12.2010			
Ablauf	2,9	< NG (IR = 1,1)	

Tab. 10:  
Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in Rückstellproben aus dem VG-Monitoring 2009 und 2010 (Aufkonzentrierung und YES-Test im Februar 2012, Untersuchungsvolumen: 1 L)

uh. KA: unterhalb der Kläranlage

n. u.: nicht untersucht (nicht genügend Probenvolumen vorhanden)

\*: Probenvolumen hier nur 200 ml

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

IR: Induktionsrate

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

### 5.3.3.2 Anlage ohne weitergehende Abwasserreinigung, Vergleich YES-Test und E-Screen Assay

Im Zuge des VG-Monitoring 2011 (LfU, Ref. 78) wurden parallele Proben entnommen, so dass diese mit dem YES-Test vergleichend untersucht werden konnten. An vier verschiedenen Tagen während des Monitorings wurden Flussproben – ober- und unterhalb der Einleitungsstelle von KA 2 – und Kläranlagenablaufproben untersucht. Es handelte sich jeweils um 24 h-Mischproben.

Tab. 11 zeigt die Ergebnisse des YES-Tests für vier verschiedene Tage. Daneben sind die von Referat 78 (LfU) ermittelten Ergebnisse des E-Screen Assays (Proliferationstest mit menschlichen Brustkrebszellen) und der chemischen Analyse von Estron aufgeführt. Neben der Konzentration von Estron wurden in allen Proben auch die Konzentrationen von 17 $\alpha$ -Estradiol, 17 $\beta$ -Estradiol, Ethinylestradiol und Estriol gemessen. Hier unterschritten die Ergebnisse jedoch – mit Ausnahme des Kläranlagenablaufs vom 07.11.11 (s. Tab. 11) – die Bestimmungsgrenze von 0,1 ng/l. Mit dem YES-Test und dem E-Screen Assay war im Fluss oberhalb der Kläranlage keine estrogenen Aktivität über der Nachweis-

bzw. Bestimmungsgrenze feststellbar, die Estron-Konzentrationen lagen bei 0,3 bis 0,4 ng/l. Für die ersten drei Ablaufproben ergab der YES-Test Werte um 1 ng/l EEQ, der E-Screen Assay dagegen Ergebnisse um 3 ng/l EEQ (Estron-Konzentrationen: 0,3 bis 1 ng/l). Für den Ablauf des vierten Untersuchungstags wurden mit allen drei Methoden die jeweils höchsten Konzentrationen ermittelt (YES: 2,6 ng/l EEQ; E-Screen: 4,3 ng/l EEQ; chem. Analytik: 3,2 ng/l Estron; 0,2 ng/l 17 $\beta$ -Estradiol; 0,1 ng/l Estriol). Im Fluss unterhalb der Kläranlage wurde sowohl mit dem YES-Test als auch mit dem E-Screen Assay in allen vier Proben estrogene Aktivität bestimmt, wobei die E-Screen-Werte erneut höher als die YES-Ergebnisse lagen. Alle Proben wurden im YES-Test zusätzlich in nativer Form untersucht, wobei die Induktionsraten jedoch keine estrogene Aktivität anzeigten.

Tab. 11: Estradiol-Äquivalente (EEQ) und Estron (E1)-Konzentration in ng/l in Proben von KA 2 aus dem VG-Monitoring 2011 (EEQ: YES, E-Screen; E1: chemische Analytik), Untersuchungsvolumen: 1 L)

	YES EEQ (ng/l)		E-Screen* EEQ (ng/l)	chem. Analytik* Estron (ng/l)
	aufkonzentriert	nativ	aufkonzentriert	aufkonzentriert
21.10.2011				
Fluss oh. KA	< NG	< NG (IR = 1,1)	< BG	0,4
<b>KA-Ablauf</b>	<b>1,2</b>	< NG (IR = 1,1)	<b>3,3</b>	<b>1,0</b>
<b>Fluss uh. KA</b>	<b>0,8</b>	< NG (IR = 1,1)	<b>1,8</b>	<b>0,5</b>
05.11.2011				
Fluss oh. KA	< NG	< NG (IR = 1,1)	< BG	0,3
<b>KA-Ablauf</b>	<b>1,1</b>	< NG (IR = 1,1)	<b>3,2</b>	<b>0,8</b>
<b>Fluss uh. KA</b>	<b>0,6</b>	< NG (IR = 1,2)	<b>1,9</b>	<b>0,2</b>
06.11.2011				
Fluss oh. KA	< NG	< NG (IR = 1,1)	< BG	0,3
<b>KA-Ablauf</b>	<b>0,9</b>	< NG (IR = 1,3)	<b>3,2</b>	<b>0,3</b>
<b>Fluss uh. KA</b>	<b>0,4</b>	< NG (IR = 1,1)	<b>2,8</b>	<b>0,4</b>
07.11.2011				
Fluss oh. KA	< NG	< NG (IR = 0,8)	< BG	0,3
<b>KA-Ablauf</b>	<b>2,6</b>	< NG (IR = 1,2)	<b>4,3</b>	<b>3,2**</b>
<b>Fluss uh. KA</b>	<b>0,7</b>	< NG (IR = 1,1)	<b>2,5</b>	<b>1,0</b>

\*: Ergebnisse ermittelt von LfU, Ref. 78

\*\* : Hier wurden neben Estron auch 0,2 ng/l 17 $\beta$ -Estradiol und 0,1 ng/l Estriol bestimmt.

oh. KA: oberhalb der Kläranlage

uh. KA: unterhalb der Kläranlage

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze (BG des E-Screen Assays in dieser Probenserie: 0,1 ng/l EEQ)

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

IR: Induktionsrate

### 5.3.3.3 Anlagen mit weitergehender Abwasserreinigung

Um für Kläranlagen mit weitergehender Abwasserreinigung aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurden auch hier Ablaufproben aufkonzentriert und anschließend im YES-Test untersucht. Die weitergehende Reinigung erfolgte mit vier verschiedenen Methoden: UV-Bestrahlung, Membranfiltration, Ultraschall-Ozonierung und Aktivkohleadsorption (s. Tab. 1).

## UV-Bestrahlung

In Tab. 12 sind die Ergebnisse des YES-Tests für die aufkonzentrierten Ablaufproben von Kläranlagen mit UV-Desinfektionsstufe zusammengestellt. Daneben sind die Induktionsraten, die sich aus der Untersuchung der Proben in nativer Form ergaben, aufgeführt (s. auch Tab. 7).

Tab. 12: Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in aufkonzentrierten Ablaufproben (1 L) von Kläranlagen mit UV-Desinfektionsanlage sowie Induktionsraten der nativen Proben

	EEQ (ng/l)			
	aufkonzentriert		nativ	
	vor UV	nach UV	vor UV	nach UV
KA 4				
16.07.2012	<b>4,4</b>	<b>4,1</b>	< NG (IR = 1,3)	< NG (IR = 1,1)
17.09.2012	<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	< NG (IR = 1,0)	< NG (IR = 0,9)
KA 5				
16.07.2012	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	< NG (IR = 1,1)	< NG (IR = 1,0)
20.08.2012	<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	< BG (IR = <b>1,4</b> )	< NG (IR = 1,3)
17.09.2012	<b>1,4</b>	<b>1,7</b>	< NG (IR = 1,1)	< NG (IR = 1,2)
KA 7				
20.09.2012	<b>1,6</b>	<b>1,5</b>	< NG (IR = 1,1)	< NG (IR = 1,2)
24.09.2012	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	< NG (IR = 1,0)	< NG (IR = 1,1)
25.09.2012	<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	< BG (IR = <b>1,4</b> )	< BG (IR = <b>1,4</b> )

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze

gelbe Markierung: Induktionsrate > 1,3

Während in den nativen Proben die estrogenen Aktivitäten im Bereich der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze lagen, konnten in den aufkonzentrierten Proben quantifizierbare Nachweise von EEQ geführt werden. Meist wurden in den Abläufen sowohl vor als auch nach UV-Bestrahlung ca. 1 bis 1,5 ng/l EEQ bestimmt. Lediglich bei KA 4 waren die Werte mit über 4 bzw. 2 ng/l EEQ sowie bei KA 7 an einem Probenahmetag mit etwa 2 ng/l erhöht. Auch in den aufkonzentrierten Proben bestätigte sich, dass durch UV-Bestrahlung der Abläufe zu Desinfektionszwecken die estrogenen Aktivität nicht verringert wurde.

## Membranfiltration

Während in den nativen Proben keine estrogenen Aktivität nachzuweisen war, konnte in den aufkonzentrierten Abläufen der Membranbelebungsanlage KA 8 eine geringe estrogenen Aktivität unter 1 ng/l gemessen werden (s. Tab. 13). In zwei der vier Proben waren die Estradiol-Äquivalente sogar trotz Aufkonzentrierung nicht quantifizierbar, da die Induktionsraten auch im Konzentrat unter 1,8 lagen.

	EEQ (ng/l)	
	aufkonzentriert	nativ
KA 8		
12.06.2012	< BG (IR = <b>1,6</b> )	< NG (IR = 1,1)
10.07.2012	< BG (IR = <b>1,6</b> )	< NG (IR = 1,1)
13.08.2012	<b>0,5</b>	< NG (IR = 1,3)
11.09.2012	<b>0,9</b>	< NG (IR = 1,1)

Tab. 13: Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in aufkonzentrierten Ablaufproben (1 L) einer Membranbelebungsanlage sowie Induktionsraten der nativen Proben

< BG: Ergebnis unter der Bestimmungsgrenze

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

## Ultraschall-Ozonierung

Auf KA 9 wurde der Ablauf mit Ultraschall und Ozon behandelt. Die Pilotanlagen liefen nicht dauerhaft, wurden aber von der Herstellerfirma während des Zeitraums unserer Versuche in Betrieb genommen.

Pilotanlage A		Pilotanlage B	
Ozonkonz. mg/l	EEQ ng/l	Ozonkonz. mg/l	EEQ ng/l
0	<b>12,2</b>	0	<b>8,2*</b>
1,6	< NG**	1,7	<b>3,0</b>
3,3	< NG**	3,5	< NG**
4,9	< NG**	6,8	< NG**
6,6	< NG**	8,6	< NG**
8,2	< NG**	11,0	< NG

Tab. 14:  
Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in mit verschiedenen Ozonkonzentrationen behandelten aufkonzentrierten Ablaufproben (1 L)

< NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

\*: Mittelwert aus fünf Stichproben

\*\* : Erste Verdünnungsstufe zytotoxisch

In Pilotanlage A wurde 1 m<sup>3</sup> Kläranlagenablauf im Kreislauf mit Ultraschall (700 W/h) und Ozon behandelt. Vor und während dieser Behandlung wurden sechs Proben entnommen. Die sich für diese Proben ergebenden Ozonkonzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Das Konzentrat der unbehandelten Probe enthielt 12,2 ng/l EEQ und wies damit eine deutliche estrogenen Wirkung auf. Die Bestimmung dieser EEQ-Konzentration erfolgte aus dem 1:4000-verdünnten Konzentrat, da die 1:500- bis 1:2000-verdünnten Konzentrate für die Hefezellen im YES-Test zytotoxisch waren. In den Konzentraten der fünf behandelten Proben (Ozonkonzentrationen: 1,6 bis 8,2 mg/l) konnte dagegen keine estrogenen Aktivität detektiert werden. Allerdings konnte auch hier die sonst übliche erste Verdünnungsstufe der Konzentrate (1:500, s. 4.4.6) aufgrund der Zytotoxizität für die Hefezellen nicht getestet werden.

In Pilotanlage B wurden ca. 9 bis 12 m<sup>3</sup>/h Kläranlagenablauf im Durchlauf mit Ultraschall und Ozon behandelt. Aufgrund technischer Probleme konnte die Ultraschall-Dosis hier nicht ermittelt werden. Vor und während dieses Versuchs wurden fünf Stichproben des unbehandelten Ablaufs entnommen. Die estrogenen Aktivität lag im Mittel bei 8,2 ng/l EEQ (Bestimmung aus den 1:4000-verdünnten Konzentraten). Für die niedrigste Ozonkonzentration (1,7 mg/l) ergab der YES-Test 3,0 ng/l EEQ, in den Konzentraten aller anderen behandelten Proben war wiederum keine estrogenen Aktivität messbar. Auch hier könnte die Zytotoxizität der Konzentrate eine geringe estrogenen Aktivität überlagert haben. Lediglich das Konzentrat der Probe, die mit der höchsten Ozondosis behandelt worden war, war in der 1:500-Verdünnung nicht zytotoxisch.

Mit Pilotanlage B wurde ein weiterer umfangreicher Versuch durchgeführt. Dabei wurde der Kläranlagenablauf entweder mit Ultraschall (Energiedosen zwischen 41 und 179 mW/l), Ozon (Konzentrationen zwischen 0,83 und 3,28 mg/l) oder der Kombination aus Ultraschall und Ozon (neun Kombinationen: Ultraschall zwischen 45 und 144 mW/l, Ozon zwischen 1,04 und 8,20 mg/l) behandelt. Es wurden insgesamt 20 Proben in konzentrierter und nativer Form mit dem YES-Test untersucht. Alle unbehandelten und behandelten Proben und Konzentrate waren stark zytotoxisch für den YES-Hefestamm. In den Verdünnungsstufen, die nicht mehr zytotoxisch waren, wurde keine estrogenen Aktivität detektiert.

## Aktivkohleadsorption, Flockungsfiltration

In den aufkonzentrierten Ablaufproben des Nachklärbeckens von KA 10 wurden an beiden Probenahmetagen mit ca. 15 bzw. 11 ng/l EEQ hohe Werte bestimmt. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchung der nativen Proben bestätigt werden (15 bzw. 12 ng/l EEQ). Durch Aktivkohleadsorption und Flockungsfiltration erfolgte eine Reduktion auf ca. 1 ng/l EEQ (s. Tab. 15).

Tab. 15: Estradiol-Äquivalente (EEQ) in ng/l in aufkonzentrierten und nativen Ablaufproben einer Kläranlage mit Aktivkohleadsorption

	EEQ (ng/l)			
	aufkonzentriert		nativ	
	Abl. NKB	Abl. FF	Abl. NKB	Abl. FF
KA 10				
10.01.2013	<b>15,3</b>	<b>1,1</b>	<b>15,2</b>	< NG (IR = 1,1)
14.01.2013	<b>10,8</b>	<b>0,8</b>	<b>12,0</b>	< NG (IR = 1,2)

Abl. NKB: Ablauf Nachklärbecken

Abl. FF: Ablauf Flockungsfiltration

IR: Induktionsrate

&lt; NG: Ergebnis unter der Nachweisgrenze

## 5.4 Industrielle Abwässer

Es wurden 22 Ablaufproben von Kläranlagen der chemischen und der Papierindustrie, die am LfU im Rahmen der technischen Gewässeraufsicht (Anhang 22 AbwV und SU 80.24) mit verschiedenen Bio-tests untersucht wurden, nach Sterilfiltration in den YES-Test eingesetzt. Acht dieser Proben wiesen quantifizierbare estrogene Aktivität auf (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), wobei in sieben Proben Werte zwischen 11 und 25 ng/l EEQ und in einer Probe 100 ng/l detektiert wurden. Die stark belastete Probe kam aus der chemischen Industrie, von den sieben anderen belasteten Proben stammten fünf aus der chemischen und zwei aus der Papierindustrie. Für fünf Proben lagen die Ergebnisse unter der Nachweisgrenze, für drei Proben unter der Bestimmungsgrenze (Induktionsraten bis 1,65). Fünf Ergebnisse waren nicht auswertbar, da während des Tests Partikel in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten ausgefallen waren. Dazu kam noch eine Probe, die in unverdünnter Form zytotoxisch für die Hefezellen war und in der 1:2-Verdünnung nicht estrogen wirkte.

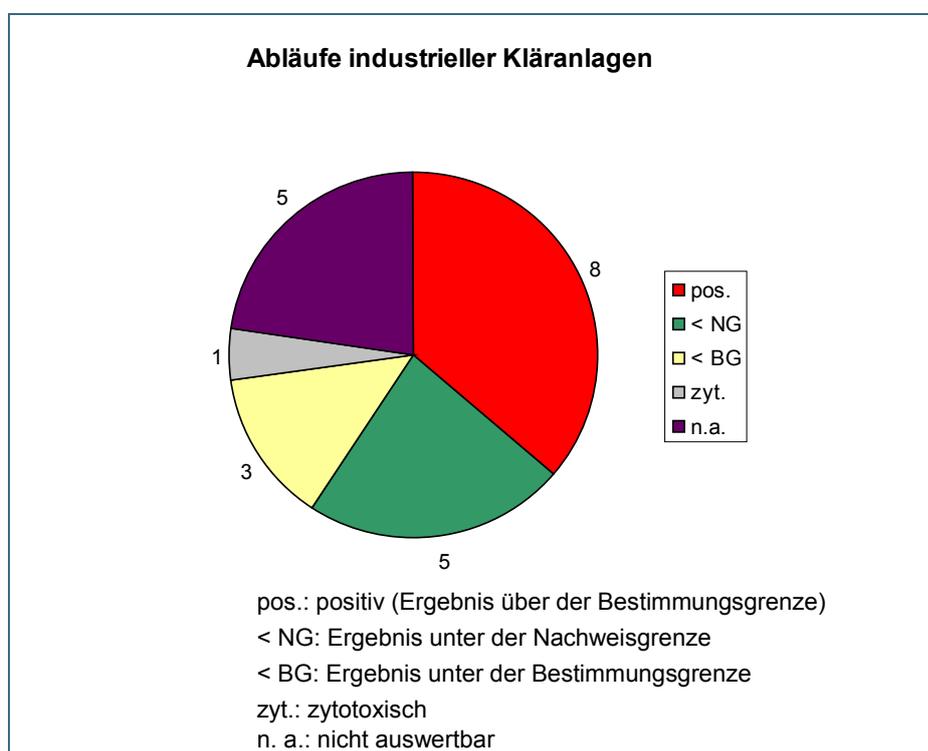


Abb. 3: Ergebnisse des YES-Tests

## 6 Diskussion

### 6.1 Probenlagerung und Filtration

Die in Tab. 4 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch Lagerung im Kühlschrank im Vergleich zur Lagerung in gefrorenem Zustand estrogene Aktivität in Abwasserproben verloren geht. Abwasser-Mikroorganismen könnten auch bei 4 °C noch aktiv sein und estrogen wirksame Stoffe abbauen. Andere Arbeitsgruppen aus dem DIN-Arbeitskreis „Hormonelle Wirkungen“ hatten dagegen berichtet, dass durch Einfrieren und Auftauen von Proben die estrogene Aktivität abnahm.

Wie zu erwarten reduzierte sich die messbare Konzentration an Estradiol-Äquivalenten durch Sterilfiltration. Bei einem Teil der Proben, vor allem Zulaufproben, war die Filtration jedoch unerlässlich, um eine Vermehrung von Abwasser-Mikroorganismen während des YES-Tests zu verhindern (s. auch 6.2.1). Eine Erhöhung der Antibiotika-Konzentrationen im Testmedium wäre evtl. eine Möglichkeit, auf die Sterilfiltration – zumindest in Ablaufproben – zu verzichten. Das Testmedium nach Sumpter (ROUTLEDGE & SUMPTER 1996) enthält höhere Antibiotika-Konzentrationen als das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Medium nach McDonnell (MCDONNELL ET AL. 1991a).

Zum Thema Probenlagerung und Filtration sind noch weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Proben notwendig. Besonders für die Erstellung der ISO-Norm ist es wichtig, hier klare Handlungsanweisungen geben zu können.

### 6.2 Kommunale Kläranlagen

#### 6.2.1 Untersuchung nativer Proben

Obwohl das Reaktionsmedium des YES-Tests (s. 4.2) die Antibiotika Ampicillin und Streptomycin enthielt, kam es zu einer starken Vermehrung der Abwasser-Mikroorganismen während des Tests, wenn nicht filtrierte Zulaufproben in den Test eingesetzt wurden. Da in solchen Fällen nicht zwischen Hefewachstum und dem Wachstum anderer Mikroorganismen unterschieden werden konnte, waren die Tests mit unfiltrierten Zulaufproben nicht auswertbar. Offenbar wirkten die Antibiotika im Medium nicht auf alle in den Zuläufen vorkommenden Mikroorganismen und/oder die Konzentration der Antibiotika war zu gering. Außerdem sind in Kläranlagenzuläufen aufgrund des hohen Partikelgehalts viele Mikroorganismen im Inneren von Schlammflocken vor der Wirkung der Antibiotika geschützt. Ein weiterer Grund für eine starke Vermehrung der Abwasser-Mikroorganismen während des Tests könnte sein, dass in Zulaufproben noch viele Kohlenstoffquellen verfügbar sind, die die Mikroorganismen verwerten können. Daher wurden nach einer kurzen Testphase alle Zulaufproben nur filtriert untersucht. Für über 90 % der 49 untersuchten Zulaufproben konnte für die estrogene Aktivität mit Hilfe des YES-Tests ein quantitatives Ergebnis in Estradiol-Äquivalenten (EEQ) angegeben werden (s. 5.3.1). Nur eine Probe war zytotoxisch, bei drei Proben lag die estrogene Aktivität unter der Bestimmungsgrenze von ca. 8 ng/l. Somit erwies sich die Methode als robust und sensitiv und ist sehr gut geeignet zur Untersuchung nicht aufkonzentrierter filtrierter Kläranlagenzuläufe.

Xenoestrogene besitzen im Vergleich zu Steroidhormonen eine wesentlich geringere estrogene Aktivität. So ist die mit Hilfe verschiedener YES-Tests ermittelte relative estrogene Potenz von Nonylphenol und Bisphenol A im Vergleich zu 17 $\beta$ -Estradiol um drei bis über vier Zehnerpotenzen geringer (MATSUI ET AL. 2000, TANAKA ET AL. 2001, VAN DEN BELT ET AL. 2004). Daher ist bei den meisten kommunalen Kläranlagen davon auszugehen, dass der größte Anteil der estrogenen Aktivität des Abwassers von den natürlichen (und synthetischen) Estrogenen verursacht wird. Haben Industriechemikalien einen nennenswerten Anteil an der Aktivität, müssen der Anteil industriellen Abwassers an der Gesamtabwassermenge und/oder die estrogene Belastung des Industrieabwassers sehr hoch sein.

Unter den Estrogenen hat  $17\beta$ -Estradiol (E2) die höchste estrogene Aktivität. Die in YES-Tests bestimmte relative estrogene Potenz von synthetischem Ethinylestradiol (EE2) ist ähnlich hoch (SCHULTIS & METZGER 2004, VAN DEN BELT ET AL. 2004). Estron (E1) erreicht dagegen nur 20 bis 40 % der estrogenen Potenz von E2 (TANAKA ET AL. 2001, SCHULTIS & METZGER 2004, VAN DEN BELT ET AL. 2004), Estradiol (E3) liegt mit einer um ca. drei Zehnerpotenzen niedrigeren Potenz sogar nur auf dem Niveau der Xenooestrogene (GAIDO ET AL. 1997, MATSUI ET AL. 2000).

Bei sieben der zehn untersuchten Kläranlagen wurden in den Zuläufen stets Konzentrationen unter 20 ng/l EEQ gemessen. KA 1 und KA 3 waren mit Maximalwerten von ca. 36 bzw. 26 ng/l EEQ etwas stärker belastet. Der absolute Höchstwert wurde jedoch mit fast 200 ng/l EEQ in einem Zulauf von KA 10 bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen von bis zu 36 ng/l EEQ stimmen gut mit chemischen Analysenwerten für Steroidhormone von Zuläufen deutscher und kanadischer Kläranlagen überein. So wurden in zwei Untersuchungen durchschnittliche Konzentrationen von ca. 15 ng/l  $17\beta$ -Estradiol und 27 bzw. 49 ng/l Estron gemessen (Ternes et al. 1999, Servos et al. 2005). Beachtet man die gegenüber E2 um 60 bis 80 % verminderte estrogene Potenz von E1 (s. o.), ergibt sich aus den Konzentrationen von E2 und E1 eine estrogene Gesamtaktivität von bis zu 35 ng/l EEQ in den zuvor genannten Untersuchungen von Ternes und Servos. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass die untersuchten Proben von KA 1 bis KA 9 große Mengen an estrogen aktiven Industriechemikalien enthielten. Die bei einer Probenahme im Zulauf von KA 10 ermittelte estrogene Aktivität von fast 200 ng/l EEQ ist dagegen sehr wahrscheinlich nicht allein auf Steroidhormone zurückzuführen. Nach Auskunft des Betriebsleiters leitet eine Vielzahl von Betrieben unterschiedlicher Industriezweige in KA 10 ein.

Auch in den Abläufen einiger Kläranlagen vermehrten sich Abwasser-Mikroorganismen während des YES-Tests, so dass hier – wie schon bei den Zuläufen – eine Filtration erforderlich war. In den meisten Fällen wurden die Ablaufproben daher parallel sowohl nicht filtriert als auch filtriert untersucht. In Tab. 6 bis Tab. 8 sind zur besseren Vergleichbarkeit der Werte nur die Ergebnisse für filtrierte Proben dargestellt. Obwohl Induktionsraten über 1,3 häufig estrogene Aktivität anzeigten, lag sie in allen zunächst untersuchten 61 Ablaufproben unter der Bestimmungsgrenze von ca. 8 ng/l für native Proben (s. 4.4.5). Auch für nicht filtrierte Proben erreichten die Induktionsraten normalerweise nicht den Bereich, in dem eine Quantifizierung möglich war (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei einem Vergleich der Zu- und Abläufe von kommunalen Kläranlagen zeigte sich, dass estrogene Wirkungen während der üblichen Abwasserbehandlung reduziert werden. Die ermittelten Induktionsraten für Kläranlagenabläufe, die zu Desinfektionszwecken mit UV-Strahlung behandelt wurden, lassen darüber hinaus keine signifikante Reduktion estrogenen Aktivität durch UV-Bestrahlung vermuten (s. Tab. 7). Nur 20 % der Ablaufproben der Membranbelebungsanlage (KA 8, s. Tab. 8) zeigten estrogene Aktivität. Insgesamt traten bei der Untersuchung der Ablaufproben keine methodischen Probleme auf, eine Quantifizierung der estrogenen Aktivität war aber in nativen Proben aufgrund der geringen Konzentrationen der estrogen aktiven Substanzen nicht möglich.

## 6.2.2 Untersuchung aufkonzentrierter Proben

### 6.2.2.1 Etablierung der Methode und erste Anwendungen

Im Rahmen der Etablierung der Aufkonzentrierungsmethode wurde ein Vorversuch durchgeführt, in dem mit Estradiol dotiertes Leitungswasser bei verschiedenen pH-Werten extrahiert und mit unterschiedlichen Lösungsmitteln eluiert wurde (s. Tab. 9). Estradiol diente als Leitsubstanz, da nicht alle estrogen wirksamen Substanzen überprüft werden konnten. Die besten Ergebnisse wurden bei neutralem pH-Wert und mit Aceton als Elutionsmittel erzielt. Daher wurden im Folgenden die Proben ohne weitere Vortests bei neutralem pH-Wert extrahiert und mit Aceton eluiert. Neben dem vielversprechenden Ergebnis des Vorversuchs machen zwei weitere Eigenschaften Aceton zu einem geeigneten

Elutionsmittel: Es löst eine große Bandbreite von Chemikalien von der Säule und lässt sich relativ schnell einengen bzw. abdampfen.

Zur Überprüfung der Aufkonzentrierung wurden belastete Rückstellproben aus dem Vitellogenin (VG)-Monitoring-Programm des LfU parallel nativ und aufkonzentriert untersucht (s. Tab. 10). In der Flussprobe wurde keine estrogenen Aktivität detektiert. Für den Zulauf von KA 3 war die im Konzentrat gemessene Aktivität etwas niedriger als die in der nativen Probe. In den Abläufen von KA 1 lagen die Konzentrat-Ergebnisse dagegen stets um 20 bis 30 % über den Ergebnissen der nativen Probe. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht bekannt. Da es sich um ein bis zwei Jahre gelagerte Rückstellproben handelte, erscheint hier eine genauere Diskussion der Ergebnisse nicht sinnvoll. Es hatte sich aber gezeigt, dass die etablierte Aufkonzentrierungsmethode bei Kläranlagenzuläufen und -abläufen sowie Flussproben problemlos angewandt werden konnte. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der nativen Proben zeigt, dass durch die Probenvorbereitungsschritte bei der Aufkonzentrierung keine grundsätzlichen Abweichungen auftreten, sondern vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens konnte durch die Aufkonzentrierung der Proben von etwa 8 ng/l EEQ auf ca. 0,4 ng/l EEQ abgesenkt werden (s. 4.4.5 und 4.4.6).

Beim VG-Monitoring von Referat 78 (LfU) werden neben der eigentlichen Vitellogeninbestimmung im Blut von Fischen Begleituntersuchungen durchgeführt. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um die Bestimmung der estrogenen Aktivität mit Hilfe des E-Screen Assays und die chemische Analytik von Steroidhormonen und estrogen wirksamen Industriechemikalien. Im Rahmen des VG-Monitorings 2011 wurde die estrogenen Aktivität zusätzlich mit dem YES-Test in aufkonzentrierten Proben nachgewiesen. Die Ergebnisse von E-Screen Assay und YES-Test stimmten insofern überein, dass in allen Kläranlagenablaufproben und allen Flussproben, die unterhalb der Kläranlageneinleitungsstelle entnommen wurden, estrogenen Aktivität oberhalb der Bestimmungsgrenze detektiert wurde (s. Tab. 11). Außerdem wurde mit beiden Methoden am vierten Probenahmetag der höchste Wert gemessen. In den Flussproben oberhalb der Kläranlage lag die estrogenen Aktivität im YES-Test unter der Nachweis-, im E-Screen Assay unter der Bestimmungsgrenze. Die ermittelten Konzentrationen an Estradiol-Äquivalenten waren beim E-Screen Assay meist deutlich höher als beim YES-Test. Dass mit den beiden biologischen Testsystemen quantitative unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden, ist nicht überraschend. So können additive und synergistische Effekte mit den biologischen Mechanismen, auf denen die Tests beruhen, variieren (Nelson et al. 2007). Hinzu kommt noch, dass ein Teil der estrogenen Aktivität in den Proben möglicherweise schon abgebaut worden war, als sie mit dem YES-Test untersucht wurden. Die Proben waren fünf Monate bei -20 °C gelagert worden, ehe sie nach erfolgreicher Etablierung der Methode aufkonzentriert werden konnten. Übereinstimmend mit den beiden *in vitro*-Testverfahren wurde im Blut der männlichen Regenbogenforellen, die vier Wochen im gereinigten Abwasser bzw. im Fluss unterhalb der Einleitungsstelle von KA 2 gehalten wurden, ein hochsignifikanter Anstieg der Vitellogeninkonzentration um den Faktor 187 bzw. 13 ermittelt (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Zunahme der Vitellogeninkonzentration im Blut der oberhalb der Einleitungsstelle gehaltenen Fische war sehr gering (Faktor 1,5). Hier ist jedoch noch anzumerken, dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist, da es sich beim Anstieg der Vitellogeninkonzentration um einen Summenparameter handelt, der einen vierwöchigen Zeitraum abbildet. Die mit YES-Test und E-Screen Assay gemessenen Estradiol-Äquivalente sind dagegen nur Momentaufnahmen aus dem Untersuchungszeitraum. Die Ergebnisse der Steroidhormon-Analytik (s. Tab. 11) können die mit den drei biologischen Testsystemen bestimmte erhöhte estrogenen Aktivität im Ablauf von KA 2 und im Fluss unterhalb der Kläranlage nur bedingt erklären. In fast allen Proben wurde lediglich Estron detektiert, in einem Kläranlagenablauf zusätzlich sehr geringe Konzentrationen an 17 $\beta$ -Estradiol und Estriol. Aufgrund der geringen relativen estrogenen Potenz (s. 6.2.1) von Estron müssten die in den beiden *in vitro*-Testverfahren ermittelten Konzentrationen an Estradiol-Äquivalenten niedriger sein, wenn sie allein von Estron verursacht würden. Allerdings wurde der Maximalwert der Estronkonzentration am vierten Probenahmetag erreicht, an dem auch die Konzentration der Estradiol-Äquivalente am höch-

ten war. Da auch die Konzentrationen von Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A und Di-isononylphthalat weit unter der estrogenen Wirksamkeitsschwelle lagen (Ergebnisse nicht dargestellt), sind vermutlich additive und/oder synergistische Effekte für die erhöhten estrogenen Aktivitäten verantwortlich. Sowohl die biologischen (YES-Test, E-Screen Assay, Vitellogenin-Nachweis) als auch die chemischen Untersuchungsergebnisse zeigen, dass KA 2 die Hauptbelastungsquelle für estrogen wirksame Substanzen für den Fluss in diesem Bereich darstellt.

### 6.2.2.2 Weitergehende Abwasserreinigung

Nach Untersuchung nativer Ablaufproben vor und nach UV-Bestrahlung (KA 3 bis KA 7) war schon vermutet worden, dass diese Behandlung, die primär zum Zwecke der Abwasserdesinfektion betrieben wurde, nicht zur Reduktion estrogener Aktivität führte (s. 6.2.1). Diese Vermutung bestätigte sich durch Untersuchung aufkonzentrierter Proben (s. Tab. 12). UV-Strahlung kann zwar durch Photolyse estrogen wirksame Substanzen zerstören, dieser Prozess ist jedoch nicht effektiv (CHEN ET AL. 2006) und hängt auch von der eingesetzten Wellenlänge und Energie ab. UV-Strahlung in Verbindung mit einem Katalysator (z. B. Titandioxid; BELGIORNO ET AL. 2007, ZHANG & ZHOU 2008) und/oder Wasserstoffperoxid („advanced oxidation processes“; BAEZA & KNAPPE 2011, CHEN ET AL. 2012) gilt dagegen als vielversprechende Methode zur Reduzierung von Spurenstoffen im Abwasser. Insgesamt fiel auf, dass die estrogene Aktivität in den Abläufen von KA 4 mit 2 bis über 4 ng/l EEQ im Vergleich zu den anderen Anlagen mit UV-Behandlung erhöht war. Grund dafür könnte sein, dass auf KA 4 kein Sandfilter installiert ist, durch den Partikel und Substanzen aus dem Ablauf entfernt werden (s. auch 6.2.3).

Die Ablaufproben der Membranbelebungsanlage (KA 8, s. Tab. 13) waren nur sehr gering mit estrogen wirksamen Substanzen belastet, obwohl im Zulauf nennenswerte Mengen von im Mittel 12 ng/l EEQ vorhanden waren (s. Tab. 5). In zwei der vier untersuchten Konzentrate lag die estrogene Aktivität im Ablauf sogar unter der Bestimmungsgrenze des YES-Tests (ca. 0,4 ng/l EEQ). Auch KHALIL und Mitarbeiter (2006) beschreiben einen verbesserten Abbau von estrogen aktiven Substanzen in Membran-Bioreaktoren.

Mit Werten bis zu 12 ng/l EEQ wiesen die Ablaufproben von KA 9 eine hohe estrogene Belastung auf (s. Tab. 14). Mit den dort installierten Pilotanlagen zur weitergehenden Abwasserreinigung mittels Ultraschall- und Ozonbehandlung wurde die estrogene Aktivität jedoch effizient reduziert. Problematisch erwies sich in dieser Anlage, dass im Ablauf häufig zytotoxische Wirkungen feststellbar waren. Estrogene Restaktivität nach Ultraschall- und Ozonbehandlung könnte daher durch zytotoxische Substanzen in den Proben überdeckt worden sein. Ein weiterer Versuch mit Pilotanlage B scheiterte an der im Vergleich zum ersten Versuchstag noch einmal stark erhöhten Zytotoxizität der Proben. Welche Substanzen die Giftigkeit gegenüber den Testorganismen verursachten, ist nicht bekannt. Dass Ozonierung zu einer signifikanten Verringerung der estrogenen Aktivität von geklärtem Abwasser um bis zu 98 % führt, wurde schon von mehreren Autoren beschrieben (z. B. REUNGOAT ET AL. 2012, STALTER ET AL. 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass Ultraschall zum Abbau schädlicher Chemikalien beitragen kann (BELGIORNO ET AL. 2007).

Ein Hauptgrund für die Installation einer Aktivkohleadsorptionsanlage auf KA 10 war die Tatsache, dass die natürliche Wasserführung des Flusses, in den die Kläranlage einleitet, sehr gering ist. In abflussarmen Zeiten liegt der Anteil des Kläranlagenablaufs am Wasservolumen bei mehr als 80 %. Mit bis zu 15 ng/l EEQ waren die Ablaufproben des Nachklärbeckens von KA 10 hoch belastet (s. Tab. 15). Aktivkohleadsorption und Flockungsfiltration führten zu einer über 90-prozentigen Reduktion der estrogenen Wirksamkeit auf ca. 1 ng/l EEQ. Diese Reduktionsleistung überschreitet sogar die in der Literatur zu findenden Werte von knapp 80 % (GROVER ET AL. 2011, STALTER ET AL. 2011).

### 6.2.3 Reduktion estrogener Wirkungen in den Kläranlagen

Es wurden Zu- und Ablaufproben von zehn verschiedenen Kläranlagen auf estrogene Wirkungen untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf den Ablaufproben, um einen Überblick über die Belastungssituation bzgl. estrogen wirksamer Substanzen in Bayern zu erhalten. Die Untersuchung von Zulaufproben diente u. a. dazu festzustellen, ob sich erhöhte Belastungen in den Zuläufen in den Abläufen widerspiegeln. Absolute Werte für Reduktionsleistungen bestimmter Kläranlagen können aus den vorliegenden Daten nicht berechnet werden. Zum einen wurden meistens lediglich Stichproben von Zu- und Abläufen entnommen. Die Probenahme mittels automatischer Probenehmer wäre problematisch aufgrund estrogen wirksamer Substanzen, die sich aus dem Schlauchmaterial lösen können und so die Ergebnisse verfälschen würden. Zum anderen erfolgte die Probenahme von Zu- und Abläufen etwa zum gleichen Zeitpunkt. Die Aufenthaltszeit in der Kläranlage wurde daher nicht berücksichtigt. Da die ermittelten Konzentrationen an Estradiol-Äquivalenten in Zu- und Abläufen bei den meisten Kläranlagen an den unterschiedlichen Probenahmetagen relativ ähnlich waren, können Reduktionsleistungen trotzdem abgeschätzt werden. Viele der untersuchten Anlagen ohne weitergehende Reinigungsmaßnahmen erreichten Reduktionsleistungen von ca. 90 % (Mittelwerte Zuläufe: 12 bis 15 ng/l EEQ, Abläufe: 1 bis 1,5 ng/l EEQ). Betrachtet man die Abläufe von KA 1, KA 9 (vor Ultraschall-Ozonierung) und KA 10 (vor Aktivkohleadsorption und Flockungsfiltration), ist von wesentlich geringeren Reduktionsraten auszugehen. Höhere Konzentrationen an estrogen wirksamen Substanzen in den Zuläufen spielten hier vermutlich nur eine untergeordnete Rolle (s. Tab. 5). Die bei KA 9 und 10 gemessenen Konzentrationen von 11 bis 15 ng/l EEQ (s. Tab. 14 und Tab. 15) und bei KA 1 von bis zu 30 ng/l EEQ (s. Tab. 10) stellten die absoluten Höchstwerte für Kläranlagenabläufe im Projektzeitraum dar. Gemeinsam ist diesen drei Anlagen, dass die biologische Reinigung des Abwassers mittels Tropfkörpern erfolgt. Die anderen sieben Anlagen verwenden das Belebungsverfahren (s. Tab. 1). Leicht erhöhte Werte von 2 bis 4 ng/l EEQ wurden im Ablauf von KA 4 gemessen (s. Tab. 12). Im Unterschied zu KA 3, 5, 6 und 7 ist hier dem Nachklärbecken kein Sandfilter nachgeschaltet. Von Reduktionsleistungen weit über 90 % ist bei der Membranbelebungsanlage (KA 8) und bei KA 9 nach Ultraschall-Ozonierung auszugehen. Hier lag die estrogene Aktivität in den Endabläufen häufig unter der Bestimmungsgrenze von 0,4 ng/l EEQ (s. Tab. 13 und Tab. 14). Aktivkohleadsorption und Flockungsfiltration (KA 10, s. Tab. 15) führten ebenfalls zu guten Ergebnissen. Die Angabe einer Reduktionsrate erscheint hier nicht sinnvoll, da die estrogene Aktivität des Zulaufs von KA 10 offensichtlich enormen Schwankungen unterliegt (s. Tab. 5). Zu betonen ist aber noch einmal, dass es sich bei den Reduktionsleistungen nur um Schätzwerte handelt. Neben den bereits genannten Gründen gibt es noch einige Punkte, die dazu führen, dass Ergebnisse für Zu- und Abläufe nicht problemlos miteinander verglichen werden können. So kann die Tatsache, dass Estrogene in den Zuläufen zum Teil noch in konjugierter Form als Sulfate und Glucuronide vorliegen, dazu führen, dass die Konzentration an estrogen wirksamen Substanzen unterschätzt wird. In dieser Form sind sie wesentlich weniger aktiv als in unkonjugierter Form (COMBALBERT & HERNANDEZ-RAQUET 2010). Hinzu kommt noch, dass Ablaufproben aufkonzentriert, Zulaufproben dagegen in der Regel nicht aufkonzentriert untersucht wurden. Allerdings wären auch aufkonzentrierte Proben nicht unbedingt direkt vergleichbar, da die Festphasenextraktion von Zu- und Ablaufproben vermutlich nicht gleich effektiv verläuft. Hier könnten wiederum konjugierte und unkonjugierte Formen der Estrogene, verschiedene Feststoffgehalte und Extraktionsvolumina zu Unterschieden führen.

Die meisten Autoren geben für Estradiol (E2) und Ethinylestradiol (EE2) Reduktionsleistungen von über 80 % in konventionellen Kläranlagen an, für Estron (E1) dagegen häufig geringere Werte. Es gibt jedoch große Schwankungen zwischen verschiedenen Anlagen. Für Estron wurden Eliminationsraten von 19 bis 98 %, für Estradiol von 62 bis 98 % und für Ethinylestradiol von 76 bis über 90 % bestimmt (JOHNSON & SUMPTER 2001, JOHNSON & WILLIAMS 2004, KHANAL ET AL. 2006). Verschiedene Parameter im Prozess der Abwasserreinigung, wie z. B. die hydraulische Aufenthaltszeit und das Schlammalter (COMBALBERT & HERNANDEZ-RAQUET 2010), beeinflussen die Raten. Die Reduktion der Estrogene in einer konventionellen Kläranlage mit Belebungsverfahren könnte entweder durch Sorption an Be-

lechtschlammflocken und anschließende Entfernung über den Überschussschlamm und/oder durch biologischen Abbau erfolgen. Verschiedene Autoren vermuten, dass die Estrogene gut an Schlammflocken sorbieren und die Reduktion hauptsächlich durch mikrobiellen Abbau erfolgt (ATKINSON ET AL. 2012, KHANAL ET AL. 2006). Hauptvorgänge dabei sind die Dekonjugation von Sulfaten und Glucuroniden und die Oxidation von Estradiol bzw. Ethinylestradiol zu Estron. ANDERSEN und Mitarbeiter (2005) berechneten, dass in Kläranlagen mit Belebungsverfahren 54 bis 75 % der Estrogen-Fracht (E1, E2 und EE2) an die Schlammflocken im Belebungsbecken sorbiert. Auch sie gehen davon aus, dass die Reduktion der Estrogene in Kläranlagen hauptsächlich durch biologische Oxidation erfolgt, da nur weniger als 2 % der Estrogen-Fracht mit dem Überschussschlamm entfernt wird.

Ein wichtiger Faktor bei der Reduzierung estrogen wirksamer Substanzen in Kläranlagen scheint ein hohes Schlammalter zu sein. Je mehr Zeit zur Verfügung steht, umso größer ist die Menge an estrogenen Substanzen, die biologisch abgebaut wird. Zudem ist es wichtig, dass so wenig Schlammflocken wie möglich in den Ablauf gelangen, da ein großer Teil der estrogen wirksamen Fracht an Flocken gebunden vorliegt. Die Abläufe von KA 4 (ohne Sandfilter) sowie von KA 1, 9 und 10 (Tropfkörper) enthielten oft deutlich mehr Flocken als die Abläufe der anderen Anlagen, was vermutlich zu den erhöhten estrogenen Aktivitäten führte. Bei Tropfkörperanlagen kommt es vor allem bei sich stark ändernden Außentemperaturen vermehrt zur Ablösung des Biofilms vom Tropfkörper. Auch SVENSON ET AL. (2003) fanden einen effektiveren Abbau estrogen wirksamer Stoffe in Belebungsanlagen im Vergleich zu Tropfkörperanlagen. Die gute Reduktionsleistung der Membranbelebungsanlage KA 8 kann einerseits auf das in Membrananlagen vorherrschende hohe Schlammalter zurückgeführt werden, das zu einem verbesserten biologischen Abbau der estrogen aktiven Substanzen führt (KHANAL ET AL. 2006). Andererseits spielte sicher auch die gute Abtrennung der Schlammflocken durch die Membranfiltration eine Rolle. Zuvor noch nicht abgebaute estrogen wirksame Substanzen adsorbieren in der Aktivkohleanlage von KA 10 an die Kohle. Die Kohlepartikel werden durch Sedimentation und Flockungsfiltration abgetrennt. In Reaktions- und Sedimentationsbecken sowie im Filter besteht auch die Möglichkeit für weiteren biologischen Abbau der Spurenstoffe. Die Reduktion der estrogen wirksamen Stoffe durch die Ultraschall-Ozonierungsanlage von KA 9 ist im Wesentlichen auf chemische Oxidationsprozesse zurückzuführen. Bei der Ozonierung ist grundsätzlich zu beachten, dass toxische Transformationsprodukte von Spurenstoffen entstehen können. Durch nachgeschaltete Sandfilter können toxische Oxidationsprodukte entfernt oder entgiftet werden (MAGDEBURG ET AL. 2012).

### 6.3 Industrielle Kläranlagen

Für mehr als ein Viertel der untersuchten Ablaufproben von Kläranlagen aus der chemischen und der Papierindustrie konnte für den YES-Test kein Ergebnis angegeben werden. Dabei wirkte aber nur eine Probe zytotoxisch auf den Hefe-Testorganismus. In den anderen Fällen führte der Ausfall von Partikeln im Testmedium dazu, dass die Tests nicht ausgewertet werden konnten. Vermutlich waren hohe Salzgehalte in den Proben für dieses Phänomen verantwortlich. Für die Hälfte der verbleibenden Proben lagen die Ergebnisse unter der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze für native Proben. Hier wäre – wie bei den Abläufen kommunaler Anlagen – eine Aufkonzentrierung sinnvoll. Im Gegensatz zu den kommunalen Abläufen, für die meist keine quantifizierbaren Konzentrationen an Estradiol-Äquivalenten aus den nativen Proben bestimmt werden konnten, enthielt mehr als ein Drittel der industriellen Ablaufproben quantifizierbare estrogene Aktivität. Die Konzentrationen lagen bei 11 bis 25 ng/l EEQ, in einer Probe bei 100 ng/l (s. 5.4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige Industriekläranlagen – im Vergleich zu vielen kommunalen Anlagen – Abläufe mit deutlich erhöhten Konzentrationen an estrogen wirksamen Substanzen (vermutlich Xenoestrogene) in bayerische Oberflächengewässer einleiten.

## 6.4 Eignung des YES-Testsystems zur Untersuchung von Abwasser

Insgesamt erwies sich das Testsystem als robust und relativ einfach durchzuführen. Nur in Ausnahmefällen bereiteten toxische Abwasserinhaltsstoffe für den Hefe-Teststamm Probleme. Einige Tests mit Industrieabwässern waren nicht auswertbar – vermutlich aufgrund hoher Salzgehalte. Im Gegensatz zu Testsystemen mit menschlichen oder tierischen Zellkulturen, wie z. B. dem E-Screen Assay, kann der YES-Test auch in mikrobiologischen Laboren durchgeführt werden, die nicht mit Zellkulturen arbeiten. Allerdings ist beim YES-Test die Erlaubnis zum Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen der Sicherheitsstufe 1 erforderlich. Umweltlabore, die Abwasser mit dem umu-Test (DIN 38412-3; Anhang 22 AbwV) auf gentoxische Wirkungen untersuchen, haben diese Genehmigung ohnehin.

Das Testsystem ist sehr empfindlich, estrogene Wirkungen im Bereich von wenigen ng/l Estradiol-Äquivalenten können erfasst werden. In nativen Proben liegt die Bestimmungsgrenze bei ca. 8 ng/l. Da Kläranlagenabläufe jedoch häufig niedriger belastet sind und diese geringen Belastungen trotzdem Schadwirkungen nach sich ziehen können, wurde eine Aufkonzentrierungsmethode entwickelt. So konnte die Bestimmungsgrenze auf ca. 0,4 ng/l verringert werden und die estrogene Aktivität sogar in abwasserbelasteten Flussproben quantifiziert werden.

## 7 Schlussfolgerungen

- Der YES-Test erwies sich als robust, relativ einfach anwendbar und sensitiv. Er war zur Bestimmung der estrogenen Aktivität von Abwasser kommunaler und industrieller Herkunft gut geeignet.
- Für gering belastete Kläranlagenabläufe und Flusswasser konnten quantitative Ergebnisse nur nach Festphasenextraktion angegeben werden.
- Die Abläufe vieler bayerischer kommunaler Kläranlagen waren mit 1 bis 1,5 ng/l EEQ eher gering belastet. Es wurden jedoch auch höhere Konzentrationen bis maximal 30 ng/l EEQ gemessen.
- Die Abläufe von Tropfkörper-Kläranlagen wiesen höhere Belastungen auf als konventionelle Belebungsanlagen.
- Hohes Schlammalter und geringer Schlammabtrieb scheinen sehr wichtig für eine effektive Reduzierung estrogen aktiver Substanzen in konventionellen Kläranlagen zu sein.
- Von den weitergehenden Abwasserreinigungsmaßnahmen erwiesen sich in der vorliegenden Untersuchung Ultraschall-Ozonierung, Aktivkohlebehandlung und das Membranbelebungsverfahren als geeignet zur weiteren Reduktion estrogener Aktivität. Zur Abwasserdesinfektion eingesetzte UV-Bestrahlung leistete zur Elimination estrogener Wirkungen keinen Beitrag.

## 8 Zusammenfassung

Hormonell wirksame Substanzen können in der Umwelt vielfältige Schädwirkungen nach sich ziehen. Zur Detektion werden neben chemischer Analytik auch biologische Wirktests eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante des YES (Yeast Estrogen Screen)-Tests etabliert und zur Bestimmung estrogener Wirkungen in Abwasser- und Flussproben angewandt. Die Durchführung des YES-Tests erfolgte in Anlehnung an den Normentwurf, der derzeit im DIN-Arbeitskreis „Hormonelle Wirkungen (Xenohormone)“ bearbeitet wird.

Das Testsystem erwies sich als robust, relativ einfach anwendbar und sensitiv. Die Bestimmungsgrenze in nativen Proben lag bei ca. 8 ng/l Estradiol-Äquivalenten (EEQ). Geringer belastete Kläranlagenablauf- und Flussproben wurden durch Festphasenextraktion aufkonzentriert. So konnte die Bestimmungsgrenze auf 0,4 ng/l EEQ abgesenkt werden.

In den Zuläufen der meisten Kläranlagen wurden estrogene Aktivitäten von unter 20 ng/l EEQ gemessen, der Maximalwert lag bei fast 200 ng/l. Konventionell gereinigtes Abwasser war mit 1 bis 1,5 ng/l EEQ häufig eher gering belastet. Werte von bis zu 15 ng/l EEQ, in einer Kläranlage sogar bis zu 30 ng/l EEQ, wurden jedoch auch detektiert. Auffällig war, dass hohe Aktivitäten von über 5 ng/l EEQ ausschließlich in den Abläufen von Kläranlagen, in denen die biologische Abwasserreinigung in Tropfkörpern erfolgte, gemessen wurden. Bei Belebungsanlagen gab es Hinweise, dass die Reduktionsleistung bzgl. estrogen wirksamer Substanzen schwächer war, wenn dem Nachklärbecken kein Sandfilter nachgeschaltet war. Vermutlich war hauptsächlich Schlammabtrieb in den Tropfkörper- bzw. Belebungsanlagen ohne Sandfilter für erhöhte estrogene Aktivitäten verantwortlich. Dies erscheint plausibel, da estrogen wirksame Stoffe gut an Schlammflocken sorbieren. Verbleiben die sorbierten Stoffe lange genug in der biologischen Reinigungsstufe einer Kläranlage, können sie zum großen Teil abgebaut werden. Daher wirkt sich auch ein hohes Schlammalter positiv auf die Reduktion estrogen wirksamer Substanzen aus.

In den untersuchten Kläranlagen mit UV-Desinfektionsstufe führte die UV-Bestrahlung nicht zu einer weiteren Verringerung der estrogene Aktivität. Vielversprechende Ergebnisse lieferten jedoch Ozonierung (in Kombination mit Ultraschall), Aktivkohlebehandlung sowie das Membranbelebungsverfahren. Für Kläranlagen, die mit diesen weitergehenden Abwasserreinigungsmaßnahmen ausgestattet sind, konnten für die estrogene Aktivität Reduktionsleistungen von weit über 90 % abgeschätzt werden.

## Literatur

ANDERSEN HR, HANSEN M, KJØLHOLT J, STUER-LAURIDSEN F, TERNES TA & HALLING-SØRENSEN B (2005): Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61 (1), 139-146.

ATKINSON SK, MARLATT VL, KIMPE LE, LEAN DRS, TRUDEAU VL & BLAIS JM (2012): The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 430, 119-125.

BAEZA C & KNAPPE DRU (2011): Transformation kinetics of biochemically active compounds in low-pressure UV Photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation processes. *Water Res* 45 (15), 4531-4543.

BELGIORNO V, RIZZO L, FATTA D, DELLA ROCCA C, LOFRANO G, NIKOLAOU A, NADDEO V & MERIC S (2007): Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination* 215 (1-3), 166-176.

CHEN JL, RAVINDRAN S, SWIFT S, WRIGHT LJ & SINGHAL N (2012): Catalytic oxidative degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by Fe<sup>III</sup>-TAML/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Estrogenicities of the products of partial, and extensive oxidation. *Water Res* 46 (19), 6309-6318.

CHEN P-J, LINDEN KG, HINTON DE, KASHIWADA S, ROSENFELDT EJ & KULLMAN SW (2006): Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere* 65 (7), 1094-1102.

COMBALBERT S & HERNANDEZ-RAQUET G (2010): Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl Microbiol Biotechnol* 86 (6), 1671-1692.

GAIDO KW, LEONARD LS, LOVELL S, GOULD JC, BABAI D, PORTIER CJ & McDONNELL DP (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharm* 143 (1), 205-212.

GROVER DP, BALAAM J, PACITTO S, READMAN JW, WHITE S & ZHOU JL (2011): Endocrine disrupting activities in sewage effluent and river water determined by chemical analysis and in vitro assay in the context of granular activated carbon upgrade. *Chemosphere* 84 (10), 1512-1520.

JOHNSON AC & SUMPTER JP (2001): Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ Sci Technol* 35 (24), 4697-4703.

JOHNSON AC & WILLIAMS RJ (2004): A model to estimate influent & effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environ Sci Technol* 38 (13), 3649-3658.

KHANAL SK, XIE B, THOMPSON ML, SUNG S, ONG S-K & VAN LEEUWEN J (2006): Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ Sci Technol* 40 (21), 6537-6546.

MAGDEBURG A, STALTER D & OEHLMANN J (2012): Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species. *Chemosphere* 88 (8), 1008-1014.

MATSUI S, TAKIGAMI H, MATSUDA T, TANIGUCHI N, ADACHI J, KAWAMI H & SHIMIZU Y (2000): Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Wat Sci Technol* 42 (12), 173-179.

McDONNELL DP, NAWAZ Z, DENSMORE C, WEIGEL NL, PHAM TA, CLARK JH & O'MALLEY BW (1991a): High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Steroid Biochem Molec Biol* 39 (3), 291-297.

McDONNELL DP, NAWAZ Z & O'MALLEY BW (1991b): In situ distinction between steroid receptor binding and transactivation at a target gene. *Mol Cell Biol* 11 (9), 4350-4355.

NELSON J, BISHAY F, VAN ROODESelaar A, IKONOMOU ML & LAW FCP (2007): The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. *Sci Total Environ* 374 (1), 80-90.

REUNGOAT J, ESCHER BI, MACOVA M, ARGAUD FX, GERNJAK W & KELLER J (2012): Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 46 (3), 863-872.

ROUTLEDGE EJ & SUMPTER JP (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15 (3), 241-248.

SCHULTIS T & METZGER JW (2004): Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57 (11), 1649-1655.

SERVOS MR, BENNIE DT, BURNISON BK, JURKOVIC A, MCINNIS R, NEHELI T, SCHNELL A, SETO P, SMYTH SA & TERNES TA (2005): Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 336 (1-3), 155-170.

STALTER D, MAGDEBURG A, WAGNER M & OEHLMANN J (2011): Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Res* 45 (3), 1015-1024.

SVENSON A, ALLARD A-S & EK M (2003): Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res* 37 (18), 4433-4443.

TANAKA H, YAKOU Y, TAKAHASHI A, HIGASHITANI T & KOMORI K (2001): Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment. *Water Sci Technol* 43 (2), 125-132.

TERNES TA, KRECKEL P & MUELLER J (1999): Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 225 (1-2), 91-99.

VAN DEN BELT K, BERCKMANS P, VANGENECHTEN C, VERHEYEN R & WITTERS H (2004): Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol & nonylphenol. *Aquat Toxicol* 66 (2), 183-195.

ZHANG Y & ZHOU JL (2008): Occurrence & removal of endocrine disrupting chemicals in wastewater. *Chemosphere* 73 (5), 848-853.

