



Hormonelle Belastung im Fließgewässer während eines Regenereignisses

Nicolai Bätz^{1,2,3} (baetz@iuta.de), Michelle Klein^{1,2,3} (klein@iuta.de),
Fabian Itzel^{1,3} (itzel@iuta.de), Torsten C. Schmidt^{2,3} (torsten.schmidt@uni-due.de),
Jochen Türk^{1,3} (tuerk@iuta.de)

¹ Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA), Bliersheimer Str. 58 – 60, 47229 Duisburg

² Instrumentelle Analytische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 5, 45141 Essen

³ Zentrum für Wasser- und Umweltforschung (ZWU), Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 2, 45141 Essen

Zusammenfassung

Zur Untersuchung der hormonellen Belastung durch ein Regenüberlaufbecken (RÜB) während eines Regenereignisses wurde die Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) mit einem Reportergerassay zur gleichzeitigen Bestimmung von estrogenen, androgenen und gestagenen Wirkungen (yeast multi endocrine-effect screen, YMEES) kombiniert. Relevante Estrogene wurden mittels GC-MS/MS bestimmt. Es konnten verschiedene hormonelle Effekte sowie Estron (E1), 17 α -Estradiol (17 α -E2), 17 β -Estradiol (17 β -E2), 17 α -Ethinylestradiol (EE2) und Estriol (E3) im Ablauf des RÜB und teilweise im Gewässer nachgewiesen werden. Der HPTLC-YMEES eignet sich durch Vergleiche von Effektmustern zur Verursacheridentifizierung. In Kombination mit der instrumentellen Analytik ist eine weitergehende Charakterisierung von hormonellen Belastungen möglich.

Einleitung

Fließgewässer sind mehreren Stressoren anthropogenen Ursprungs ausgesetzt. Kläranlagen sind eine bekannte Quelle von Substanzen, die ohne weitergehende Behandlung nicht ausreichend zurückgehalten bzw. abgebaut werden können [1]. Eine weit weniger untersuchter Eintrag von Stoffen findet über den Regenwasserabfluss statt. Die extremen Hochwasserereignisse in NRW und Rheinland-Pfalz in diesem Jahr verdeutlichen die Relevanz. Laut IPCC werden in Zukunft in vielen Regionen Europas extreme Wetterereignisse wie Starkregen zunehmen und somit zu erhöhten kurzzeitigen Abflussmengen führen [2, 3]. Große Abflussmengen können nicht mehr vom Boden aufgenommen werden und gelangen in die Gewässer. Diffuse Einträge von Substanzen, die keiner Punktquelle zugeordnet werden können, da das Regenwasser nicht in der Kanalisation gesammelt wird, können so zunehmen. Regenwasser, welches über versiegelte Flächen abfließt und in die Kanalisation gelangt, wird über das Misch- oder Trennsystem abgeleitet und kann teilweise unbehandelt in die Gewässer gelangen. Regenereignisse, die die hydraulische Belastungsgrenze des Mischkanals überschreiten, führen zu einem Abschlag von unbehandeltem Abwasser (Regen- und Schmutzwasser) in die Gewässer. Bei Trennsystemen gelangt das Regenwasser häufig unbehandelt in die Gewässer. Eine steigende Flächenversiegelung erhöht Einträge weiter, da weniger Regenwasser vor Ort versickern kann. Während des

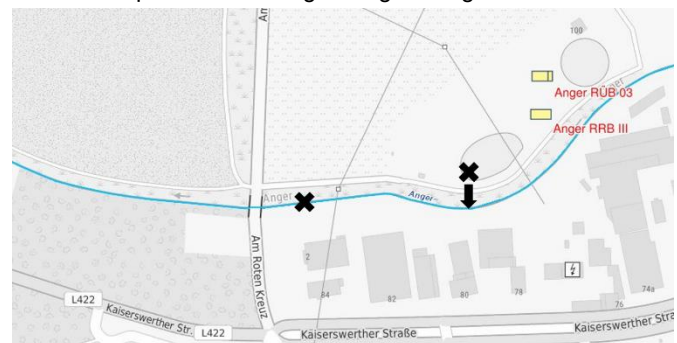
Abflusses werden Substanzen aus unterschiedlichsten Stoffgruppen vom Regenwasser gelöst bzw. ausgewaschen. Um welche Stoffe es sich handelt hängt von Art, Nutzung und Lage der Abflussfläche ab [4].

Belastungen aus dem Regenwasser wurden bisher hauptsächlich per instrumenteller Einzelstoffanalytik untersucht [4, 5]. Beschreibungen von Wirkungen, wie z.B. in Neale et al. [6], bilden eher Ausnahmen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb hormonelle Wirkungen zu bestimmen, die ihren Ursprung im Regenwasserabfluss haben. Dabei wurden mögliche effectverursachende Einträge aus dem Abfluss eines Regenüberlaufes (RÜB) untersucht. Die Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) wurde mit einem transgenen Multi-Effekt Reportergerassay (yeast multi endocrine-effect screen, YMEES) zur gleichzeitigen Bestimmung von estrogenen, androgenen und gestagenen Wirkungen gekoppelt. Mit einer begleitenden Target-Analytik von Estrogenen wurden mögliche estrogenere Effektverursacher bestimmt und eine weitreichendere Charakterisierung der festgestellten endokrinen Belastungen erreicht.

Material und Methoden

Probenahme

Proben wurden im Ablauf eines RÜB mit angeschlossenem Regenrückhaltebecken (RRB) mit einer Anschlussfläche von ca. 1,6 km² und unterhalb der Einleitungsstelle im Gewässer während eines Regenereignisses genommen. Das RÜB hat zu diesem Zeitpunkt in die „Anger“ abgeschlagen.



© Copyright 2013-2021 Landesbetrieb Information und Technik Nordrhein-Westfalen (IT.NRW)

Abbildung 1: Probenahmestellen im Ablauf eines RÜB mit angeschlossenem RRB (schwarzes Kreuz und Pfeil) und unterhalb des Ablaufs in die „Anger“ (schwarzes Kreuz).

HPTLC und YMEES

Die Proben wurden innerhalb von 48 h nach der Probenahme mittels Festphasenextraktion (SPE) angereichert. Die Kartuschen (150 mg, Oasis HLB 6cc, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) wurden mit Methanol (2 x 5 mL) konditioniert und mit Wasser (2 x 5 mL) äquilibriert, bevor sie mit den Proben beladen wurden. Nach Trocknung der Kartuschen unter Vakuum wurden diese mit Methanol (5 x 5 mL) eluiert und die Extrakte anschließend bei 50 °C unter einem leichten Stickstoffstrom vollständig verdampft. Die trockenen Extrakte wurden in 1 mL Methanol gelöst. Als stationäre Phase wurden SIL G-25 Platten (Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet. Die automatische Probenauftragung und Entwicklung der HPTLC-Platten erfolgte mit dem Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4) und dem Automated Multiple Development 2 (AMD 2) von CAMAG (Muttenz, Schweiz). Konkrete HPTLC Einstellungen, der Entwicklungsprozess mit Cyclohexan, Dichlormethan und Aceton und Angaben zum YMEES Prozess sind bereits in unserer vorherigen Studie beschrieben [7]. Der YMEES wurde mit einer Mischung aus drei transgenen *Arxula adenivorans* Hefestämmen (new_diagnostics GmbH, Dresden) durchgeführt, die bei der Anwesenheit eines hormonell aktiven Stoffes entweder das DsRed2 protein (estrogen), green fluorescent protein (GFP, androgen) oder cyan fluorescent protein (CFP, gestagen) bilden. Die Hefesuspension wurde mit einer Airbrushpistole aufgetragen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem TLC Scanner 3 von CAMAG mit folgenden Wellenlängen/Filtern: 405/K500 nm (CFP), 475/K500 nm (GFP) und 542/K560 (DsRED2).

GC-MS/MS Estrogene

Zur Bestimmung von Estron (E1), 17 α -Estradiol (α -E2), 17 β -Estradiol (β -E2), 17 α -Ethinylestradiol (EE2) und Estriol (E3) wurde eine GC-MS/MS Methode verwendet, die es ermöglicht, die geforderten Nachweisgrenzen der WRRL (0,4 ng/L für 17 β -E2 und 0,035 ng/L für EE2) zu erreichen. Den Proben wurden 1 ng E1-D4, β -E2-D3 and EE2-D4 als interne Standards zugeben. Danach wurde je 1 Liter Probe auf BAKERBOND Speeddisk (C18, 50mm, Avantor, Center Valley, USA) SPE-Kartuschen gegeben, die zuvor mit 10 mL Methanol konditioniert und mit 10 mL LC-MS Wasser equilibriert wurden. Die Kartuschen wurden für 20 min getrocknet. Zur Elution wurden die Speeddisk Kartuschen zur weiteren Extraktreinigung auf Silica-Kartuschen (SiOH, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) gesteckt, die zuvor im Ofen bei 80°C aktiviert wurden. Für die Elution wurden jeweils 25 mL Ethylacetat:Hexan (50:50, v:v) verwendet. Die Extrakte wurden unter einem leichten Stickstoffstrom bei 60 °C abgedampft und die Rückstände mit 50 μ L Pyridin und 50 μ L BSTFA:TMF (99:1, v:v) bei 70 °C für 30 min derivatisiert. Die Kalibration wurde ebenfalls in Ethylacetat:Hexan (50:50, v:v) angesetzt und in der gleichen Weise derivatisiert. Die Analytik wurde mit einem TQ8040 GC-MS/MS System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) durchgeführt. Die Injektion von 3 μ L erfolgte splitlos bei 270 °C. Zur Trennung der Analyten wurde eine Zebron ZB-

5MSi Capillary GC Column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Phenomenex, Torrance, USA) und ein passendes Temperaturprogramm mit einer Maximaltemperatur von 315 °C verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Das im Abfluss des RÜB detektierte Muster aus estrogenen, androgenen und gestagenen Effekten mit R_F -Werten zwischen 0,46 und 0,63 lässt sich auch in der Gewässerprobe unterhalb des RÜB in der Anger wiederfinden (Tab. 1). Die Peakflächen sind dabei in etwa halb so groß wie in der RÜB Probe. Dies lässt sich durch Verdünnungseffekte im Gewässer und dem hohen Durchfluss bei Regenwetter erklären. Das sich wiederholende Effektmuster verdeutlicht den Einfluss des RÜB auf die hormonelle Belastung der Anger. Eine mögliche Zuordnung der gemessenen Effekte zu den verwendeten Standards konnte mit einer maximalen Abweichung der R_F -Werte von 0,05 gezeigt werden. Die Abweichung kann entweder auf unbekannte effektverursachende Stoffe oder eine matrixbedingte Verschiebung hindeuten. In beiden Proben wurden Konzentrationen für α - und β -E2 mit GC-MS/MS ermittelt (Tab. 2). Aufgrund der hohen Affinität zum Estrogenrezeptor ist es wahrscheinlich, dass auch von E2 verursachte Effekte mit dem YMEES nachgewiesen und die in beiden Proben gemessenen estrogenen Effekte (R_F : 0,46 und 0,47) von α - oder β -E2 (R_F : 0,42 bzw. 0,44) verursacht wurden.

Zusätzlich wurden in der RÜB Probe ein estrogenen Effekt (R_F : 0,11) im Bereich von E3 (R_F : 0,13) und ein estrogenen Effekt (R_F : 0,66) mit einer längeren Laufstrecke als E1 (R_F : 0,61) gefunden. Auch hier könnte eine matrixbedingte Verschiebung stattgefunden haben oder es könnten, insbesondere im Fall des zweiten Effekts, unbekannte Substanzen verantwortlich sein. Mit der GC-MS/MS Analytik wurden E1 und E3 in beiden Proben identifiziert. Die Konzentrationen waren in der Flussprobe um mehr als 75% niedriger als im Ablauf des RÜB, was wie zuvor beschrieben auf Verdünnungseffekte während des Regenereignisses hindeutet. Aufgrund des im Vergleich zu E2 geringeren Potentials von E1 und E3 an den Estrogenrezeptor zu binden, konnten in der Flussprobe keine Effekte im Bereich dieser Hormone mit dem YMEES detektiert werden. EE2 wurde zwar in der RÜB Probe mit der instrumentellen Methode detektiert, es konnte aber kein Effekt abgeleitet werden. Die detektierten androgenen Effekte in beiden Proben (R_F : 0,53 und 0,52) haben zwar eine identische Laufstrecke wie EE2 (R_F : 0,53), wurden aber aufgrund der unterschiedlichen Detektionswellenlängen mit dem YMEES eindeutig einer androgenen Wirkung zugeordnet.

Tab. 1: Mittels HPTLC-YMEES ermittelte endokrine Effekte im Ablauf eines Regenüberlaufbeckens (RÜB) und in der Anger unterhalb des RÜB. Angegeben ist die jeweilige endokrine Wirkung, der mittlere Retardationsfaktor (R_f) \pm Standardabweichung (SA) der entsprechenden Bande auf der DC-Platte, die mittlere Intensität der Effektpeaks (AU) \pm SA ($n = 4$). Zusätzlich sind die als Positivkontrolle verwendeten Referenzsubstanzen Estron (E1), 17 β -Estradiol (β -E2), 17 α -Estradiol (α -E2), Dihydrotestosteron (DHT), 17 α -Ethinylestradiol (EE2), Progesteron (P4) und Estriol (E3) angegeben ($n = 6$; α -E2: $n = 2$). Das in beiden Proben vergleichbare Effektmuster ist grau hinterlegt.

Proben	Wirkung	R_f	Intensität (AU)
E3	Estrogen	0,13 \pm 0,02	9400 \pm 1500
β -E2	Estrogen	0,42 \pm 0,03	8000 \pm 900
α -E2	Estrogen	0,44 \pm 0,02	1600 \pm 42
DHT	Androgen	0,47 \pm 0,03	4100 \pm 280
EE2	Estrogen	0,53 \pm 0,02	6200 \pm 1400
P4	Gestagen	0,60 \pm 0,02	3300 \pm 530
E1	Estrogen	0,61 \pm 0,02	5100 \pm 1200
Ablauf RÜB	Estrogen	0,11 \pm 0,01	4700 \pm 480
	Estrogen	0,36 \pm 0,03	1200 \pm 290
	Estrogen	0,46 \pm 0,02	9700 \pm 1200
	Androgen	0,53 \pm 0,02	2900 \pm 730
	Gestagen	0,63 \pm 0,01	3200 \pm 270
	Estrogen	0,66 \pm 0,01	1600 \pm 290
Anger	Estrogen	0,47 \pm 0,02	5300 \pm 760
	Androgen	0,52 \pm 0,02	1300 \pm 95
	Gestagen	0,63 \pm 0,01	1600 \pm 500

Tab. 2: Mit GC-MS/MS ermittelte Konzentrationen in ng/L \pm Vertrauensbereich ($P = 95\%$) von Estron (E1), 17 α -Estradiol (17 α -E2), 17 β -Estradiol (17 β -E2), 17 α -Ethinylestradiol (EE2) und Estriol (E3) in der Probe aus dem Ablauf des RÜB und unterhalb des Ablaufs in der Anger. Die Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) der Methode sind ebenfalls angegeben.

Proben	E1	17 α -E2	17 β -E2	EE2	E3
RÜB	2,0 \pm 0,2	0,41 \pm 0,06	1,1 \pm 0,1	0,56 \pm 0,24	2,7 \pm 0,2
Anger	0,47 \pm 0,17	0,09 \pm 0,06	0,16 \pm 0,07	< 0,3*	0,57 \pm 0,15
NWG	0,002	0,003	0,002	0,002	0,001
BG	0,006	0,009	0,005	0,006	0,003

*Probenspezifische NWG (3-faches Rauschen). Aufgrund von Matrixstörungen konnte die NWG der Methode für EE2 in der Probe nicht erreicht und keine Konzentrationen ermittelt werden.

Die hormonellen Belastungen aus dem RÜB haben ihren Ursprung wahrscheinlich zu einem überwiegenden Teil im Schmutzwasseranteil des Abwassers. Studien haben gezeigt, dass die Behandlung in einer Kläranlage, sei es mit oder ohne erweiterter Behandlungsstufe, eine Reduktion von Hormonen und hormonellen Aktivitäten zur Folge hat [8-10]. Da es sich im Mischkanal und letztlich im Ablauf des RÜB um rohes unbehandeltes Abwasser handelt, sind auch höhere Hormonkonzentrationen und dementsprechend stärkere Effekte als im Ablauf einer Kläranlage zu erwarten. Phillips et al. [11] haben bereits gezeigt, dass ein RÜB einen großen Anteil an der Hormonbelastung auch im Vergleich zu einer Kläranlage haben kann. Die hier gezeigte Kombination von HPTLC-YMEES mit einer GC-MS/MS Target-Analytik ermöglicht eine umfassendere Charakterisierung hormoneller Belastungen in Wasserproben als eine reine Einzelstoff- oder wirkungsbezogene Analytik. Die Methoden liefern Daten zu mehreren Wirkungen und Einzelsubstanzen, wobei eine eindeutigere Zuordnung detektierter Wirkungen zu bekannten Hormonen durch die Extraktion aktiver Banden von der HPTLC-Platte und einer anschließenden instrumentellen Target-Analytik erreicht

werden könnte. Neben einer meist sehr aufwendigen Effektdirigierten Analytik (EDA) mit hochauflösenden Methoden zur Bestimmung von unbekanntem Effektverursachern, kann auch die Verwendung von WBA in Verbindung mit HPTLC und einer begleitenden instrumentellen Analytik zur Identifizierung von Belastungsquellen und dem Monitoring in Fließgewässern eingesetzt werden.

Literatur

- Rogowska J. et al. Micropollutants in treated wastewater. *Ambio* 2020; 49(2): 487-503. doi: 10.1007/s13280-019-01219-5.
- IPCC. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Barros V.R. et al. (eds.). Cambridge, UK, and New York, NY, USA: Cambridge University Press; 2014.
- IPCC. Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the

- Intergovernmental Panel on Climate Change. Field C.B. et al. (eds.). Cambridge, UK, and New York, NY, USA: Cambridge University Press; 2012.
4. Wicke D. et al. Micropollutants in urban stormwater runoff of different land uses. *Water* 2021; 13(9). doi: 10.3390/w13091312.
 5. Masoner J.R. et al. Urban stormwater: An overlooked pathway of extensive mixed contaminants to surface and groundwaters in the United States. *Environ. Sci. Technol.* 2019; 53: 10070-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.9b02867>.
 6. Neale P.A. et al. Assessing the mixture effects in in vitro bioassays of chemicals occurring in small agricultural streams during rain events. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54(13): 8280-90. doi: 10.1021/acs.est.0c02235.
 7. Baetz N. et al. High-performance thin-layer chromatography in combination with a yeast-based multi-effect bioassay to determine endocrine effects in environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2021; 413(5): 1321-35. doi: 10.1007/s00216-020-03095-5.
 8. Janex-Habibi M.L. et al. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. *Water Res.* 2009; 43(6): 1565-76. doi: 10.1016/j.watres.2008.12.051.
 9. Itzel F. et al. Evaluation of a biological post-treatment after full-scale ozonation at a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 2020; 170:115316. doi: 10.1016/j.watres.2019.115316.
 10. Gehrman L. et al. (Anti-)estrogenic and (anti-)androgenic effects in wastewater during advanced treatment: comparison of three in vitro bioassays. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25(5): 4094-104. doi: 10.1007/s11356-016-7165-4.
 11. Phillips P.J. et al. Combined sewer overflows: an environmental source of hormones and wastewater micropollutants. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46(10): 5336-43. doi: 10.1021/es3001294.

Danksagung

Wir danken dem Ministerium für Kultur und Wissenschaft (MKW NRW, Düsseldorf) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs Future Water.

Korrespondenzadresse

Nicolai Bätz, M.Sc.
Institut für Energie- und Umwelttechnik
e.V. (IUTA)
Bliersheimer Str. 58 - 60
47229 Duisburg
Tel: +49 (0) 2065 418 - 179
E-Mail: baetz@iuta.de