

ÖKOTOXIKOLOGISCHE BIOTESTS

ANWENDUNG VON BIOTESTS ZUR EVALUATION DER WIRKUNG UND ELIMINATION VON MIKROVERUNREINIGUNGEN

Toxizitätstests auf der Basis von Zellkulturen oder Organismen eignen sich, um die Reinigungsleistung einer Kläranlage in Bezug auf Mikroverunreinigungen zu überprüfen. Damit lassen sich im Routineinsatz nicht nur Einzelstoffe, sondern auch Gemische ökotoxikologisch beurteilen, wie im Rahmen des Projektes «Strategie Micropoll» des Bundesamtes für Umwelt gezeigt werden konnte.

Cornelia Kienle, Oekotoxzentrum Eawag-EPFL*

Robert Kase, Oekotoxzentrum Eawag-EPFL

Michael Schärer, Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abteilung Wasser, Sektion Gewässerschutz

Inge Werner, Oekotoxzentrum Eawag-EPFL

RÉSUMÉ

DES ESSAIS BIOLOGIQUES ÉCOTOXICOLOGIQUES VÉRIFIENT L'ÉLIMINATION DE MICROPOLLUANTS

Les essais biologiques écotoxicologiques sont des méthodes analytiques utilisant des cellules vivantes, des organismes ou des collectivités pour mesurer leur réaction à des substances nocives. Ainsi, les effets toxiques des substances individuelles ou encore des mélanges entiers de substances peuvent être évalués ensemble. Des essais biologiques avec des organismes tels que des puces d'eau, des vers luisants ou des poissons enregistrent l'effet de toutes les substances dans un échantillon d'eau où ces organismes réagissent de manière sensible. Avec un seul essai biologique spécifique, on peut tester l'effet combiné de toutes les substances individuelles existantes avec le même mécanisme d'action. C'est particulièrement avantageux lorsque les substances sont difficiles à détecter chimiquement et analytiquement, comme p. ex. des substances œstrogènes actives. L'utilisation d'essais biologiques peut être un complément utile à l'analyse de micropolluants classique pour mesurer par ex. l'élimination de substances nocives dans les processus de traitement des eaux usées existants ou de nouvelles méthodes. Ainsi, il est possible de vérifier si les impacts associés sur les organismes aquatiques peuvent aussi être réduits en plus de la concentration des micropolluants. Dans le cadre du projet «Stratégie MicroPol» de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV), de nombreux systèmes

AUSGANGSLAGE

Mikroverunreinigungen sind organische Spurenstoffe, die unter anderem in Medikamenten, Pflanzenschutzmitteln, Bioziden, Haushalts- und Körperpflegeprodukten vorkommen. Sie können über das Abwasser in Oberflächengewässer gelangen, da während der biologischen Abwasserbehandlung eine beträchtliche Anzahl von Mikroverunreinigungen nicht oder nur unvollständig entfernt wird [1, 2]. Diese Stoffe lassen sich im gereinigten Abwasser in Konzentrationen nachweisen, die zwar gering sind, aber dennoch Effekte auf Gewässerorganismen haben können. Beispielsweise können Mikroverunreinigungen mit herbizider Wirkung die Fotosynthese und das Wachstum von Algen oder Wasserpflanzen beeinträchtigen. Auch eine Schädigung des Nervensystems von Wassertieren durch Insektizide ist möglich, ebenso wie eine Beeinträchtigung der Fortpflanzung von Fischen und anderen Wasserlebewesen durch hormonaktive Stoffe [3]. Durch zusätzliche Reinigungsstufen in der Kläranlage kann ein breites Spektrum an Substanzen aus dem Abwasser eliminiert werden. So lässt sich der Eintrag der meisten Mikroverunreinigungen in die Gewässer deutlich reduzieren. Von der Vielzahl verfügbarer Abwasserreinigungsverfahren (s. Überblick in [3]) sind die derzeit geeignetsten Methoden eine

* Kontakt: cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch

Ozonung mit Nachschaltung einer Stufe mit biologischer Aktivität (z.B. ein Sandfilter) zwecks Entfernung von biologisch abbaubaren Umwandlungsprodukten oder eine Behandlung mit Pulveraktivkohle (PAK) mit nachgeschaltetem Filter zur weitgehenden Entfernung der PAK.

ÖKOTOXIKOLOGISCHE BIOTESTS

Neben einer chemisch-analytischen Bestimmung der Spurenstoffe kann die Leistungsfähigkeit von weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren zur Elimination von Mikroverunreinigungen auch mit ökotoxikologischen Biotests überprüft werden. Darunter versteht man Analysemethoden, die lebende Zellen, Organismen oder Gemeinschaften in definierter Art und Anzahl einsetzen, um deren Reaktion auf eine Exposition mit Schadstoffen zu messen. Mit Biotests können Effekte auf verschiedenen biologischen Organisationsebenen untersucht werden: von der Molekül- und Zellebene, über Gewebe und Organe bis hin zu Individuen, Populationen und Lebensgemeinschaften. Im Gegensatz zur chemischen Analytik, bei der die Konzentrationen einzelner Stoffe ermittelt werden, können mit Biotests die Auswirkungen von Stoffmischungen untersucht werden. Je nach Empfindlichkeit des eingesetzten Testorganismus reagieren Biotests dabei unterschiedlich gut auf verschiedene Stoffgemische. Zur Untersuchung weitergehender Abwasserreinigungsverfahren müssen sie daher ökotoxikologische Belastungen durch geringe Schadstoffkonzentrationen möglichst empfindlich und robust anzeigen können. Hierfür kann eine Aufkonzentrierung der Proben, wie sie routinemässig für die chemische Analytik eingesetzt wird, notwendig sein.

DREI KATEGORIEN

Je nach dem Ziel einer Untersuchung können die Biotests entweder im Labor unter standardisierten Bedingungen (*in vitro*, *in vivo*) oder im Feld (*in situ*) durchgeführt werden, wenn der Fokus auf der ökologischen Relevanz liegt [4]. Grundsätzlich wird zwischen den folgenden drei Biotestkategorien unterschieden:

In vitro-Biotests

Diese verwenden Zellkulturen oder Einzeller und werden in einer kontrollierten Umgebung durchgeführt. Sie eignen sich besonders für den Nachweis von spezifischen zellulären Mechanismen und können die Wirkungen von Substanzklassen mit gleichem Wirkmechanismus wie zum Beispiel östrogenwirksame oder fotosynthesehemmende Stoffe (u.a. bestimmte Herbizide) in relativ kurzer Zeit (nach Stunden bis wenigen Tagen) sehr empfindlich nachweisen. Um dies zu erreichen, müssen sie oft mit einer Probenaufkonzentrierung kombiniert werden. Allerdings können diese Tests nur begrenzt aufzeigen, wie Substanzen auf ganze Organismen wirken. In Box 1 ist ein Beispiel für einen solchen *in vitro*-Biotest dargestellt.

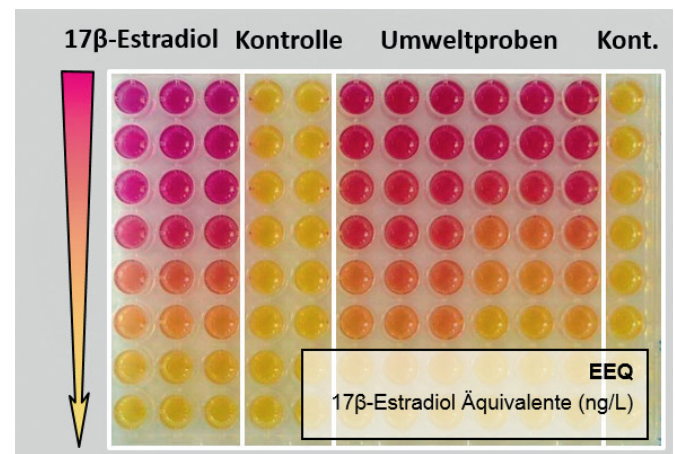
In vivo-Biotests

Zur Erfassung von integrativen Effekten auf ganze Organismen eignen sich *in vivo*-Biotests. Oft werden Testarten verschiedener Ernährungsebenen (Bakterien, Algen, höhere Wasserpflanzen, Wirbellose und Fische) gewählt, um eine Nahrungskette abzubilden/zu simulieren (Fig. 1). Bei diesen Tests untersucht man schädliche Effekte auf Wachstum, Sterblichkeit oder

HEFEZELL-ÖSTROGENTEST (YES)

Zur Erfassung einer Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen im Abwasser bietet sich der robuste Hefezell-Östrogentest, kurz YES für *Yeast Estrogen Screen*, an. Mit Hilfe von genetisch veränderten Hefezellen wird eine Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor über einen Farbumschlag von gelb nach rot gemessen. Mit dem Test kann die Wirkung von Stoffen erfasst werden die den Rezeptor aktivieren (östrogene Wirkung) oder hemmen (anti-östrogene Wirkung).

Dieser einfache Test ist kostengünstig, frei verfügbar und wird breit genutzt; eine Zertifizierung im Rahmen der Internationalen Organisation für Standardisierung (ISO) wurde bereits in die Wege geleitet. Umweltproben müssen für den YES in der Regel aufkonzentriert werden. Für aufkonzentrierte Proben erreicht der YES eine Nachweisgrenze von 0,09 ng/l EEQ und eine Bestimmungsgrenze von rund 0,22 ng/l EEQ. Damit können auch schwach belastete Proben gemessen werden. Ab einer Konzentration von 0,4 ng/l EEQ können ökotoxikologische Effekte auf Gewässerorganismen nicht ausgeschlossen werden. Ohne Aufkonzentrierung liegt die mittlere Nachweisgrenze im YES bei rund 9 ng/l EEQ. Die Variabilität des Tests liegt bei 10-30%.



Testplatte zur Messung der östrogenen Aktivität. In den ersten drei Spalten findet sich eine Verdünnungsreihe mit der Referenzsubstanz 17β-Estradiol. Die Spalten 4, 5 und 12 enthalten nur Kontrollmedium. In den Spalten 6-11 wurden Extrakte von Umweltproben in einer Verdünnungsreihe in je drei Wiederholungen untersucht. Je dunkler die Färbung, desto höher ist die östrogene Aktivität. Eine gelbe Färbung bedeutet keine östrogene Aktivität. Effekte in den Umweltproben werden jeweils relativ zur Referenzsubstanz 17β-Estradiol quantifiziert und in 17β-Estradiol-Äquivalenten (EEQ) (ng/l) angegeben. Die EEQ ist definiert als jene Konzentration der Referenzsubstanz 17β-Estradiol, die den gleichen Effekt hat wie die Umweltprobe

Box 1

Fortpflanzung. Sie werden in der Regel mit nicht aufkonzentrierten Wasserproben durchgeführt. Die Tests erfassen die Wirkung aller Substanzen in einer Wasserprobe, auf die diese Organismen empfindlich reagieren, können aber keine bzw. nur begrenzt Auskunft über die für die schädigende Wirkung verantwortliche(n) Stoffklasse(n) geben. Dies kann, u.a. in *in vivo*-Biotests, nur mithilfe von weiteren Untersuchungen spezifischer biochemischer Effekte, sogenannten Biomarkern, erfol-



Fig. 1 Häufig verwendete aquatische Biotestorganismen auf verschiedenen Ernährungsebenen (nach [5])

Organismes d'essais biologiques aquatiques fréquemment utilisés à différents niveaux de nutrition (d'après [5])

gen. Ein Beispiel hierfür ist die Messung der Konzentration von Vitellogenin (einem Vorläufer des Eidotterproteins) in jungen Fischen, das einen Hinweis auf Belastungen mit östrogen-wirksamen Substanzen gibt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Empfindlichkeit und Dauer der Tests: Wenn die Auswirkungen von Mikroverunreinigungen zeitnah erfasst werden sollen, sind *in vitro*-Biotests mit aufkonzentrierten Proben häufig empfindlicher und schneller als *in vivo*-Biotests.

In situ-Biotests

Diese erfassen Effekte auf Organismen direkt im Ökosystem. Es existieren verschiedenste *in situ*-Methoden. Meist werden die Organismen in Käfigen im zu untersuchenden Gewässer ausgebracht oder in Bypassen in Durchfluss-Aquarien gegenüber Flusswasser ausgesetzt und ihre Reaktion auf vorhandene abiotische Umweltfaktoren gemessen. Dazu zählen, neben z.B. Temperatur, pH-Wert, Nährstoffen und Sauerstoffgehalt, auch die Belastung mit Umweltchemikalien. Die Dauer der Tests kann von einer Woche bis zu mehreren Monaten variieren. Hierdurch wird eine hohe ökologische Relevanz gewährleistet. Allerdings ist die Interpretation der Ergebnisse solcher Biotests schwieriger als bei *in vitro*- und *in vivo*-Biotests, da sie nicht unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt werden und die gemessenen Effekte verschiedene Ursachen haben können. Sie sind in der Regel mit einem relativ hohen finanziel-

len und personellen Aufwand verbunden und schwierig zu standardisieren [4].

BEURTEILUNG WEITERGEHENDER ABWASSERREINIGUNGSVERFAHREN

PROJEKT «STRATEGIE MICROPOLL»

Im Rahmen des Projektes «Strategie Micropoll» des Schweizerischen Bundesamtes für Umwelt (BAFU) wurde eine Strategie bezüglich Mikroverunreinigungen aus kommunalen Abwasser erarbeitet. Darin wurde u. a. im Rahmen von Pilotversuchen die Effizienz von Technologien zur weitergehenden Behandlung von biologisch gereinigtem Abwasser untersucht. Dazu gehören u. a. (i) Ozonung mit nachgeschalteter Sandfiltration (Ozonung-SF), und (ii) Pulveraktivkohlebehandlung (PAK) mit nachgeschalteter Filtration (z. B. einer Sand- oder Ultrafiltration (UF)) zur Elimination von Mikroverunreinigungen (im Besonderen polaren, persistenten und bioaktiven Substanzen) aus kommunalem Abwasser. Hierfür wurden zwei grosstechnische Pilotstudien auf der Abwasserreinigungsanlage (ARA) Wüeri in Regensdorf und der ARA Vidy in Lausanne durchgeführt. Dies erfolgte in enger Kooperation mit Experten aus Forschung und Praxis und personeller und finanzieller Unterstützung der kantonalen Umweltschutzämter und der ARA-Betreiber.

FALLBEISPIEL ARA VIDY LAUSANNE

Im Folgenden wird ein Überblick über die Methoden und Ergebnisse aus der Pilot-

studie auf der ARA Vidy gegeben, in der beide Verfahren (Ozonung-SF und PAK-UF) angewendet und verglichen wurden. Verfahrenstechnische Informationen zum Pilotversuch in Regensdorf mit Fokus auf Ozonung finden sich in [6].

Auswahl von Biotests und Fragestellungen
Zur Untersuchung von ökotoxikologischen Effekten wurde ein sehr breiter Ansatz gewählt. Dazu wurden verschiedene Biotests verglichen und geeignete Methoden identifiziert, die:

- (I) genügend empfindlich und robust zur Erfassung des Effektes von Mikroverunreinigungen sind,
- (II) mehrere toxische Wirkmechanismen sowie Effekte auf Organismen verschiedener Ernährungsstufen (trophische Ebenen) wie z. B. Algen, Wasserflöhe und Fische erfassen, und
- (III) mit denen neben aufkonzentrierten Proben auch Wasserproben ohne Aufkonzentrierung untersucht werden können, um sogenannte «Blind Spots», die durch den Verlust von Stoffen bei der Probenaufbereitung entstehen können, zu vermeiden.

Diese Auswahl wurde ab 2007 durch ein Gremium von Experten aus Wissenschaft und Praxis aus der Schweiz, Frankreich und Deutschland begleitet und jeweils für die beiden grosstechnischen Pilotstudien diskutiert und angepasst. Das Oekotoxizentrum koordinierte diese Arbeiten für den Pilotversuch in Lausanne. Es wurden die folgenden Fragen untersucht:

- Welche Biotests können eine Auskunft über die Eliminationseffizienz der Abwasserreinigung geben?
- Wie effizient sind eine Ozonung-SF sowie eine PAK-UF-Behandlung zur Elimination von Mikroverunreinigungen und deren biologischen Wirkungen aus dem Abwasser? Entstehen bei der Ozonung unbekannte Umwandlungsprodukte, die Wasserorganismen schädigen?

Basierend auf den oben genannten Kriterien wurde ein Set von 16 *in vitro*- und 9 *in vivo*-Biotests ausgewählt (Tab. 1). Bei den *in vitro*-Biotests zur Erfassung von hormonellen Wirkungen wurde neben einer Aktivierung des jeweiligen Hormonrezeptors (z. B. eine östrogene Wirkung im Östrogenrezeptor (ER)-Calux®) auch dessen Hemmung (z. B. eine anti-östrogene Wirkung im Anti-ER-Calux®) gemessen. Beim kombinierten Algentest

wurden spezifische Wirkungen auf die Fotosynthese gemessen, daher ist dieser als *in vitro*-Biotest aufgeführt. Im Gegensatz dazu wurden bei den *in vivo*-Biotests mit Primärproduzenten nur Auswirkungen auf das Wachstum untersucht.

PROBENAHME UND ANALYTIK

Zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit der weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren Ozonung-SF und PAK-UF mittels chemischer Analytik und ökotoxikologischer Biotests wurden mehrere Messkampagnen (MK) auf der ARA Vidy in Lausanne durchgeführt. Weitere Details hierzu, wie z.B. Probenahmedaten und spezifische Ozon- bzw. PAK-Dosierungen, finden sich im Schlussbericht der

Pilotstudie [7]. *Figur 2* zeigt das Verfahrensschema der Pilotanlagen auf der ARA Lausanne mit den beiden weitergehenden Reinigungsstufen.

An folgenden Stellen der Pilotanlage wurden Abwasserproben genommen (*Fig. 2*):

- Kläranlagenzulauf (ZU)
- Ablauf nitrifizierendes Wirbelbett (WB) (2. bis 4. Messkampagne)
- Ablauf Ozonung (OZ)
- Ablauf Sandfilter (SF) (3. und 4. Messkampagne)
- Ablauf Pulveraktivkohlebehandlung, gefolgt von Ultrafiltration (PAK-UF) (2. bis 4. Messkampagne)

Wasserproben wurden zeitproportional mithilfe automatischer Probenehmer ge-

nommen und die Tagesmischproben auf klassische Wasserqualitätsparameter wie gelösten organischen Kohlenstoff, biologischen und chemischen Sauerstoffbedarf, pH und anorganische Nährstoffe untersucht.

Für die chemische Analytik und die Biotests wurden Tagesmischproben über eine Woche gesammelt, über Glasfaserfilter filtriert und bei 4 °C aufbewahrt. Diese Proben wurden für die Biotests anschliessend proportional zu 2-, 3- oder 7-Tages-Mischproben vereint. Details zur Auswahl und Analyse von Mikroverunreinigungen finden sich in [7]; Probenvorbereitung und -aufkonzentrierung für die Biotests sind in [5] beschrieben.

Testname	Ernährungsebene	Testorganismus	Nachweisbare Effekte (Wirkung)
<i>In vitro</i> -Biotest			
Hefezell-Östrogentest (YES)	-	Bäckerhefe	Aktivierung des Östrogenrezeptors (Östrogenität/hormonelle Wirkung)
9 verschiedene CALUX®-Tests ([anti-]ER, [anti-]JAR, [anti-]GR, [anti-]PR, TR)	-	Menschliche Zelllinien	Aktivierung und Hemmung verschiedener Hormonrezeptoren (Östrogen-, Androgen-, Glucocorticoid-, Progesteron- und Thyroidhormon-Rezeptoren, d.h. ER, AR, GR, PR, TR) (hormonelle Wirkung)
[anti-]PPARg1-CALUX®	-	Menschliche Zelllinie	Aktivierung des PPARg1-Rezeptors (u. a. Wirkung auf den Fettstoffwechsel)
H295R-Steroidgenese-Test	-	Menschliche Zelllinie	Wirkung auf die Bildung von Steroidhormonen
Mikrokern-Test	-	Hamster-Zelllinie	Schädigung des Erbguts (Gentoxizität)
UmuC-Test	-	Bakterien (Salmonellen)	Schädigung des Erbguts (Gentoxizität)
Ames-Test	-	Bakterien (Salmonellen)	Vererbbare Veränderung des Erbguts (Mutagenität)
Kombinierter Algentest	Primärproduzenten	Grünalgen	Hemmung der Fotosynthese (u. a. Wirkung bestimmter Herbizide) und Hemmung des Wachstums
<i>In vivo</i> -Biotest			
Wachstumstests	Primärproduzenten	Grünalgen, Wasserlinsen	Hemmung des Wachstums
Lumineszenz-Hemmtest	Zersetzer	Leuchtbakterien	Hemmung der Biolumineszenz
Chronischer Fortpflanzungstest mit Wasserflöhen	Primärkonsumenten	Wasserfloh	Hemmung der Fortpflanzung, verringertes Überleben
Glanzwurm-Fortpflanzungstest	Verwerter	Glanzwurm	Hemmung der Fortpflanzung, Biomassereduktion
Schnecken-Fortpflanzungstest	Verwerter	Neuseeländische Zwergdeckelschnecke	Hemmung der Fortpflanzung, verringertes Überleben, hormonaktive Wirkung
Frassaktivitäts-Test mit Bachflohkrebsen	Zerkleinerer	Bachflohkrebs	Verringerung der Frassaktivität und des Überlebens
Fischeitest	Sekundärkonsumenten	Zebrabärbling	Erhöhung der Sterblichkeit
<i>Fish early life stage toxicity</i> (FELST)-Test	Sekundärkonsumenten	Regenbogenforelle	Verringerung der Schlupfrate und des Überlebens, Fehlbildungen, Verhaltensstörungen, Hemmung des Wachstums, Bildung von Vitellogenin (Biomarker für Östrogenität)

Tab. 1 Überblick über die in der Pilotstudie auf der ARA Vidy Lausanne angewendeten Biotests
Aperçu des essais biologiques utilisés dans l'étude pilote à la STEP de Vidy Lausanne

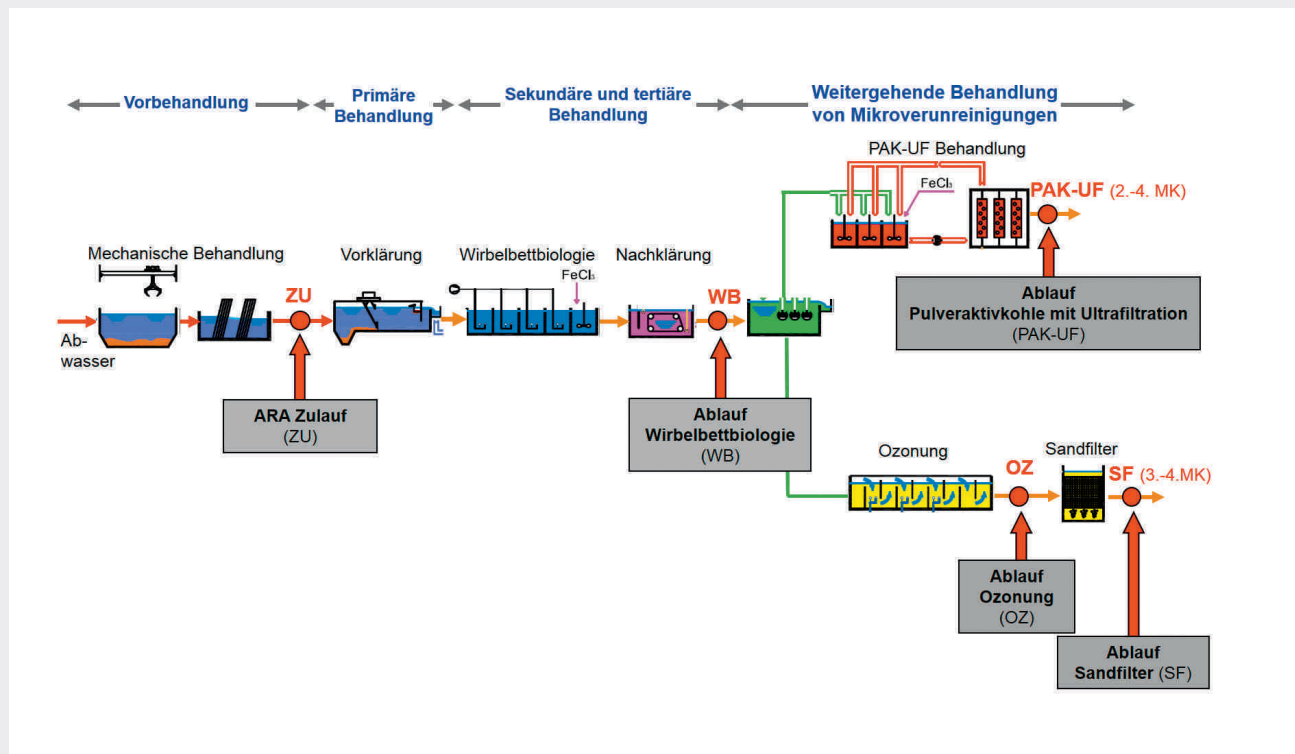


Fig. 2 Verfahrensschema der Pilotanlage auf der ARA Lausanne mit Probenahmestellen (verändert nach [7]). Die Verfahrensstufen nach dem Ablauf der Vorklärung wurden für die Pilotversuche erstellt (MK = Messkampagne)

Schéma du processus de l'usine pilote à la STEP de Lausanne avec points d'échantillonnage (adapté en fonction de [7]). Les étapes du processus après l'expiration du prétraitement ont été faites pour les essais pilotes (MK = campagne de mesures)

VERGLEICH DER BIOTESTERGEBNISSE

In vitro-Biotests

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der *in vitro*-Biotests. Dargestellt sind jeweils nur die 10 Biotests, in denen Effekte gemessen wurden. In 6 von 14 *in vitro*-Biotests wurde in keiner der Reinigungsstufen entlang der ARA (ZU, WB, OZ, SF, PAK-UF) eine Wirkung gemessen. Dabei handelte es sich um Biotests, die eine Hemmung verschiedener Hormonrezeptoren (gemessen in Anti-Calux®-Tests) erfassen, nämlich des Östrogen(ER)-, Androgen(AR)-, Glucocorticoid(GR)- und Progesteron(PR)-Rezeptors, ebenso wie des PPARγ1-Rezeptors, der eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt. Auch bewirkte das Abwasser keine Aktivierung des Schilddrüsen(Thyroid)-Hormonrezeptors (TR).

Fünf *in vitro*-Tests zeigten, dass die biologische Reinigungsstufe (WB) die toxische Wirkung des Abwassers gegenüber dem Zulauf (ZU) verringerte. Das biologisch gereinigte Abwasser enthielt vor allem noch fotosynthesehemmende Stoffe und bestimmte Stoffe, die ähnlich wie Hormone wirken (u. a. glucocorticoid- und progesteronähnliche Wirkung). Sowohl die darauffolgende Ozonung als auch

die PAK-Stufe verringerten die meisten spezifischen Effekte weiter. Schädigungen des Erbguts (Gentoxizität im Mikrokern- und im *umuC*-Test) oder vererbare Erbgutveränderungen (Mutagenität im Ames-Test), die jeweils gezielt nach der Ozonung und nach Ozonung + Sandfiltration untersucht wurden, konnten nicht nachgewiesen werden.

In vivo-Biotests

In vivo-Biotests wurden sowohl direkt auf der Kläranlage im Durchfluss (Glanzwurm-Fortpflanzungstest und *Fish early life stage toxicity*-Test mit Regenbogenforellen) als auch im Labor in stehenden Systemen durchgeführt (Tests mit Grünalgen, Wasserlinsen, Leuchtbakterien, Wasserflöhe, Bachflohkrebsen, Zwergdeckelschnecken und Zebraäbrlingen). Beim Fortpflanzungstest mit Glanzwürmern zeigten die Versuchstiere nach der Ozonung und nach PAK-UF-Behandlung eine verminderte Biomasse. Ursache für die Biomassereduktion im Abwasser nach Ozonung könnten biologisch abbaubare Umwandlungsprodukte sein, die negative Auswirkungen auf das Wurmwachstum haben und bei der Ozonung entstehen. Der Sandfilter entfernte diese Stoffe aber aus dem Abwasser. Die Biomassereduk-

tion im Abwasser nach PAK-UF-Behandlung könnte auf eine verringerte Verfügbarkeit von Nähr- und Schwebstoffen in diesem Abwasser zurückzuführen sein. Beim Biotest mit Regenbogenforellen nahm die Toxizität durch die Ozonung + Sandfiltration und durch die Behandlung mit Pulveraktivkohle + Ultrafiltration ab, was sich in einer geringeren Sterblichkeit, einer höheren Schlupfrate und einem höheren Gewicht der Fischembryonen im Vergleich zu den im biologisch gereinigten Abwasser gehaltenen Fischen zeigte. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser beiden Tests. Mit den *in vivo*-Biotests im Labor in stehenden Systemen wurde eine geringe Toxizität von Rohabwasser gemessen, die meist durch die biologische Behandlung entfernt wurde. War eine schwache Resttoxizität vorhanden, wurde diese durch keine der weitergehenden Reinigungsstufen zusätzlich verringert. Nach Ozonung und Sandfiltration zeigte sich grundsätzlich kein Anstieg der Toxizität, der auf die Bildung stabiler toxischer Umwandlungsprodukte hindeuten würde. Einzig die Wasserflöhe zeigten vereinzelt nach Ozonung und Sandfiltration eine erhöhte Toxizität an. Verantwortlich für diese Effekte könnten u. a. Schwermetalle sein,

Biotest	Stoffklasse/Wirkung	Biologische Behandlung	Ozonung	Ozonung + Sandfiltration (3.+4. MK)	Pulveraktivkohle – UF
Hefezell-Östrogentest ER-CALUX®	Östrogene/Hormonelle Wirkung (17β-Estradiol-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓
	Östrogene/Hormonelle Wirkung (17β-Estradiol-Äquivalente)	↓	↓	var.	↓
AR-CALUX®	Androgene/Hormonelle Wirkung (Dihydrotestosteron-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓
GR-CALUX®	Glucocorticoide/Hormonelle Wirkung (Dexamethason-Äquivalente)	~	↓	↓	↓
PR-CALUX®	Progesterone/Hormonelle Wirkung (Org 2058-Äquivalente)	↑	↓	↓	↓
PPARγ1-CALUX®	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Stoffe/ u. a. Wirkung auf den Fettstoffwechsel (Rosiglitazon-Äquivalente)	↓	↓	var.	↓
H295R-Steroidgenese-Test	Estradiol-Produktion/Hormonelle Wirkung	/	↓	↓	↓
	Testosteron-Produktion/Hormonelle Wirkung	/	~	~	~
Kombinierter Algentest	Herbizide/Fotosynthesehemmende Wirkung (Diuron-Äquivalente)	var.	↓	↓	↓
	Alle Stoffe/Wachstumshemmende Wirkung (Basistoxizitäts-Äquivalente)	↓	↓	↓	↓

rot (↑) = Zunahme der Toxizität; grün (↓) = abnehmende Toxizität in der Mehrzahl der Messkampagnen (≥ 3); grau (–) = gleichbleibende Toxizität; grau (var.) = variierende Ergebnisse zwischen verschiedenen Messkampagnen; ausgestrichene Felder = keine Zulauf-Proben (ZU) gemessen, daher keine Beurteilung möglich

Tab. 2 Erfassung von spezifischen Effekten in Abwasser aus verschiedenen Reinigungsstufen mittels *in vitro*-Biotests. Dargestellt sind die 10 Biotests, in denen Effekte gemessen wurden. Die spezifische Ozondosis betrug 0,5–1,1 mg O₃/g DOC und die spezifische PAK-Dosis 10–20 mg/l. Enregistrement des effets spécifiques dans les eaux usées dans des étapes de purification au moyen d'essais biologiques *in vitro*. Les 10 essais biologiques où les effets ont été mesurés sont représentés. La dose d'ozone spécifique était de 0,5–1,1 mg O₃/g DOC et le dosage de CAP de 10–20 mg/l

Testname und Testorganismus	Untersuchte Parameter	Biologische Behandlung	Ozonung	Ozonung + Sandfiltration	Pulveraktivkohle – UF
Glanzwurm-Fortpflanzungstest	Fortpflanzung	/	~	~	~
	Biomasse	/	↑	~	↑
Fish early life stage toxicity-Test mit Regenbogenforellen	Gesamtüberlebensrate	/	↓	↓	↓
	Überleben von Embryonen	/	~	~	↓
	Überleben von Larven und Jungfischen	/	↓	↓	↓
	Schlupfrate	/	~	~	↓
	Aufschwimmen der geschlüpften Larven	/	↓	↓	↓
	Frischgewicht am Testende	/	~	~	↓
	Länge der Larven am Testende	/	~	~	↓
	Vitellogenin-Konzentration	/	↓	↓	↓

rot (↑) = Zunahme der Toxizität; grün (↓) = abnehmende Toxizität in der Mehrzahl der Messkampagnen (≥ 3); grau (–) = gleichbleibende Toxizität; ausgestrichene Felder = keine Zulauf-Proben (ZU) gemessen, daher keine Beurteilung möglich

Tab. 3 Ergebnisse der *in vivo*-Biotests mit Abwasser im Durchfluss: Veränderung der Toxizität über die verschiedenen Behandlungsstufen. Die spezifische Ozondosis betrug 0,8–1,1 mg O₃/g DOC und die spezifische PAK-Dosis 12–20 mg/l. Résultats des essais biologiques *in vivo* avec des eaux usées dans le débit: modification de la toxicité durant les différentes étapes de traitement. La dose d'ozone spécifique était de 0,8–1,1 mg O₃/g DOC et le dosage de CAP spécifique de 12–20 mg/l

die durch die Ozonung verfügbarer gemacht wurden.

ELIMINATIONEFFIZIENZ VERSCHIEDENER BEHANDLUNGSSTUFEN

In der biologischen Behandlung wurde nur ein Teil der spezifischen, mit *in vitro*-Biotests gemessenen, Effekte im Mittel

zu 80% eliminiert. Fotosynthesehemmende und bestimmte hormonähnliche Stoffe (Fig. 3) wurden dagegen nicht oder nur zu einem kleinen Teil entfernt. Hier nahm die Wirkung sogar teilweise zu (= negative Elimination). Durch die Kombination von biologischer Behandlung mit Ozonung + Sandfiltration oder Pulver-

aktivkohlebehandlung + Ultrafiltration konnten nahezu alle spezifischen Effekte sehr gut entfernt werden (zu 84 bis 100%). Die chemische Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Eine Ausnahme stellten progesteronähnlich wirkende Stoffe dar (wie z.B. Hydroxyprogesteron oder Levonorgestrel), die durch die Ozonung nicht entfernt

wurden. Allerdings waren hier die Konzentrationen allgemein gering (0,11 bis 2,6 ng/l), sodass, basierend auf dem derzeitigen Wissen, keine negativen Effekte auf Wasserlebewesen zu erwarten sind. *Figur 3* zeigt die mittleren Eliminationsleistungen der ausgewählten *in vitro*-Biotests für die biologische Behandlung,

biologische Behandlung + Ozonung + Sandfiltration (Eliminationseffizienz der 4. Messkampagne, da hier die technischen Prozesse optimiert waren) und biologische Behandlung + PAK-UF-Stufe (Mittelwert \pm Standardabweichung von 2.-4. Messkampagne). Dargestellt sind die Tests, bei denen Effekte gemessen

wurden. Die spezifische Ozonosis betrug 0,5-1,1 mg O₃/g DOC und die spezifische PAK-Dosis 10-20 mg/l.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

LEISTUNG VON BIOTESTS

Biotests geben eine Auskunft über die Eliminationseffizienz der Abwasserreinigung in Bezug auf Mikroverunreinigungen und können Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsstufen aufzeigen.

Insgesamt hat sich die Anwendung von ökotoxikologischen Biotests für die Leistungsbeurteilung von weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren als relevant und nützlich erwiesen. Der Vergleich der verwendeten Biotests in den verschiedenen Studien zeigt, dass es keinen Einzeltest gibt, der sich für die Gesamtbeurteilung der Toxizität einer Abwasserprobe nutzen lässt. Vielmehr muss stets eine Gruppe von Biotests, die unterschiedliche Wirkungen anzeigen, verwendet werden. Für die Messung der Leistungsfähigkeit weitergehender Abwasserreinigungsverfahren auf der ARA Vidy erwiesen sich *in vitro*-Biotests, vor allem der kombinierte Algentest, der Hefezell-Östrogentest (oder der ER-Calux® und ggfs. weitere Rezeptorbindungstests) und der Ames-Test, als geeigneter als die meisten *in vivo*-Biotests. Es ist nun wichtig, die genannten *in vitro*-Methoden weiter zu standardisieren, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Bei den *in vivo*-Biotests konnte die Verringerung ökotoxikologischer Effekte durch weitergehende Abwasserreinigungsverfahren mit dem *Fish early life stage toxicity*-Test mit Regenbogenforellen sehr gut aufgezeigt werden, während die Mehrzahl der anderen *in vivo*-Biotests dafür nicht genügend empfindlich war. Insgesamt sind jedoch die Kosten dieses Biotests deutlich höher als die der *in vitro*-Biotests. Obwohl solche chronischen *in vivo*-Tests sehr aussagekräftig sind, um Effekte auf ganze Organismen zu beurteilen, fehlt es an geeigneten Tests mit empfindlichen Organismen, die mit einem vertretbaren Aufwand routinemässig durchgeführt werden können. Die beiden folgenden Artikel in diesem Heft [8, 9] greifen diese Ergebnisse auf und geben weitere Beispiele für die Anwendung von *in vitro*- und *in vivo*-Biotests zur Beurteilung weitergehender Abwasserreinigungsmethoden.

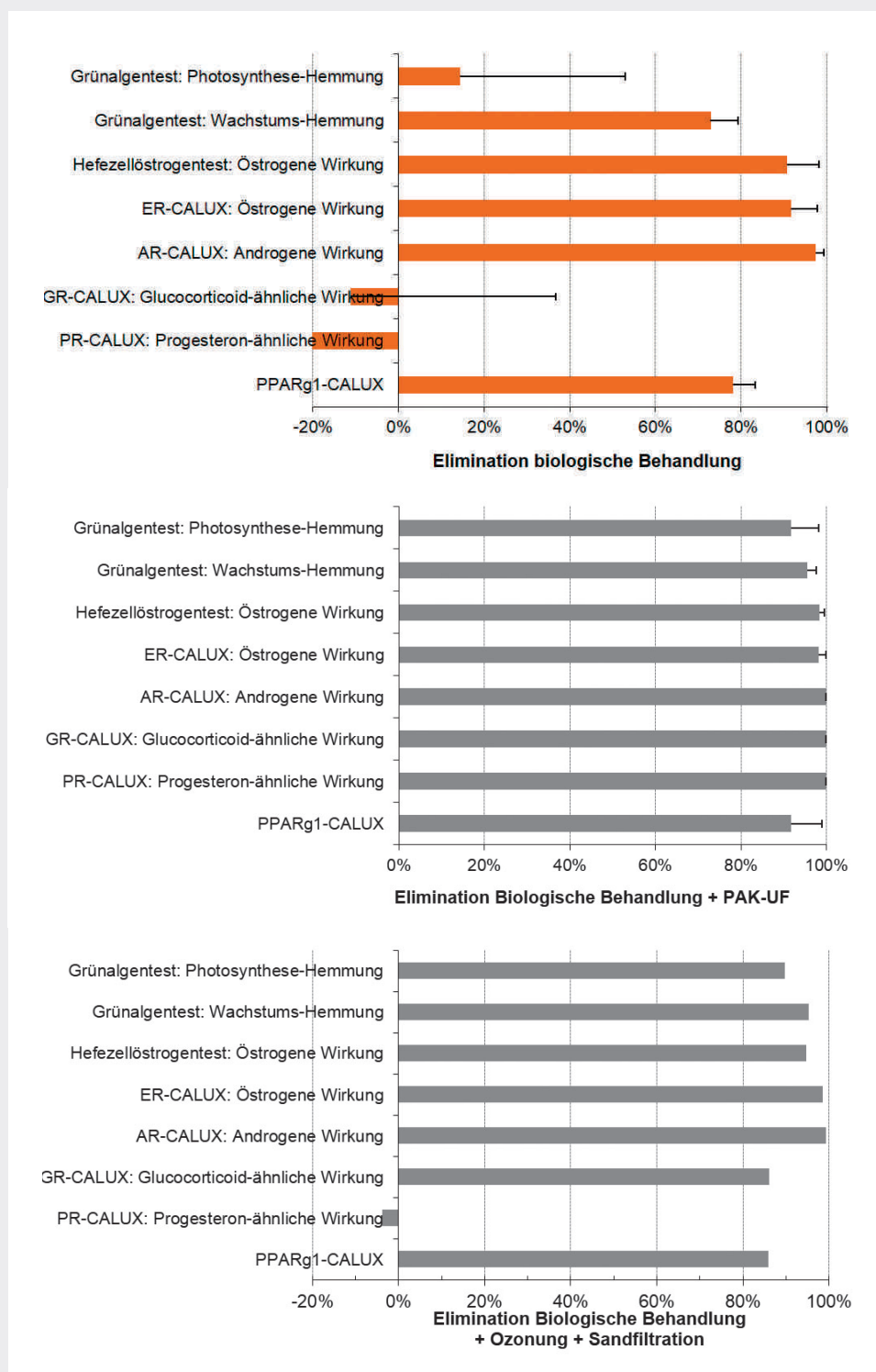


Fig. 3 Mittlere Eliminationseffizienz für spezifische Effekte der *in vitro*-Biotests über die verschiedenen Behandlungsstufen

Efficacité d'élimination moyenne pour les effets spécifiques de l'essai biologique *in vitro* des différentes étapes de traitement

ERGEBNISSE VERGLEICHBAR MIT AUSLÄNDISCHEN STUDIEN

Ozonung, gefolgt von Sandfiltration und PAK-Behandlung, mit nachfolgender Filtration entfernen Mikroverunreinigungen und ihre biologischen Wirkungen sehr effizient.

Die Eliminationseffizienz für die Mehrzahl der untersuchten spezifischen Effekte war grösser als 80%. Es gab keinen Hinweis auf die Bildung von stabilen toxischen Umwandlungsprodukten in der Ozonungsstufe, d. h. solche Stoffe, die auch nach der nachgeschalteten biologisch aktiven Sandfiltration vorhanden waren.

Diese Ergebnisse sind gut vergleichbar mit denen ähnlicher Studien im Ausland. Im Projekt *KomOzon* (Österreich) [10] wurden mit drei *in vitro*-Biotests (Ames-Test, Mikrokerntest, Comet-Assay) keine durch die Ozonung hervorgerufenen genotoxischen und mutagenen Wirkungen festgestellt. Hormonelle Wirkungen (Östrogenität und Androgenität) wurden durch die Behandlung mit Ozon deutlich reduziert. Ausgewählte *in vivo*-Biotests (Grünalgen-Wachstumshemmtest, Wasserfloh-Immobilisationstest, Fischeitest) konnten aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit die Auswirkungen der zusätzlichen Reinigungsstufe auf die Abwasserqualität nicht messen. In keiner der Behandlungen wurden Gewebeschädigungen in Leber und Gonaden bei ausgewachsenen Fischen (Japanische Medaka, *Oryzias latipes*) beobachtet, die über 21 Tage in den Abwässern gehalten worden waren.

Das Projekt *Echibioteb* (Frankreich) [11] konnte zeigen, dass sowohl Ozonung als auch granuliert Aktivkohle die Menge an erbgutschädigenden, hormonaktiven und dioxinähnlichen Stoffen deutlich reduzierten. Dies konnte mit *in vitro*-Biotests (SOS-Chromotest zur Erfassung von Genotoxizität, Tests mit Zellkulturen zur Erfassung von hormon- und dioxinähnlichen Stoffen) nachgewiesen werden. Hier zeigten der Bakterien-Lumineszenzhemmtest und der Grünalgen-Wachstumshemmtest vereinzelt negative Effekte nach Ozonung an. Mit im Durchfluss durchgeführten *in vivo*-Biotests mit Wasserflöhen, Bachflohkrebsen, Mückenlarven (Chironomiden) und Fischen (Medaka) wurde keine Toxizität der mit Ozon oder granulierter Aktivkohle behandelten Abwässer festgestellt.

Auch das Projekt *SchussenAktivPlus* (Deutschland) [12] konnte zeigen, dass sich *in vitro*-Biotests für die Überwachung der Abwasserqualität eignen. Ausserdem konnten die Ergebnisse der *in vitro*-Biotests mit Effekten in ganzen Organismen (Fischen und Wirbellose) bestätigt werden. Zum Beispiel korrelierten die Ergebnisse des YES zum Nachweis von (anti-)östrogenen Stoffen gut mit den gemessenen Effekten bei Schnecken (Fortpflanzung) und Fischen (Entwicklung der Geschlechtsorgane) [13].

FAZIT

Biotests sind eine sinnvolle Ergänzung zur Gesamtbeurteilung der weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren. Sie können grundsätzlich für eine Leistungsbeurteilung der Abwasserreinigung eingesetzt werden, wobei sich hierfür effektspezifische *in vitro*-Biotests als geeigneter erwiesen haben als die Mehrzahl verfügbarer *in vivo*-Biotests. Um diese Biotests für die Praxis besser anwendbar zu machen, wird derzeit eine Standardisierung der geeignetsten *in vitro*-Biotests angestrebt.

Die Qualität des Abwassers wurde durch die weitergehenden Abwasserreinigungsverfahren signifikant verbessert. Es konnte sowohl mit chemischer Analytik als auch mit *in vitro*-Biotests gezeigt werden, dass Ozonung + Sandfiltration und Pulveraktiv-

AUSGEWÄHLTE FACHBEGRIFFE

Biomarker	molekulare, biochemische, zelluläre oder physiologische Indikatoren für Schadstoffstress, die sowohl in Organismen im Labor als auch im Feld gemessen werden können
<i>in vitro</i>	ausserhalb des lebenden Organismus, in Einzellern oder Zellkulturen
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
<i>in situ</i>	im Freiland/im Feld
Genotoxizität	Erbgutschädigung
Mutagenität	vererbare Erbgutveränderung
androgene Wirkung	Wirkung ähnlich dem männlichen Hormon Testosteron (vermännlichend)
östrogene Wirkung	Wirkung ähnlich dem weiblichen Hormon 17 β -Estradiol (verweiblichend)
trophische Ebene	Ernährungsebene
Primärproduzenten	Grünalgen und Pflanzen, die Fotosynthese betreiben
Primärkonsumenten	Organismen, die sich von Algen und Pflanzen ernähren (Pflanzenfresser)
Sekundärkonsumenten	Organismen, die sich von Pflanzenfressern ernähren
Verwerter	Organismen, die sich von totem zerkleinertem organischen Material ernähren
Zersetzer	Organismen, die totes organisches Material abbauen/zersetzen (z.B. Bakterien oder Pilze)
Zerkleinerer	Organismen, die totes organisches Material zerkleinern

DANKSAGUNG

Dieses Projekt wurde durch das Bundesamt für Umwelt finanziert. Ein herzliches Dankeschön geht an *D. Thonney, A. Magnet, J. Margot, D. Baumberger* und *T. Mengesha* für die Unterstützung bei der Probenahme, im Labor und bei der Datenauswertung. Danken möchten wir auch *P. Behnisch, H. Besselink, M. Bundschuh, T. Floehr, C. Hafner, M. Hecker, E. Highley, H. Hollert, S. Maletz, S. Santiago, R. Schulz, S. van der Linden* und *M. Weil* für die Durchführung eines Teils der Biotests. Danke auch an *R. Ashauer, N. Chèvre, R. Eggen, B. Ferrari, R. Flück, J. Garric, R. Gälli, A. Häner, B. Hitzfeld, J. Hollender, M. Junghans, B. Känel, A. Schäfer, P. Kunz, S. Lehmann, M. Liess, P. Niederhauser, J. Oehlmann, H. Segner, K. Schirmer* und *P. Vioget* für wertvolle Diskussionen zum Projekt. *C. Abegglen, U. von Gunten, H. Siegrist, S. Zimmermann-Steffens* und *E. Vermeirssen* danken wir für wertvolle Kommentare zum Manuskript.

kohle + Ultrafiltration die Konzentrationen und Wirkungen von Mikroverunreinigungen im Abwasser verringern. Ein breites Spektrum von Mikroverunreinigungen und damit verbundenen Wirkungen wurden zu mehr als 80% entfernt. Zudem gab es im Pilotprojekt auf der ARA Vidy Lausanne keinen Hinweis auf eine Bildung von stabilen toxischen Umwandlungsprodukten der Ozonung. Aufgrund der Ergebnisse anderer Studien, in denen negative Effekte nach der Ozonung gemessen wurden, wird jedoch empfohlen, nach einer Ozonung immer eine Stufe mit biologischer Aktivität (z. B. einen Sandfilter) nachzuschalten. Hiermit kann das

Risiko des Eintrags von toxischen und biologisch abbaubaren Umwandlungsprodukten in die Wasserkörper verringert werden.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Gälli, R.; Ort, C.; Schärer, M. (2009): Mikroverunreinigungen in den Gewässern. Bewertung und Reduktion der Schadstoffbelastung aus der Siedlungsentwässerung. Umwelt-Wissen Nr. 0917. Bundesamt für Umwelt, Bern: 103 S.
- [2] Schärer, M.; Sieber, U.; Müller, S. (2010): Weitere Massnahmen gegen Mikroverunreinigungen - Situation in der Schweiz. Gas, Wasser, Abwasser, 7: S 563-568
- [3] Abegglen, C.; Siegrist, H. (2012): Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen, in Umwelt-Wissen Nr. 1214. Bundesamt für Umwelt, Bern, 210 S.
- [4] Connon, R.E.; Geist, J.; Werner, I. (2012): Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. Sensors (Basel), 12(9): p. 12741-71
- [5] Kienle, C.; Kase, R.; Werner, I. (2011): Evaluation of bioassays and wastewater quality - In vitro and in vivo bioassays for the performance review in the project Strategy Micropoll, Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf
- [6] Abegglen, C. et al. (2009): Ozonung von gereinigtem Abwasser. Schlussbericht Pilotversuch Regensdorf, Eawag, Dübendorf: 80 S.
- [7] Margot, J. et al. (2011): Traitement des micropolluants dans les eaux usées - Rapport final sur les essais pilotes à la STEP de Vidy (Lausanne), Ville de Lausanne, Lausanne
- [8] Fux, C. et al. (2015): Ausbau der ARA Basel. Aqua & Gas 7/8
- [9] Wunderlin, P. et al. (2015): Ozonung - Testverfahren zur Beurteilung der Behandelbarkeit von Abwasser mit Ozon. Aqua & Gas 7/8
- [10] Schaar, H. et al. (2011): KomOzon - Technische Umsetzung und Implementierung einer Ozonungs-

stufe für nach dem Stand der Technik gereinigtes kommunales Abwasser. Heranführung an den Stand der Technik. Lebensministerium Wien

- [11] ECHIBIOTEB (2015): Outils innovants d'échantillonnage, d'analyses chimiques et biologiques pour le suivi de traitements avancés des eaux usées et des boues: echibioteb.irstea.fr/en. Letzter Zugriff: 20.5.2015
- [12] Triebkorn, R. et al. (2013): SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially

pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. Environmental Sciences Europe, 25(1): p. 2

- [13] Henneberg, A. et al. (2014): Are In Vitro Methods for the Detection of Endocrine Potentials in the Aquatic Environment Predictive for In Vivo Effects? Outcomes of the Projects SchussenAktiv and SchussenAktiv plus in the Lake Constance Area, Germany. PLoS ONE, 9(6): p. e98307

> SUITE DU RÉSUMÉ

d'essais biologiques ont été examinés pour vérifier leur aptitude à l'élimination des micropolluants dans les usines de traitement des eaux usées. Des essais biologiques à base de cellules (*in vitro*) et des essais biologiques organismiques (*in vivo*) ont été inclus pour couvrir un large éventail d'effets écotoxicologiques sur les cellules et les organismes de différents niveaux trophiques. Outre des échantillons d'eau concentrés, des échantillons d'eau sans concentration ont également été examinés pour tenir compte de ce que l'on appelle les «Blind Spots» qui peuvent survenir en raison de la perte de substances lors de la préparation de l'échantillon.

L'utilisation d'essais biologiques pour évaluer la performance des procédés de traitement des eaux usées avancés, telles que l'ozonation ou le traitement par charbon actif en poudre (CAP) s'est avérée pertinente et utile. L'étude pilote à la station d'épuration des eaux usées (STEP) de Vidy, à Lausanne, entre autres, a démontré que les essais biologiques *in vitro* qui montrent des effets spécifiques (p. ex., une inhibition de la photosynthèse ou une activité œstrogénique) étaient les plus appropriés. Toutefois, certains essais biologiques *in vivo* tels que le test de «fish early life stage toxicity» (toxicité dans la première phase de vie des poissons) avec des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont également montré les avantages de l'ozonation et du traitement CAP. Les risques possibles des produits de transformation biodégradables qui surviennent pendant l'ozonation peuvent être éliminés par une étape de filtration finale avec une activité biologique (un filtre à sable, par exemple). Il a pu être démontré qu'une large gamme d'effets écotoxicologiques a été éliminée à plus de 80% par l'épuration des eaux usées continue. En outre, les deux méthodes de traitement ont été tout aussi efficaces.



**Ein Partner ...
drei starke Marken !**

pumpen 

 **FIPS**

 **PUMP-FEC**



Systemtechnik AG

3S Systemtechnik AG
Pumpen System Service
Brunnmattstrasse 7
5236 Remigen

Tel. 056 297 88 20
Fax. 056 297 88 29
info@pumpen-3s.ch
www.pumpen-3s.ch

