

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben (Kurzfassung)

„Aktivität von östrogen und androgen aktiven
Substanzen während und nach der Ozonung von
Krankenhausabwasser.“

Förderbereich 6: Forschungs- und Entwicklungsprojekte
zur Abwasserbeseitigung
„Ressourceneffiziente Abwasserbeseitigung NRW“

Gefördert durch

Ministerium für Klimaschutz, Umwelt,
Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz
des Landes Nordrhein-Westfalen



Für das Projektkonsortium:

Duisburg, den 30.11.2015

Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA)

Dr. rer. nat. Jochen Türk

Partner	
	IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH Prof. Dr. Elke Dopp Moritzstraße 26 45476 Mülheim an der Ruhr Tel.: 0208/40303-362 elke.dopp@uni-due.de
	Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Dr. Jochen Türk Bliersheimer Straße 58-60 47229 Duisburg Tel.: 02065/418-179 tuerk@iuta.de
	Goethe-Universität Frankfurt am Main Dr. Martin Wagner Max-von-Laue-Straße 13 60438 Frankfurt am Main Tel.: 069/798-42149 wagner@bio.uni-frankfurt.de
	Emschergenossenschaft/Lippeverband Dipl.-Ing. Sven Lyko Kronprinzenstraße 24 45128 Essen Tel.: 0201/104 3406 lyko.sven@eglv.de

Zitiervorschlag:

Türk, J., Bielak, H., Behr, A., Dopp, E., Gehrmann, L., Itzel, F., Lyko, S., Simon, A., Wagner, M. (2015): Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben „Aktivität von östrogen und androgen aktiven Substanzen während und nach der Ozonung von Krankenhausabwasser“, gefördert durch das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MKULNV), LANUV NRW Az.: 17-04.02.01-04a/2013.

Danksagung

Die Projektbeteiligten bedanken sich beim MKULNV für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten und beim LANUV NRW für die fachliche Begleitung und Unterstützung bei der Projektabwicklung. Ein besonderer Dank gilt hier Herrn Jan Oesterbeck und Frau Corinna Schwegel.

Für die Unterstützung bei den Probenahmen danken wir den Mitarbeitern der Krankenhauskläranlage am Marienhospital.

Inhaltsverzeichnis der Kurzfassung

Abbildungs-, Tabellen- und Literaturverzeichnis	3
1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	5
3. Ziel der Untersuchung	6
4. Anlagenbeschreibung.....	8
4.1. Übersicht über die verwendeten Testverfahren	9
4.1.1. Agonistische Effekte	10
4.1.2. Antagonistischen Aktivität.....	13
4.2. Fraktionierung und instrumentelle Analytik	17
4.3. Vergleich der verwendeten Assays	19
5. Relevanz der erzielten Ergebnisse für die Wasserwirtschaft.....	21
6. Fazit und Ausblick	22

Abbildungs-, Tabellen- und Literaturverzeichnis

Das Abbildungs-, Tabellen- und Literaturverzeichnis sind in der Langfassung des Abschlussberichtes aufgeführt.

1. Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war die Untersuchung endokriner Aktivitäten in der Kläranlage am Marienhospital in Gelsenkirchen. Im Zuge dessen sollte die aus vorangegangenen Untersuchungen abgeleitete Hypothese, dass die selektive Elimination von Antiöstrogenen bei der Ozonung die Maskierung der Östrogene aufhebt und somit zu einer vermeintlich höheren östrogenen Aktivität nach der oxidativen Behandlung führen kann, näher beleuchtet werden. Dazu wurden *Arxula adenivorans*, CALUX und *Saccharomyces cerevisiae* Testsysteme eingesetzt und diese auch hinsichtlich ihrer Eignung und Empfindlichkeit zur Untersuchung von Kläranlagenproben verglichen.

Eine gute Elimination der östrogenen und androgenen Aktivität wurde im Membranbioreaktor der Krankenhaus-Kläranlage festgestellt. In den nachfolgenden Behandlungsstufen (Ozonung und Sandfiltration) war eine weitere Reduzierung zu beobachten, so dass nach der Sandfiltration keine agonistischen Effekte nachweisbar waren. Die Untersuchungen der antagonistischen Effekte (Antiöstrogenität und Antiandrogenität) zeigten höhere Aktivitäten als die agonistischen Effekte und eine schlechtere Eliminierung bei der Abwasserreinigung. Im Membranbioreaktor werden, wie auch bei den agonistischen Effekten, je nach verwendetem Biotest bis zu 50% der Aktivität eliminiert. Allerdings findet in den folgenden Behandlungsstufen keine weitere Verringerung statt. Dies führt dazu, dass auch im Ablauf des Sandfilters als abschließende Behandlungsstufe weiterhin sowohl antiöstrogene als auch antiandrogene Aktivitäten nachweisbar sind. Der Effekt der Erhöhung der östrogenen Aktivität konnte nach Ozonung in den Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes nicht erneut beobachtet werden. Die hohen antagonistischen Aktivitäten weisen auf die hohe Relevanz dieser Substanzgruppe hin und untermauern die Möglichkeit maskierender Effekte. Außerdem wird durch diese Untersuchungen deutlich, dass die antagonistischen Substanzen nur unzureichend abgebaut werden, da weiterhin im Ablauf des Sandfilters eine Aktivität nachweisbar ist.

Der Vergleich der verwendeten Testsysteme zeigt Unterschiede, insbesondere hinsichtlich der zytotoxischen Matrixeffekte als auch der Nachweisempfindlichkeit. Während in den *Arxula*-Assays keinerlei zytotoxische Matrixeffekte beobachtet werden konnten, zeigen die CALUX-Systeme eine deutliche Beeinträchtigung, so dass die Proben nur stark verdünnt analysiert werden konnten. Die *Saccharomyces* Assays zeigten nur in den Zulaufproben zytotoxische Effekte und bakterielle Kontaminationen.

Die Fraktionierung der Proben einzelner Behandlungsstufen zeigt, dass keine östrogen oder androgen aktiven Substanzen durch die Ozonung gebildet werden. Dies untermauert die Hypothese, dass maskierende Effekte für die, in vorangegangenen Untersuchungen beobachteten, erhöhten östrogenen Aktivitäten verantwortlich waren.

Die Substanzanalytik mittels LC-MS/MS und GC-MS zeigt vergleichbare Ergebnisse wie die Bioassays. Wie zu erwarten, konnten die höchsten Konzentrationen und die meisten Substanzen in den Zulaufproben detektiert werden. Bis auf einige Ausnahmen wurden diese im MBR bis unterhalb der Nachweisgrenze der instrumentellen Methode reduziert. Die übrigen Substanzen zeigen in den zusätzlichen Behandlungsstufen sehr geringe Konzentrationen und es wird eine Elimination deutlich.

Antiöstrogene bzw. antiandrogene Arzneimittelwirkstoffe wie Tamoxifen oder Flutamid konnten nicht nachgewiesen werden. Da in den Assays jedoch hohe antagonistische Wirkungen beobachtet wurden, ist es wahrscheinlich, dass bisher noch nicht betrachtete Substanzen für die Wirkung verantwortlich sind.

Die im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnisse zeigen die Relevanz antagonistischer Substanzen bei der Abwasserreinigung. Allerdings besteht noch deutlicher Forschungsbedarf in Bezug auf die Aufklärung der effektverursachenden Substanzen und das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Östrogenität, Androgenität, Antiöstrogenität und Antiandrogenität.

Abschließend wird deutlich, dass trotz unterschiedlicher Test-spezifischer Verdünnungen und Empfindlichkeiten die Bewertung der Testergebnisse gleich ausfällt. Dies ist für die Wasserwirtschaft ein zentrales Projektergebnis, da bei zukünftigen Monitoringuntersuchungen die Ergebnisse unabhängig vom verwendeten Assay verglichen werden können.

2. Einleitung

Organische Spurenstoffe werden hauptsächlich durch Kläranlagen in die Umwelt entlassen. Um diesen Eintrag zu verringern, ist das Land Nordrhein-Westfalen bestrebt, neben Vermeidungsmaßnahmen an der Quelle, Spurenstoffe im Ablauf von Kläranlagen zu reduzieren. Zur Elimination von Spurenstoffen und zur Verminderung der Belastung der Gewässer durch ökologisch bedenkliche Substanzen, hat sich neben der Adsorption an Aktivkohle die Ozonung als vierte Reinigungsstufe einer Kläranlage als effektiv heraus gestellt. Allerdings kann durch diese Behandlung eine Vielzahl verschiedener Abbauprodukte (Transformationsprodukte) entstehen, über deren Art und Wirkung wenig bekannt ist (Huber et al., 2004).

Vor dem Hintergrund der Qualitätsziele, die aus der Wasserrahmenrichtlinie (EU, 2000) ableitbar sind, ist eine weitergehende Eliminierung für östrogen aktive Substanzen von Bedeutung. Natürliche Östrogene und auch Androgene gehören zur Gruppe der Hormone und können schon in sehr geringen Konzentrationen eine Wirkung in Lebewesen hervorrufen. Am Beispiel des 17 α -Ethinylestradiols (EE2; synthetisches Östrogen) konnte in Reinstwasser gezeigt werden, dass bei der Ozonung ein Substanzabbau mit der Verringerung der östrogenen Wirkung einhergeht (Huber et al., 2004, Lee et al., 2008, Richard, 2013). Dies bedeutet, dass keine östrogenaktiven Transformationsprodukte während der Ozonung gebildet werden. Eine Verringerung der endokrinen Aktivität (östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Aktivität) durch Ozonung und Aktivkohlebehandlung konnten u.a. Stalter et al. (2011) in Wasserproben auch in volltechnischen Kläranlagen nachweisen.

Bei Voruntersuchungen von Krankenhausabwässern des Marienhospitals in Gelsenkirchen durch das IUTA und das IWW (PILLS Project 2012) wurde, entgegen der Erwartung, ein Anstieg der östrogenen Aktivität nach der Ozonung beobachtet. Auch die Verwendung eines nachgeschalteten Sandfilters

konnte diesen Effekt nicht vollständig reduzieren. Ein ähnlicher Anstieg der Östrogenität konnte am Kreiskrankenhaus in Waldbröl beobachtet werden (Maletz et al., 2013; Bieling, 2011). Da eine Bildung östrogen bzw. androgen aktiver Transformationsprodukte aufgrund der oben genannten Studien unwahrscheinlich ist, könnte dieser Effekt durch eine Maskierung östrogen und androgen wirksamer Substanzen vor der Ozonung, hervorgerufen werden. Östrogene und Androgene wirken über die Bindung an den Östrogen- (ER) bzw. Androgenrezeptor (AR), welcher anschließend unterschiedliche Mechanismen in der Zelle auslöst (agonistische Wirkung), z. B. die Regulation der Genexpression eines Zielgens. Bei Substanzen, die zwar an den Rezeptor binden, ihn aber nicht aktivieren können, spricht man von Rezeptorantagonisten bzw. von antiöstrogenen und antiandrogenen Substanzen. Im Falle der höheren Aktivität nach Ozonung ist es möglich, dass durch entsprechende Rezeptorantagonisten die östrogene bzw. androgene Aktivität vor der Ozonung überdeckt wurden. Die Krebsmedikamente Tamoxifen (antiöstrogen) und Flutamid (antiandrogen) werden als antagonistische Substanzen für den Östrogen- bzw. den Androgenrezeptor eingesetzt und könnten deshalb im Krankenhausabwasser für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Hinzu kommt noch eine Vielzahl weiterer Medikamente, die ebenfalls eine antiöstrogene (Bazedoxifen, Clomifen, Fulvestrant, Raloxifen etc.) oder antiandrogene (Cyproteronacetat etc.) Wirkung besitzen.

Um diesen maskierenden Effekte zu untersuchen, wurden in dem folgenden Projekt drei verschiedene Rezeptor-Gen-Assays eingesetzt. Diese basieren auf der Bindung von Substanzen an den jeweiligen Rezeptor, welcher dadurch aktiviert (Agonist) oder blockiert (Antagonist) wird. Bindet eine Substanz an den Rezeptor und aktiviert diesen, wird ein Enzym gebildet, welches anschließend über eine chemische Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen wird. Die östrogene bzw. androgene Aktivität einer komplex zusammengesetzten Probe wird als Summenparameter bestimmt und es kann nicht zwischen Einzelsubstanzen unterschieden werden. Antagonistische Substanzen werden dabei über die Verringerung der Aktivität einer mit dem Agonisten dotierten Probe bestimmt.

3. Ziel der Untersuchung

Im Rahmen der Untersuchungen sollten mit Hilfe wirkungsbezogener Analysemethoden zytotoxische und endokrine Effekte im Krankenhausabwasser der Kläranlage am Marienhospital Gelsenkirchen untersucht werden. Für die Untersuchungen sollten zellbasierte Testsysteme (humane Zellen und Hefezellen) eingesetzt werden, die aufgrund der verschiedenen Organismen für den gleichen Endpunkt unterschiedlich sensitiv auf maskierende Effekte reagieren. Daher wurden vergleichende Messungen mit *Arxula adenivorans*, CALUX (Chemical Activated LUCiferase gene eXpression) und *Saccharomyces cerevisiae* Testsystemen durchgeführt, welche abschließend miteinander verglichen wurden. Hieraus können zusätzlich zur genauen Effektbeschreibung der einzelnen Proben am Beispiel Krankenhausabwasser auch Informationen zur Störanfälligkeit und Vergleichbarkeit der biologischen Assays für die Anwendung in hoch belasteten Abwässern erhoben werden. Zum Untersuchungsumfang gehörten sowohl die nativen Proben der verschiedenen Probenahmestellen

der Kläranlage des Marienhospitals, wie auch durch Festphasenextraktion (SPE) angereicherte Extrakte.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden zellbasierte Testsysteme eingesetzt, die den Gesamteffekt der Probe und somit einer komplexen Substanzmischung darstellen. Um die Effekte der Einzelsubstanzen zu charakterisieren, wurde ein Verfahren zur Fraktionierung der Proben entwickelt und angewandt. Es sollten hierfür Extrakte nach Festphasenanreicherung der Krankenhausabwässer mittels Flüssigkeits-chromatographie (HPLC) in Fraktionen aufgetrennt und im YES und Yeast Antiestrogen Screen (YAES), auf östrogene und antiöstrogene Wirkungen untersucht werden. Gleichmaßen wurden die androgenen und antiandrogenen Effekte im Yeast Androgen Screen (YAS) und Yeast Antiandrogen Screen (YAAS) charakterisiert. Für jede Probe sollte ein Fraktionierungsprofil der endokrinen Aktivität erstellt werden, mit dem sich agonistische Fraktionen von antagonistischen Fraktionen unterscheiden lassen. Der Vergleich dieser Profile vor und nach der Ozonung ermöglicht Rückschlüsse auf eine selektive Entfernung bestimmter endokrin aktiver Substanzen sowie auf die Entstehung potentiell aktiver Transformationsprodukte. Die Arbeitshypothese war, dass die selektive Elimination von Antiöstrogenen bei der Ozonung die Maskierung der Östrogene aufhebt und somit zu einer vermeintlich höheren östrogenen Aktivität nach der oxidativen Behandlung führt. In Kombination mit der instrumentellen Analytik (GC-MS und LC-MS/MS) wurde eine Aufklärung der verantwortlichen Substanzen angestrebt, wobei auch Verbrauchsdaten von Arzneimitteln des Marienhospitals mit einbezogen werden sollten.

Nach Aufklärung der Effekte sollte der Anlagenbetrieb dahingehend optimiert werden, dass eine Emission von (anti)androgenen und (anti)östrogenen Substanzen in das angeschlossene Gewässer verringert werden kann.

4. Anlagenbeschreibung

Die dezentrale Kläranlage Marienhospital (KA MHG) reinigt das Abwasser des Marienhospitals Gelsenkirchen. Sie wird weitestgehend regenwasserfrei mit konzentriertem Krankenhausabwasser beschickt und besteht aus einer mechanisch-biologischen Behandlungsstufe, einem Membranbioreaktor (MBR) sowie einer nachgeschalteten weitergehenden Behandlung mit Ozon und Pulveraktivkohle sowie anschließender Sandfiltration. Das behandelte Krankenhausabwasser wird anschließend direkt in den nahen Schwarzbach eingeleitet. Die KA MHG wurde im Rahmen des INTERREG IV B-Projektes PILLS (Pharmaceutical Inputs and Elimination from Local Sources) von der EMSCHERGENOSSENSCHAFT am Standort des Krankenhauses für die Behandlung der anfallenden Abwässer von rund 580 Planbetten, 1.200 Mitarbeitern und rund 75.000 Patienten pro Jahr direkt vor Ort gebaut. Sie wurde für die Behandlung von 200 m³ Krankenhausabwasser pro Tag ausgelegt.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde die Pulveraktivkohlestufe (PAK) umfahren und die in Abbildung 1 dargestellte Prozesskette betrieben (in Klammern ist die Kurzbezeichnung der Probenahmestellen aufgeführt): Feinsieb (I) → MBR (F) → Ozonung (O) → Sandfiltration (OS).

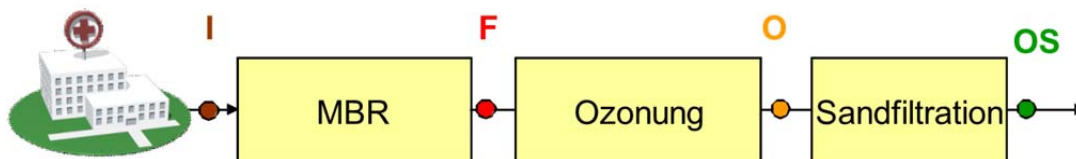


Abbildung 1: Schema der Versuchsanlage inkl. Probenahmestellen. I: Feinsieb, F: MBR, O: Ozonung, OS: Sandfiltration.

Die Probenahmen erfolgten jeweils im Ablauf der einzelnen Aufbereitungsstufen (Feinsieb, MBR, Ozonung und Sandfilter). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass auf der KA MHG seit der Inbetriebnahme im April 2011 unterschiedliche Kombinationen der weitergehenden Stufen großtechnisch betrieben wurden. Dies beinhaltete auch den Betrieb der PAK-Stufe. Für das vorliegende Forschungsvorhaben kann dies von Bedeutung sein, da die beladene PAK in die Belebungsstufe des MBR zurückgeführt wird. Die PAK wird ausschließlich über den Überschussschlammabzug aus dem System ausgeschleust. Der Einfluss der beladenen PAK-Anteile im Belebtschlamm auf die hormonellen Wirkungen der Abwasserproben dieses Forschungsvorhabens wird als gering eingeschätzt. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass insbesondere der Vergleich mit früheren Probenahmen durch die unterschiedlichen PAK-Anteile im Belebtschlamm beeinflusst wird.

Für die Untersuchung im vorliegenden Projekt wurden drei verschiedene Ozondosen eingestellt:

- Niedrige Dosis: 0,20 mg O₃/mg DOC
- Mittlere Dosis: 0,45 mg O₃/mg DOC
- Hohe Dosis: 0,70 mg O₃/mg DOC

4.1. Übersicht über die verwendeten Testverfahren

Die verwendeten Testverfahren sind alle Reporter-Gen Assays, basierend auf dem Nachweis der Bindung endokrin aktiver Substanzen an den Östrogen- bzw. Androgenrezeptor. Durch die Bindung an den jeweiligen Rezeptor wird ein Reporter-gen aktiviert, welches für die Produktion eines Enzyms verantwortlich ist. Durch Umsetzung eines Substrates durch dieses gebildete Enzym und Quantifizierung des gebildeten Produktes kann auf die Summe der endokrin aktiven Substanzen geschlossen werden. In den jeweiligen Assaysystemen wurden vier Endpunkte (Östrogenität, Androgenität, Antiöstrogenität und Antiandrogenität) betrachtet, die durch unterschiedliche Hormonrezeptoren sowie Referenzsubstanzen ermittelt werden. Eine Übersicht der verwendeten Referenzsubstanzen, der Nachweiskgrenzen (NWG) sowie der unteren und oberen Bestimmungsgrenzen (BG) sind in Tabelle 1 und

Tabelle 2 dargestellt. Die Berechnung der relativen Rezeptorinduktion bzw. –inhibition erfolgte in allen Testsystemen relativ zur Kalibration der jeweiligen Referenzsubstanz. Dabei wurde in den hefe-basierten Testsystemen die Negativkontrolle (native Proben) bzw. die Lösemittelkontrolle (Extrakte) als 0% und das Maximum der Dosis-Wirkungsbeziehung als 100% definiert. In den CALUX-Systemen war nur letzteres der Fall. Die Kalibrationskurven der einzelnen Testsysteme sind im Anhang der Langfassung dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die Eckdaten und Referenzsubstanzen der jeweiligen Testsysteme für die östrogene und androgene Wirkung einer nativen Probe.

Testsystem	Östrogene Wirkung ng/L			Androgene Wirkung ng/L		
	ER-CALUX	A-YES	YES	AR-CALUX	A-YAS	YAS
Referenzsubstanz	E2	E2	E2	DHT	DHT	T
EC ₅₀	16	21	44	870	137	1.400
NWG	2,1	3	4,5	16	25	302
BG	6,9	4,5	9,4	53	29	619

E2 = 17 β -Estradiol, DHT = Dihydrotestosteron, T = Testosteron

Tabelle 2: Übersicht über die Eckdaten und Referenzsubstanzen der jeweiligen Testsysteme für die antiöstrogene und antiandrogene Wirkung einer nativen Probe.

Testsystem	Antiöstrogene Wirkung μ g/L			Antiandrogene Wirkung ng/L		
	Anti-ER-CALUX	Anti-A-YES	YES	Anti-AR-CALUX	Anti-A-YAS	YAS
Referenzsubstanz	Tamoxifen	Hydroxy-tamoxifen	Hydroxy-tamoxifen	Flutamid	Flutamid	Flutamid
EC ₅₀	0,037	800	5.300	13,8	800	1.100
NWG	0,0011	10	400	0,028	5	740
BG	0,0037	30	keine Angabe	0,083	15	keine Angabe

4.1.1. Agonistische Effekte

Die Ergebnisse der östrogenen Aktivität zeigen in allen drei angewendeten Assay-Systemen ähnliche Ergebnisse (Abbildung 2), allerdings werden ebenso die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Assays deutlich. Aufgrund der unterschiedlichen Verdünnungen der nativen Proben durch das jeweilige Testmedium lagen die nativen Proben für die CALUX Systeme 10-fach, für die *Arxula*-Systeme 1,25-fach und für die *Saccharomyces*-Systeme 1,6-fach verdünnt vor. Dies macht zwar einen quantitativen Vergleich der nativen Proben nicht möglich, jedoch kommt man zu einer gleichen Bewertung der Proben. Die nativen Zulaufproben zeigen in allen Assays östrogene Aktivitäten, wenn sie keine Zytotoxizität bzw. Bakterienwachstum aufweisen. In allen Assays konnte durch MBR-Behandlung eine deutliche (> 90%) Abnahme der östrogenen Aktivität beobachtet werden. In den *Arxula*-Assays sowie in den *Saccharomyces*-Assays konnte anschließend keine Aktivität mehr beobachtet werden. Lediglich der ER-CALUX zeigte bei einzelnen Proben eine Restaktivität nach Ozonung.

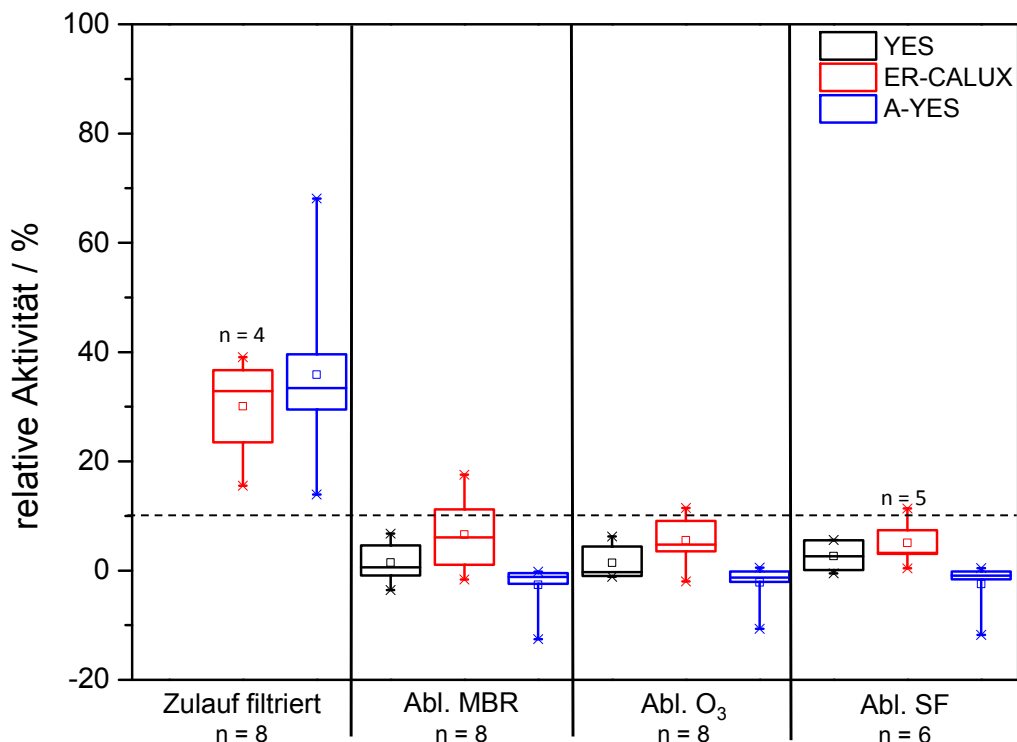


Abbildung 2: Östrogene Aktivität der nativen Abwasserproben der drei verwendeten Assays (YES, ER-CALUX, A-YES) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Verdünnungsfaktoren: YES 1,6, ER-CALUX 10, A-YES 1,25. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E₂-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Die SPE-Extrakte der Zulaufproben konnten nur in den *Arxula*-Assays ohne Matrixstörung untersucht werden. In den *Saccharomyces*-Assays konnten die Proben lediglich verdünnt gemessen werden, während in den CALUX-Assays auch die höchsten Verdünnungen (Anreicherungsfaktor von 0,2) noch toxisch auf die Zellen wirkten. In allen analysierbaren Zuläufen konnte eine östrogene Aktivität nachgewiesen werden. Die SPE-Extrakte der Proben nach den Behandlungsstufen zeigten nur in wenigen Proben eine geringe Restaktivität in den *Arxula*- und den *Saccharomyces*-Assays. Die CALUX Systeme konnten hier aufgrund ihrer höheren Empfindlichkeit in mehr Proben eine Aktivität

nachweisen. Hier wird deutlich, dass die Aktivität auch nach der Ozonung und dem Sandfilter weiter abgebaut wird.

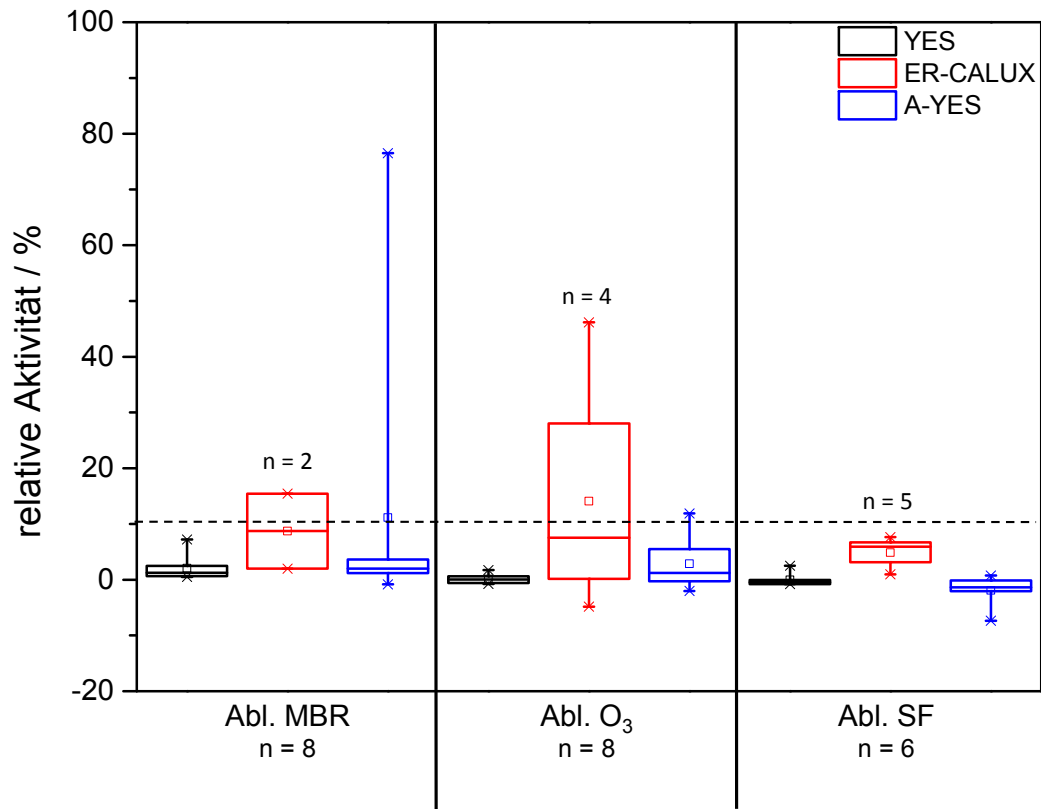


Abbildung 3: Östrogene Aktivität der extrahierten Abwasserproben (Anreicherungsfaktor 20) der drei verwendeten Assays (YES, ER-CALUX, A-YES) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. . Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E2-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Auch die androgene Aktivität zeigt vergleichbare Ergebnisse in allen drei Testsystemen. In den Zulaufproben wurde mit allen Assays eine androgene Aktivität nachgewiesen, wobei die höchsten Aktivitäten im A-YAS gemessen werden konnten. Ebenso wie bei der östrogenen Aktivität können auch hier zytotoxische Effekte auf die AR-Zellen, sowie ein erhöhtes Bakterienwachstum im YAS beobachtet werden. In den Abläufen der einzelnen Behandlungsstufen zeigte sich mit dem YAS und dem A-YAS keine Aktivität, wobei der sensitivere AR-CALUX in einigen Proben eine geringe Restaktivität feststellen konnte. Allerdings lagen diese unter 10% Aktivität, was im AR-CALUX als nicht aktiv eingestuft wird.

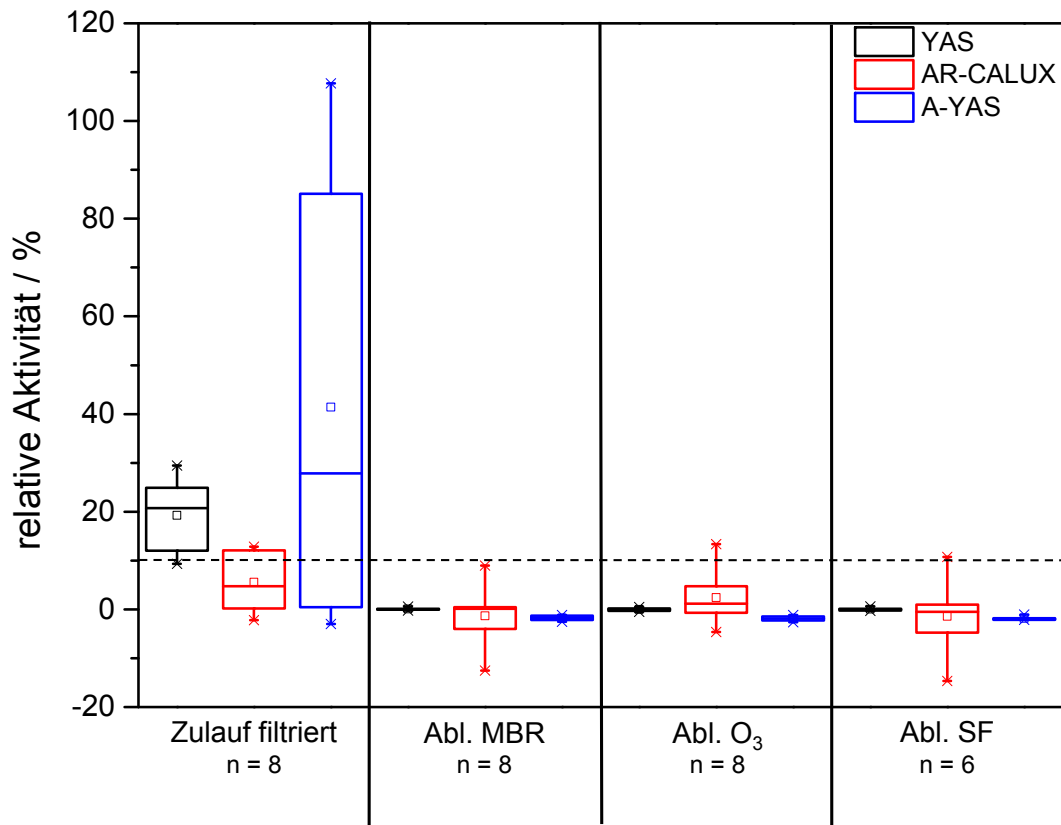


Abbildung 4: Androgene Aktivität der nativen Abwasserproben der drei verwendeten Assays (YAS, AR-CALUX, A-YAS) aller Probenahmen (n=8). Verdünnungsfaktoren: YES 1,6, ER-CALUX 10, A-YES 1,25. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen DHT-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Auch bei der Bestimmung der androgenen Aktivität konnten die SPE-Extrakte der Zulaufproben nur in den *Arxula*-Assays ohne Matrixeffekte untersucht werden und sind deshalb in Abbildung 5 nicht gezeigt. In den *Saccharomyces*-Assays wurden die Proben lediglich mit einer 10-fachen Anreicherung gemessen, während in den CALUX-Assays bis zu einem Anreicherungsfaktor von 0,2 verdünnt werden musste. Somit konnte weder in den nativen noch in den angereicherten Abwasserproben eine androgene Aktivität in den Abläufen der einzelnen Behandlungsstufen mit keinem der angewendeten Assays nachgewiesen werden.

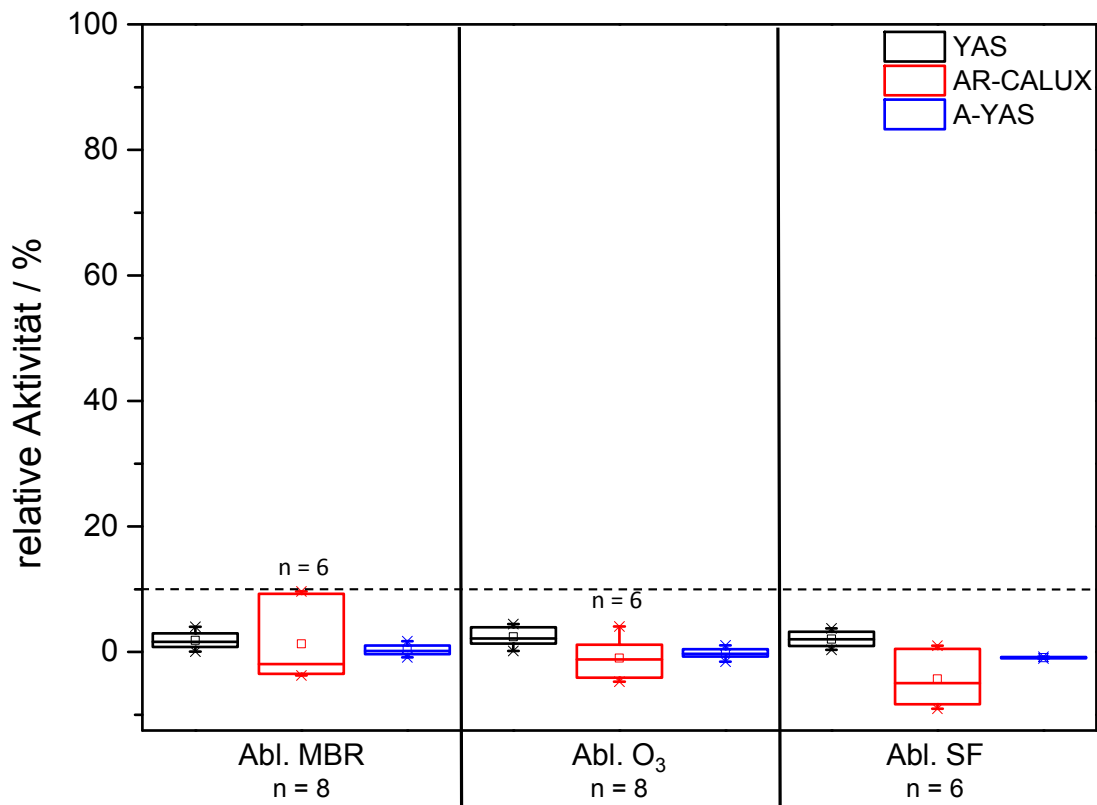


Abbildung 5: Androgene Aktivität der extrahierten Abwasserproben (Anreicherungsfaktor 20) der drei verwendeten Assays (YAS, AR-CALUX, A-YAS) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen DHT-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Abschließend wird deutlich, dass trotz unterschiedlicher Test-spezifischer Verdünnungen und Empfindlichkeiten die eigentliche Bewertung der Testergebnisse gleich ausfällt. Dies ist für die Wasserwirtschaft ein zentrales Projektergebnis, da bei zukünftigen Monitoringuntersuchungen die Ergebnisse unabhängig vom verwendeten Assay verglichen werden können.

4.1.2. Antagonistischen Aktivität

Bei dem Vergleich der Ergebnisse zur antagonistischen Aktivität sind ebenfalls die unterschiedlichen Verdünnungen der Proben durch das jeweilige Testmedium zu beachten. Die nativen Proben lagen somit für die CALUX Systeme 10-fach, für die *Arxula*-Systeme 1,25-fach und für die *Saccharomyces*-Systeme 1,6-fach verdünnt vor. Der Vergleich der drei verwendeten Assay-Systeme zeigt eine Abnahme der antiöstrogenen Aktivität in den nativen Abwasserproben im Anti-ER-CALUX, wobei der Hauptteil der Aktivität im Membranbioreaktor abgebaut wird (Abbildung 6). Jedoch verbleibt eine Restaktivität auch nach der finalen Behandlungsstufe der Sandfiltration. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Assay-Systemen. Während die Ergebnisse im Anti-ER-CALUX und im Anti-A-YES stark zwischen den unterschiedlichen Probenahmen streuen, ist dies beim YAES nicht der Fall. Außerdem liegen die Ergebnisse des Anti-A-YES im Mittel höher als im YAES und die des Anti-ER-CALUX niedriger. Da sich die relative Aktivität der Proben nicht aus der Potenz einer Substanz sondern aus deren max. Aktivität ergibt, ist dieser Effekt nicht auf die

unterschiedlichen Referenzsubstanzen zurückführen. Es lässt eher auf unterschiedliche Empfindlichkeiten der einzelnen Assays und Unterschiede bei der Probenverdünnung schließen.

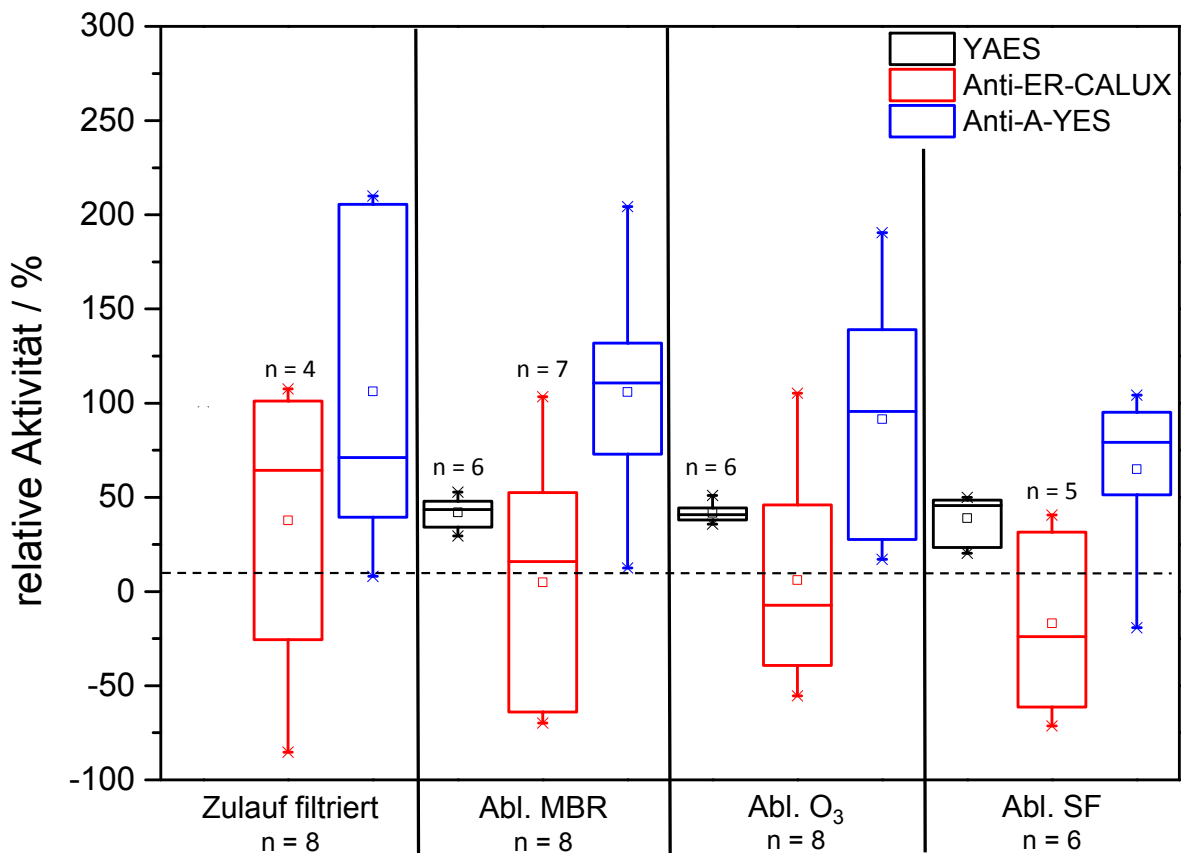


Abbildung 6: Antiöstrogene Aktivität der nativen Abwasserproben der drei verwendeten Assays (YAES, Anti-ER-CALUX, Anti-A-YES) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Verdünnungsfaktoren: YES 1,6, ER-CALUX 10, A-YES 1,25. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E2-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Die Messungen der SPE-Extrakte zeigen ein ähnliches inhomogenes Bild wie bei den nativen Abwasserproben, zwischen den Ergebnissen der einzelnen Assays (Abbildung 7). Aufgrund der zytotoxischen Effekte der Zulaufproben sind diese hier nicht gezeigt. Auch hier sind die gemessenen Aktivitäten im Mittel im Anti-A-YES am höchsten und im YAES am niedrigsten. Wie auch bei den nativen Abwasserproben zeigt sich in den Abläufen der Behandlungsstufen keine weitere Reduktion der Aktivität und es verbleibt eine antiöstrogene Restaktivität im Ablauf des Sandfilters.

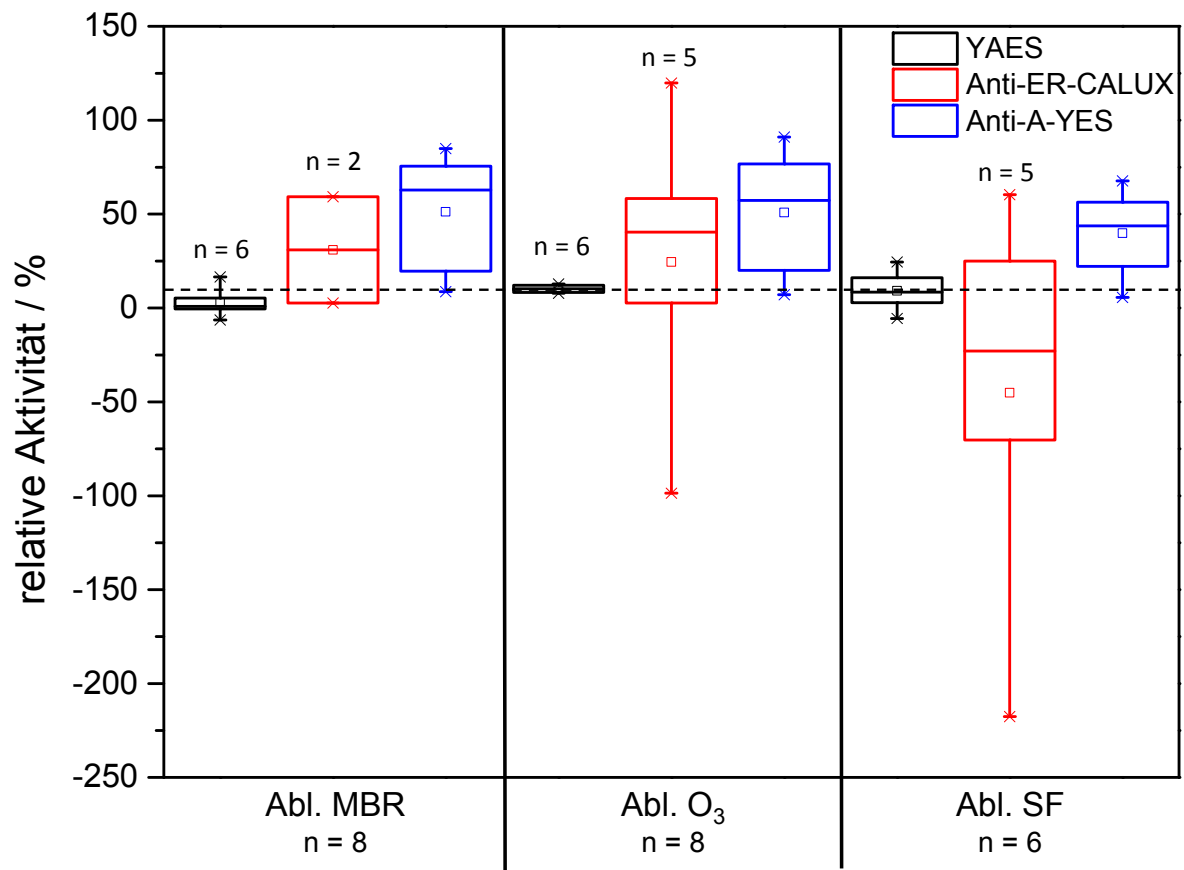


Abbildung 7: Antiöstrogene Aktivität der extrahierten Abwasserproben (Anreicherungsfaktor 20) der drei verwendeten Assays (YAES, Anti-ER-CALUX, Anti-A-YES) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E₂-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Die Ergebnisse der antiandrogenen Aktivität der nativen Abwasserproben sind vergleichbar mit denen der antiöstrogenen Aktivität. Hier zeigt der YAAS die niedrigsten Aktivitäten und der Anti-A-YAS die höchsten. Während im Anti-A-YAS eine Verringerung der antiandrogenen Aktivität im MBR zu beobachten ist, zeigen der YAAS und der Anti-AR-CALUX keine Effekte. Lediglich nach Sandfiltration zeigt der Anti-AR-CALUX eine Erhöhung der Aktivität. Wie auch bei der antiöstrogenen Aktivität ist auch im Ablauf des Sandfilters eine Restaktivität mit dem Anti-AR-CALUX und dem Anti-A-YAS nachweisbar.

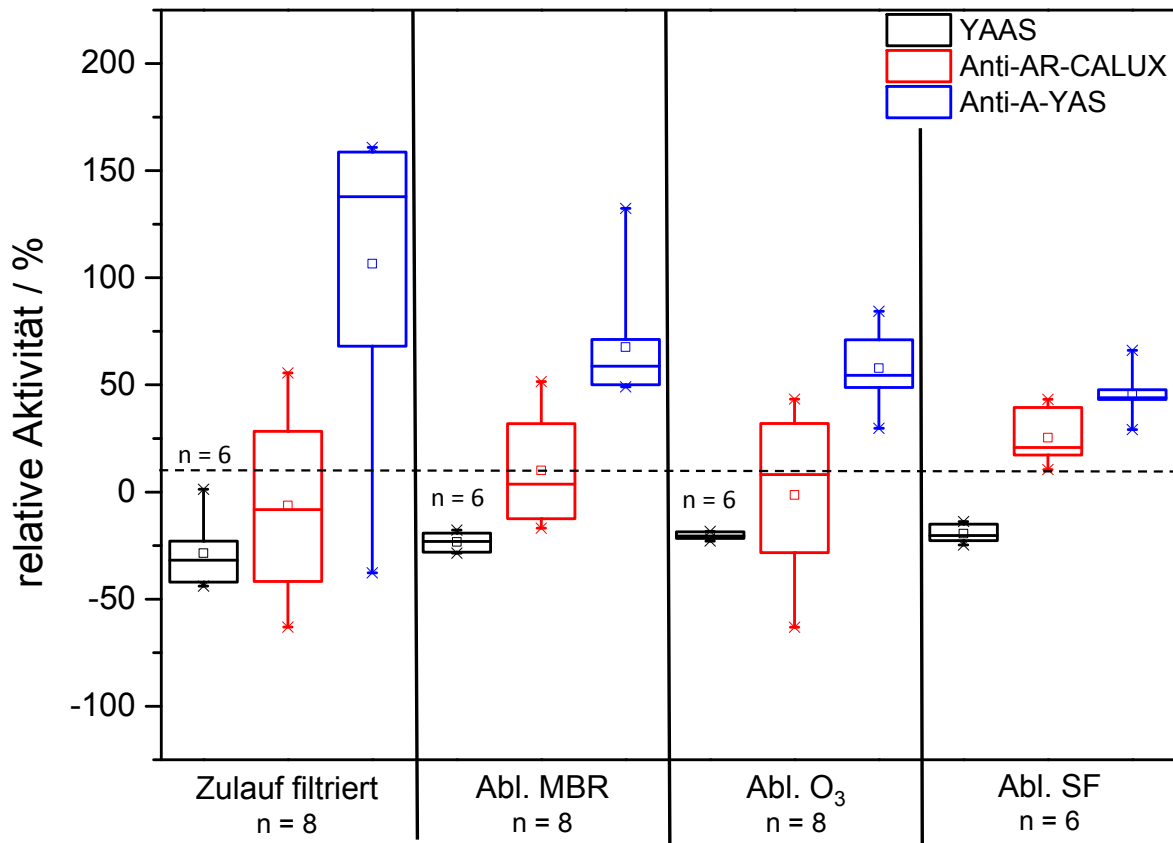


Abbildung 8: Antiandrogene Aktivität der nativen Abwasserproben der drei verwendeten Assays (YAAS, Anti-AR-CALUX, Anti-A-YAS) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Verdünnungsfaktoren: YES 1,6, ER-CALUX 10, A-YES 1,25. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E₂-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Die Antiandrogenität der SPE-Extrakte zeigt, wie schon bei der antiöstrogenen Aktivität beobachtet, keine Verringerung der Aktivität während der einzelnen Behandlungsstufen. Aufgrund der zytotoxischen Effekte der Zulaufproben mit einem Anreicherungsfaktor von 20 sind diese hier nicht aufgeführt, weshalb eine Beurteilung des MBR nicht möglich ist. Wie auch bei der antiöstrogenen Aktivität ist auch hier eine Restaktivität im Ablauf des Sandfilters zu beobachten.

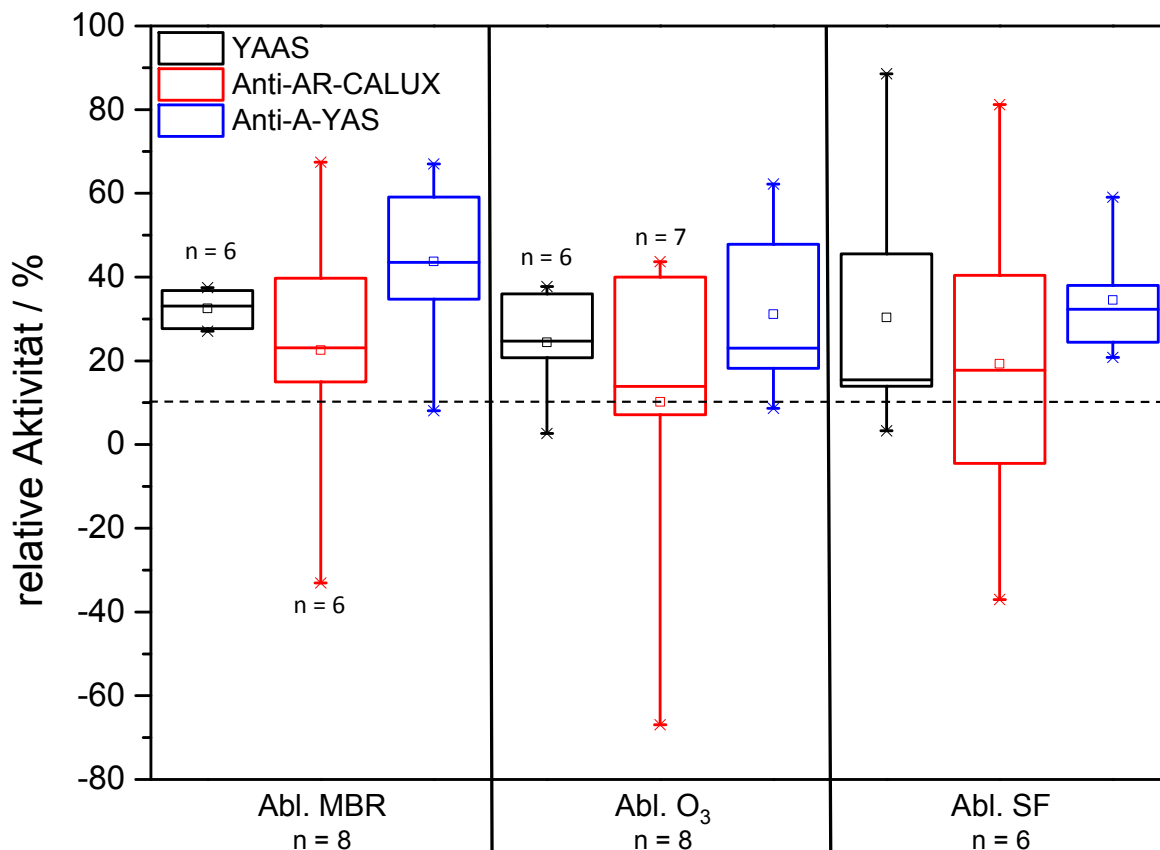


Abbildung 9: Antiandrogene Aktivität der extrahierten Abwasserproben (Anreicherungsfaktor 20) der drei verwendeten Assays (YAAS, Anti-AR-CALUX, Anti-A-YAS) aller Probenahmen (n=8). Angaben in der Grafik beschreiben Boxplots mit geringerer Datenanzahl. Gestrichelte Linie: 10% der maximalen E₂-Konzentration. x markiert das Minimum und das Maximum, □ entsprechen dem Mittelwert.

Die Ergebnisse der antiöstrogenen und antiandrogenen Aktivität zeigen, dass der Hauptteil der Elimination im Membranbioreaktor stattfindet. Durch die Ozonung und die Sandfiltration wird die Aktivität nur geringfügig weiter reduziert. Im Vergleich zur östrogenen und androgenen Aktivität ist auch im Ablauf des Sandfilters eine antiöstrogene und antiandrogene Aktivität nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchung von antagonistischen Effekten während der Abwasserbehandlung intensiviert werden muss.

4.2. Fraktionierung und instrumentelle Analytik

Um herauszufinden, ob die in den Nachbehandlungen detektierte antagonistische Aktivität bereits im Zulauf vorhanden ist oder erst während der Nachbehandlung entsteht (aktive Transformationsprodukte), wurden ausgewählte Proben fraktioniert.

Die Untersuchung der Fraktionen im YES zeigt, dass in der Zulaufprobe drei östrogenaktive Substanzen vorhanden sind. Aufgrund der Retentionszeiten könnte diese Aktivität durch die Steroide Estron, Estriol und Estradiol verursacht werden. In der Sandfilterprobe sind keine östrogen aktiven Fraktionen nachweisbar. Das belegt, dass die im Zufluss der Anlage detektierten Substanzen effektiv

entfernt werden. Im YAS können drei androgen wirksame Substanzen im Zufluss nachgewiesen werden, die sich von den Retentionszeiten der Östrogene unterscheiden. Auch diese Substanzen sind nach Sandfiltration nicht mehr nachweisbar. Die Untersuchung auf antiandrogene Aktivität im YAAS bestätigt das Vorhandensein der drei androgen wirksamen Substanzen im YAS. Antiandrogene Fraktionen können nicht eindeutig nachgewiesen werden. In der Sandfilterprobe, die als unfraktionierte Probe eine hohe antiandrogene Aktivität aufwies, können keine aktiven Fraktionen nachgewiesen werden.

Ergänzend zur wirkungsbezogenen Analytik wurden die Proben mittels GC-MS und LC-MS/MS untersucht. Im Gegensatz zur summarischen Bestimmung der endokrinen Aktivität durch die Assays werden bei der instrumentellen Analytik bekannte Substanzen und deren Konzentrationen nachgewiesen. Eine Aussage über die Wirkung dieser Substanzen in der Probe ist dabei nicht möglich. Insgesamt wurden in der eingesetzten LC-MS/MS sechs Östrogene (Estron, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, Estriol, Diethylstilbestrol und Tamoxifen) und neun Androgene (Trenbolon, Boldion, Boldenon, Nandrolon, Testosteron, Dihydrotestosteron, Etiocholanon, Flutamid und Androsteron) analysiert. Außerdem erfolgte die Analyse von fünf Östrogenen (Estron, 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol und Estriol) mittels GC-MS. In den sechs untersuchten Probenahmen konnten fünf Androgene (Boldion, Boldenon, Testosteron, DHT, Androsteron) und zwei Östrogene (EE2, Estron) durch LC-MS/MS nachgewiesen werden. Wie zu erwarten, konnten die höchsten Konzentrationen und die meisten Substanzen in den Zulaufproben detektiert werden und bis auf Boldion, Testosteron und DHT, werden diese schon im MBR bis unterhalb der Nachweisgrenze der Methode abgebaut. Durch die GC-MS Analyse konnte lediglich Estron in den Zulaufproben der Probenahme vier (36 ng/L) und fünf (3,7 ng/L) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar zu denen der Bioassays, in denen ebenso die höchsten Konzentrationen in den Zulaufproben detektiert wurden und der Abbau hauptsächlich im MBR erfolgte. Antiöstrogene bzw. Antiandrogene Substanzen wie Tamoxifen oder Flutamid konnten nicht nachgewiesen werden. Da in den Assays jedoch hohe antagonistische Wirkungen beobachtet werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass hier andere Substanzen für diese Wirkung verantwortlich sind.

4.3. Vergleich der verwendeten Assays

Neben der Bestimmung der antagonistischen Wirkung von Krankenhausabwasser war ein weiteres Ziel dieses Projektes, die Vergleichbarkeit der Bioassays zu überprüfen und aus deren Stärken und Schwächen eine Empfehlung für die Anwendung zur Analyse von Abwässern zu geben. Obwohl alle eingesetzten Assays auf dem gleichen Nachweisprinzip beruhen und denselben Östrogen- bzw. Androgenrezeptor nutzen, werden jeweils unterschiedliche Zellen, teilweise unterschiedliche Referenzsubstanzen und unterschiedliche Medien eingesetzt. Aus diesem Grund sind Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit und der Reaktion auf toxische Effekte der Matrix zu erwarten.

Bei der Beurteilung der Nachweisempfindlichkeit weisen die CALUX-Systeme jeweils die niedrigste und die *Saccharomyces*-Assays die höchste Nachweisgrenze auf, während die Nachweisgrenze in den *Arxula*-Assays dazwischen liegt. Dabei sind die unterschiedlichen Referenzsubstanzen, sowie die Unterschiede in der Berechnung der jeweiligen Parameter (z.B. bei der Bestimmungsgrenze) zu beachten, die einen Vergleich erschweren.

Neben der Nachweisempfindlichkeit sind Matrixeffekte ein weiteres Bewertungskriterium, wobei das Hauptaugenmerk auf den zytotoxischen Effekten liegt. Tabelle 3 zeigt mit welchem Anreicherungsfaktor die jeweilige Probe aus den Probenahmen ohne zytotoxische Effekte analysiert werden konnte. Die nativen Proben zeigten nur auf die T47D-Zellen, die im (anti)-ER-CALUX verwendet werden, in vier von acht Zulaufproben zytotoxische Effekte. Ansonsten hatten die nativen Proben in den Tests keine zytotoxische Wirkung. Die Extrakte der Behandlungstufen zeigten in der Regel keine toxischen Effekte in den Assays. Lediglich für die Anwendung in den CALUX-Testsystemen mussten einige Extrakte weiter verdünnt werden, um die Zellen nicht zu schädigen.

Für die Untersuchungen kommen hauptsächlich zellbasierte Testsysteme sowohl mit humanen Zelllinien als auch Hefezellen zum Einsatz. Aufgrund der verschiedenen Zelllinien und der damit einhergehenden Zellmorphologie zeigen die einzelnen Testsysteme unterschiedliche Sensitivität für den gleichen Endpunkt.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Detektionslimit im ER-CALUX um den Faktor 10 niedriger ist als im YES (Kinnberg 2003; Campbell et al. 2006; Houtman et al. 2006; Leusch et al. 2010; Maletz et al. 2013; Mertl et al. 2014).

Dies zeigt die Robustheit (hinsichtlich Zytotoxizität) der eingesetzten Zellsysteme gegenüber der untersuchten Abwassermatrices und zeigt auch, für welchen Probentyp die hier durchgeführten Assays am besten geeignet sind. Während die untersuchten Proben im A-YES und A-YAS am wenigsten zytotoxisch waren, zeigten insbesondere die Extrakte der Zulaufproben im ER-CALUX so starke zytotoxische Effekte, dass diese Proben teilweise nicht weiter analysiert werden konnte. Auffällig ist, dass die Zelllinie des AR-CALUX weniger empfindlich auch zytotoxische Effekte reagiert als die T47D Zellen. Beim YES und beim YAS sind weniger extrahierte Zuläufe zytotoxisch und es konnten alle mit dem Faktor 2 analysiert werden.

Tabelle 3: Effekte der untersuchten Abwässer auf die einzelnen Assays mit Angabe der Faktoren nach SPE.

	Anzahl der toxischen Proben			
	Zulauf	MBR	Ozonung	Sandfiltration
A-YES und A-YAS - Original	0/8	0/8	0/8	0/6
A-YES und A-YAS - Extrakt	F20: 0/8*	F20: 0/8	F20: 0/8	F20: 0/6
YES und YAS - Original	0/8	0/8	0/8	0/6
YES und YAS - Extrakt	F20: 7/8 F10: 5/8 F2: 0/8	F20: 0/8	F20: 0/8	F20: 0/6
ER-CALUX - Original (1:10)	4/8	0/8	0/8	0/6
ER-CALUX - Extrakt	F20: 8/8 F2: 8/8 F0,2: 5/7	F20: 6/8 F2: 1/8 F0,2: 0/8	F20: 4/8 F2: 0/8 F0,2: 0/8	F20: 1/6 F2: 0/6 F0,2: 0/6
AR-CALUX - Original	0/8	0/8	0/8	0/8
AR-CALUX - Extrakt	F20: 8/8 F2: 8/8 F0,2: 6/8	F20: 2/8 F2: 0/8 F0,2: 0/8	F20: 2/8 F2: 0/8 F0,2: 0/8	F20: 0/6 F2: 0/6 F0,2: 0/6

* Überschreitung des Messbereiches bei Faktor 20

5. Relevanz der erzielten Ergebnisse für die Wasserwirtschaft

Beim Betrieb der Ozonung am Marienhospital Gelsenkirchen lässt sich eine deutliche Reduktion der östrogenen und androgenen Wirkungen des Krankenhausabwassers erzielen. Eine höhere Ozon-Dosis führt nicht zur Änderung der Bewertung in Hinblick auf die endokrine Aktivität, so dass 0,2 mg O₃/mg DOC als Standardeinstellung verwendet werden sollten.

Die Bildung östrogenen Aktivität durch die Ozonung von mechanisch-biologisch gereinigtem Krankenhausabwasser zeigte sich lediglich in der PN8 beim ER-CALUX und konnte mit den anderen Assays nicht bestätigt werden. Die größte Reinigungsleistung konnte im MBR beobachtet werden. Eine Erklärung könnte das hohe Schlammalter oder der in diesen Untersuchungen vorliegenden hohen Anteil an Pulveraktivkohle (PAK) im MBR darstellen. Die Absorption von endokrin aktiven Substanzen an PAK und somit eine erhöhte Elimination wurde in Untersuchungen von Stalter et al. (2011) in Abwässern festgestellt. Ob diese Ergebnisse auf die hier vorliegende Situation übertragen werden können, kann allerdings nicht abschließend festgestellt werden. Die sehr geringe endokrine Aktivität im Ablauf des MBR am Marienhospital Gelsenkirchen führte jedoch zu dem Ergebnis, dass die in den folgenden Behandlungsstufen (O₃ und Sandfiltration) stattfindende weitere Reduktion nicht quantifiziert werden konnte. Auch die in den CALUX und *Arxula*-Systemen beobachteten antagonistischen Effekte wurden zum Teil im MBR abgebaut. Durch Ozonung und Sandfiltration konnte keine Verringerung beobachtet werden. Jedoch zeigten die *Saccharomyces*-Systeme einen Anstieg der Aktivität nach MBR/Ozonung. Der Einsatz von unterschiedlichen Ozondosen zeigt, dass schon bei geringen Konzentrationen ($z_{\text{spez}} = 0,2 \text{ mg O}_3 / \text{mg DOC}$) ein Abbau östrogenen und androgenen Substanzen stattfindet und dass dieser durch den Einsatz einer höheren Ozonkonzentration nicht verbessert werden kann. Für die antiöstrogene und antiandrogene Aktivität kann nur ein geringer Abbau beobachtet werden, der aber ebenfalls unabhängig von der eingesetzten Ozondosis war.

Eine Nachbehandlung der ozonierten Abwässer, wie durch den hier eingesetzten kontinuierlich rückgespülten Sandfilter, zeigte bei diesen Untersuchungen keine weitere Verbesserung der agonistischen- und antagonistischen Aktivitäten. Für die hier untersuchten endokrinen Wirkungen kann somit auf eine Nachbehandlung des ozonisierten Abwassers verzichtet werden. Die am Marienhospital Gelsenkirchen eingesetzte Technologie zur weitergehenden Mikroschadstoff-elimination (Ablaufozonung mit Nachbehandlung im Sandfilter) sowie die Betriebseinstellungen sind mit denen beim Einsatz als weitergehende Abwasserreinigung auf kommunalen Kläranlagen vergleichbar. Demzufolge werden auch bei der Ozonung von kommunalen Abwässern vergleichbare Ergebnisse erwartet.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Bewertung der endokrinen Wirkungen, die nach der biologischen Behandlung im MBR nachgewiesen wurden. Dies betrifft insbesondere die antiöstrogenen und antiandrogenen Effekte, deren ökotoxikologische Bewertung aufgrund des derzeit begrenzten Erkenntnisstandes schwierig ist. Da diese Effekte nicht durch die Nachbehandlung reduziert werden können, erscheint für den Anwendungsfall der Ablaufozonung eine effizientere

Nachbehandlung von großer Bedeutung zu sein. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass auch die häufig eingesetzte Option der Sandfiltration zumindest für die hier untersuchten endokrinen Wirkungen keine vollständige Barriere darstellt.

6. Fazit und Ausblick

Die zu Beginn dieses Projektes aufgestellte Arbeitshypothese konnte in diesem Projekt weiter untermauert werden. Auch wenn eine Erhöhung der östrogenen Aktivität nach Ozonung in keiner der untersuchten Probenahmen auftrat, zeigen die beobachteten antagonistischen Aktivitäten die Relevanz dieser Substanzklasse in der Kläranlage. Durch das hohe Vorkommen ist auch eine Maskierung der östrogenen bzw. androgenen Aktivität wahrscheinlich.

Die untersuchten Abwasserproben zeigten in allen Assays eine hohe antiöstrogene und antiandrogene Aktivität, die zwar im MBR um durchschnittlich 50% reduziert wurde, aber trotz folgender Behandlung (O_3 und Sandfilter) nicht weiter abgebaut werden konnte. Jobling et al. (2009) zeigte, dass antiandrogene Aktivität in fast allen untersuchten Flüssen in Großbritannien vorkommen und dass die Feminisierung der Fische nicht nur durch Östrogene, sondern durch eine Kombination von Östrogenen und Antiandrogenen oder nur durch Antiandrogene hervorgerufen werden. Zusammen mit den hier erzielten Ergebnissen wird deutlich, dass insbesondere im Bereich der antagonistischen Wirkung und der Summenwirkung von endokrin aktiven Substanzen und deren Abbau in Kläranlagen weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf besteht.

Die unterschiedlichen eingesetzten Ozondosen zeigen, dass für die Verringerung der agonistisch aktiven Substanzen, schon die niedrigste eingesetzte Ozondosis ($z_{spez} = 0,2$) ausreichend ist. Die antagonistischen Effekte konnten allerdings auch mit der höchsten eingesetzten Ozondosis ($z_{spez} = 0,7$) nicht weiter reduziert werden. Daher wird eine niedrige bis mittlere Ozondosis zur Reduktion von Mikroschadstoffen und agonistischen Substanzen empfohlen.

Vor dem Hintergrund der EU Wasserrahmenrichtlinie (2013/39/EU) und der im Zuge dessen aufgestellten Beobachtungsliste („watch-list“), die auch die drei Östrogene Estron (E1), 17β -Estradiol (E2) und 17α Ethinylestradiol (EE2) beinhaltet (2015/495/EU), ist auch die Frage der Anwendbarkeit der hier verwendeten Assays von Bedeutung. Neben der in diesem Projekt angewendeten Auswertung der relativen Aktivität zur Bewertung der einzelnen Behandlungsstufen ist es auch möglich, die gemessenen Ergebnisse auf die Äquivalentkonzentration der Referenzsubstanz zu beziehen und somit eine Konzentration in ng EEQ/L (EEQ = 17β -Estradiol Äquivalente) anzugeben.

Im Gegensatz zur derzeit noch nicht ausreichend empfindlichen chemischen Analytik ist es durch den Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik möglich, eine Einhaltung der vorgeschlagenen Umweltqualitätsnorm (UQN) von Kläranlagenabläufen oder Oberflächengewässern mit den hier eingesetzten Testsystemen zu überprüfen.

Aufgrund der sehr geringen Bestimmungsgrenzen, die für diese Überprüfung notwendig sind (E1 und E2: 0,40 ng/L; EE2: 0,035 ng/L), müssen die Proben vor der Analyse angereichert werden. Abgeleitet von den in Tabelle 1 und

Tabelle 2 dargestellten unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Assays und den geforderten Bestimmungsgrenzen (2015/495/EU) sind Anreicherungsfaktoren von mind. 270, 200 und 130 für den YES, den ER-CALUX und den A-YES notwendig. Im Vergleich mit der instrumentellen Analytik mit Anreicherungsfaktoren von 1.000 bis 10.000 sind die Faktoren für die genannten Assays gering, wodurch auch mit geringeren Matrixeffekten zu rechnen ist. Zur Überwachung der für EE2 vorgeschlagenen Umweltqualitätsnorm nach einer vierten Reinigungsstufe oder in Oberflächengewässern wird daher ein Probenvolumen von 200 bis 500 mL benötigt.

Offen ist allerdings die Frage, wie Ergebnisse der summarisch bestimmten östrogenen Aktivität zwischen 0,035 und 0,40 ng EEQ/L bewertet werden, da hier nicht unterschieden werden kann, ob der Messwert von einer Überschreitung der vorgeschlagenen UQN von EE2 oder dem Vorhandensein anderer östrogen aktiver Substanzen (z. B. 17 β -Estradiol) herrührt. Diese Frage könnte durch eine anschließende instrumentelle Analytik auf die regulierten Substanzen (E1, E2 und EE2) aufgeklärt werden. Diese Frage wurde in der Schweiz bereits beantwortet (Kienle et al., 2015), wobei 0,4 ng EEQ/L als so genannter „Trigger-Value“ festgelegt wurde. Gewässer unterhalb dieses Wertes werden als „sehr gut bis gut“ bewertet und die Zielvorgabe ist eingehalten. Im Hinblick auf die UQN von 0,035 ng/L für EE2 sollte das Ziel für Oberflächengewässer bei 0,035 ng EEQ/L liegen.