

Pilothafte Anwendung einer *in-vitro*-Biotestbatterie für ein effektbasiertes Monitoring in ausgewählten niedersächsischen Oberflächengewässern

Dirk Jungmann (Dirk.Jungmann@tu-dresden.de)^{1,3}, Stephanie Graumnitz (Stephanie.Graumnitz@tu-dresden.de)¹, Tanja Lieke (Tanja.lieke@nlwkn.niedersachsen.de)², Jessica M. Rosolowski (Jessica.Rosolowski@tierschutzakademie.de)¹, Sara Schubert (Sara.Schubert@tu-dresden.de)³ und Mario Schaffer (Mario.Schaffer@nlwkn.niedersachsen.de)²

¹: GTW-TUD GmbH, Dresden

²: NLWKN Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (Betriebsstelle Hannover-Hildesheim)

³: Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden

Zusammenfassung

Die Erfassung der Schadstoffbelastung von Oberflächengewässern wurden mit standardisierten *in-vitro* Biotests durchgeführt. Die Implementierung der *in-vitro*-Biotests in die Routine-Gewässerüberwachung wurde gemeinsam mit dem NLWKN (Betriebsstelle Hannover-Hildesheim) geprüft. Es wurden an insgesamt 40 Oberflächengewässer-Messstellen Wasserproben entnommen und mit 10 *in-vitro* Biotests auf eine Belastung getestet. Einzig die Probenahmestelle Hasselbach Holzminden war in keinem der angewandten Biotests auffällig, während 5 Probenahmestellen eine hohe Belastung mit endokrin wirksamen Substanzen, 17 Probenahmestellen ein Dioxin-ähnliches und zwei Probenahmestellen genotoxische Potentiale zeigten. Es konnte gezeigt werden, dass *In-vitro*-Biotests aufgrund der summarischen Erfassung der Belastung mit Substanzen bestimmte Wirkmechanismen eine sinnvolle Ergänzung zur chemischen Analyse darstellen.

Einleitung

Biotests werden schon lange zur Prüfung der Schadstoffbelastung von Oberflächengewässern und Abwässern aus Kläranlagen eingesetzt. Bei den standardisierten Biotests, die im Labor durchgeführt werden, wird zwischen *in-vivo* und *in-vitro*-Biotests unterschieden.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Anwendung von *in-vitro*-Biotests für Oberflächengewässerproben, bei denen Kulturen von einzelnen, teilweise modifizierten Zellen eingesetzt werden. Mit diesen Tests lassen sich spezielle toxische Mechanismen bestimmter Substanzklassen auf Zell/Rezeptor-Ebene nachweisen. Als Beispiel ist hier der Nachweis östrogenaktiver Substanzen mit dem hefezellbasierten Östrogentest (Yeast Estrogen Screen, YES) zu nennen.

Die Implementierung von *in-vivo* und *in-vitro*-Biotests in der Gewässerüberwachung, die auch als effektbasierte Methoden bezeichnet werden, wird u. a. im Rahmen der Novellierung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie gefordert (Brack et al., 2019; Water Framework Directive. Report Mandate 2016-2018). Hintergrund ist unter anderem die Vielzahl umweltrelevanter Chemikalien sowie Stoffgemische, die die Wasserqualität potentiell negativ beeinflussen und die durch die bisherigen chemischen Analysen nach WRRL in ihrer Komplexität

nicht erfasst werden. *In-vitro*-Biotests können, aufgrund der summarischen Erfassung der Belastung von Gewässern mit Substanzen mit bestimmten Wirkmechanismen, eine sinnvolle Ergänzung zur chemischen Analyse darstellen.

Die Biotests ermöglichen die Untersuchung und Bewertung von Stoffgemischen, deren Zusammensetzung unbekannt ist und erfassen darüber hinaus auch additive, synergistische oder antagonistische Effekte verschiedener Substanzen in einer Probe. Weiterhin erfassen *in-vitro*-Biotests Effekte von Substanzen, für welche ein Nachweis durch chemische Analytik besonders schwierig ist oder von unbekanntem Transformationsprodukten, die innerhalb eines Prozesses entstehen. Ziel dieses Pilotprojektes war die Untersuchung der Eignung von *in-vitro*-Biotests für ein effektbasiertes Monitoring als Ergänzung der regulären Überwachungsprogramme der Oberflächengewässer nach WRRL. Die *in-vitro*-Biotests wurden parallel zum Routinemonitoringprogramm des Niedersächsischen Landesbetriebes für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN) mit Extrakten von Wasserproben, die aus Oberflächengewässern des Südens bzw. der Mitte Niedersachsens (Raum Hannover) stammen, durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Untersuchung sollten mögliche Belastungen der Oberflächengewässer mit Substanzen, die eine hormonelle, mutagene oder genotoxische Wirkung haben, identifiziert werden. Zudem sollte aus den Ergebnissen das relative Belastungsniveau verglichen und eine Empfehlung von Messstellen für eine weitere fokussierte chemische Analyse abgeleitet werden.

Probenahme

Die untersuchten Gewässerproben wurden zweimalig an 40 Oberflächengewässer-Messstellen entnommen. Die Probenahmen erfolgten im August 2020 (warme Jahreszeit) sowie im März 2021 (kalte Jahreszeit). Für die Probenahme wurden Braunglasflaschen verwendet, die zuvor mehrfach mit technischem Aceton (analytical grade, > 99,8 %, Carl Roth GmbH) gespült und danach getrocknet wurden. Die Schöpfproben wurden von der Probenahme bis zur Weiterverarbeitung bei max. 7°C in Kühlboxen transportiert bzw. gelagert.

Anreicherung der Wasserproben mittels Festphasenextraktion

Nach Eingang in das Labor wurden die Proben innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Materialien, die während der Filtration und Extraktion in direktem Kontakt mit der Probe standen, bestanden ausschließlich aus mit Lösemittel und Reinstwasser gespültem Teflon™ (PTFE), Glas, Edelstahl oder Keramik.

Es wurde jeweils 1 L der Probe mittels Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH) über einen Glasfaserfilter (< 0,7 µm; 90 mm Durchmesser; Sartorius) mit Hilfe einer Witt'schen Unterdruck Apparatur filtriert. Die filtrierte Probe wurde im Anschluss mittels Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) angereichert. Die SPE-Kartuschen (HLB 200 mg; Waters Oasis) wurden auf einen Unterdruck-Manifold (Macherey-Nagel GmbH) fixiert und bei leichtem Unterdruck (max 800 mbar) mit jeweils 5 ml Aceton und Methanol (beide analytical grade, > 99,8 %, Carl Roth GmbH) sowie Reinstwasser (ultrapure water, autoklaviert) beschickt und dadurch konditioniert. Die SPE-Kartuschen wurden mit der filtrierten Gewässerprobe aus Flaschen (2 L, Schott AG) mittels eines Verbindungsschlauchs (PTFE, Macherey-Nagel GmbH) beladen (6 – 8 mL/min). Die beladenen Kartuschen wurden anschließend im Luftstrom getrocknet und bei -20 °C gelagert.

Die Elution der SPE-Kartuschen erfolgte mit jeweils 2 ml Aceton und Methanol in Auffanggefäße aus Glas. Anschließend wurden die Eluate im Stickstoffstrom (Reinheit 5.0) auf 300 µl eingengt, zur vollständigen Trocknung im Stickstoffstrom in Glasvials (1,5 mL, VWR) überführt und anschließend in 100 µl DMSO (analytical grade, > 99,8 %, Carl Roth GmbH) wieder aufgenommen. Somit erfolgte eine Anreicherung der Gewässerproben mit einem Faktor von 10.000. Die gewonnenen Extrakte wurden bei -20 °C in Glasvials (1,5 mL, VWR) gelagert.

Angewendete in-vitro Biotests

In Tabelle 1 sind die in-vitro Biotests aufgelistet, die für die Analyse der Gewässerproben eingesetzt wurden, sowie die jeweiligen Wirkpotentiale, die mit ihnen erfasst werden und Beispiele für Substanzen, welche diese Potentiale auslösen. Die eingesetzten Hefereportergergen-Tests wurden in Anlehnung an die ISO 19040-1 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass während der Exposition die Kulturen geschüttelt wurden (Heidolph Inkubator 1000, Schwabach, Deutschland). Sie erfassen östrogenes (YES, Yeast Estrogen Screen), anti-östrogenes (YAES, Yeast Anti Estrogen Screen), androgenes (YAS, Yeast Androgen Screen), anti-androgenes (YAAS, Yeast Anti-Androgen Screen) und dioxinähnliches (YDS, Yeast Dioxin-like Screen) Potential. Weiterhin wurde der Ames-Test (Bacterial Reverse Mutation Test; OECD 471, ISO/CD 11350:2012) zur Erfassung von mutagenem Potential eingesetzt. Alle Zelllinien wurden ursprünglich von der Goethe-Universität Frankfurt, Abteilung Aquatische Ökotoxikologie, zur Verfügung gestellt.

Zur Erfassung mutagener Substanzen werden die in der Festphasenextraktion aufgereinigten Extrakte der Oberflächen-gewässerproben in den Ames-Tests eingesetzt. In diesem in vitro-Biotest werden sogenannte Histidin-Mangelmutanten des gentechnisch veränderten Bakteriums *Salmonella typhimurium* verwendet. Zur Beurteilung der Mutagenität wurde der Stamm TA98 verwendet, welcher eine Rasterschubmutation nachweist, sowie der Stamm TA100, welcher eine Basenpaarsubstitution nachweist. Diese Mangelmutanten zeigen in Anwesenheit mutagen wirkender Substanzen gehäuft Rückmutationen, welche über einen Farbumschlag von lila zu gelb und die Messung der optischen Dichte bei 420 nm nach 48 Stunden Inkubation angezeigt werden.

Im Mikrokern-Test (in-vitro Mammalian Cell Micronucleus Test; OECD 487, ISO 21427-2:2006) wurden humane Leberkarzinomzellen (HepG2 von der DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Tissues; hier wird auch die Kultivierung beschrieben) zur Erfassung von gentoxischem Potential genutzt, welches anhand einer Schädigung von Chromosomen oder des Spindelapparates nachgewiesen wird. Der Mitoseindex bzw. die Zellteilung kann als Qualitätsparameter für die Durchführung des Tests herangezogen werden. Wenn die Ergebnisse des Tests nicht auswertbar waren (zu wenig zählbare Zellen) oder die Validitätskriterien bei positiven Befunden nicht erfüllt wurden, wurde dies entsprechend kenntlich gemacht.

Die Untersuchungen auf gentoxisches Potential mit dem Umu-Test erfolgten nach DIN 38415-3:1996. Eingesetzt wurde der Stamm TA 1535/pSK 1002 des Bakteriums *Salmonella typhimurium* (DSMZ).

Validitätskriterien

Wichtiges Validitätskriterium für alle in Tabelle 1 gelisteten Biotests ist ein optimales Wachstum der Zellen im Test. Wird dieses nicht erreicht, gilt die Probe als zytotoxisch bzw. wachstumshemmend. Als zytotoxisch wurden Proben eingestuft, wenn das Zellwachstum im Mittel deutlich unter 80% des Zellwachstums der Negativkontrolle lag. In solchen Fällen kann die Probe nach Verdünnung erneut getestet werden. Dies führt jedoch dazu, dass die in der Probe enthaltenen endokrin wirksamen, mutagenen oder gentoxischen Substanzen verdünnt werden und damit möglicherweise die Wirkschwelle des Tests nicht mehr erreicht wird. Eine Vergleichbarkeit ist grundsätzlich nur zwischen Proben der gleichen Verdünnungsstufe möglich. Die im Test erreichten finalen Verdünnungsstufen und Anreicherungs-faktoren sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der für die Messkampagne angewendeten in vitro Biotests mit jeweiligem summarischen Wirkpotential zum Nachweis von endokrinem, mutagenem und genotoxischem Potential sowie Beispiele für Substanzen, deren Effekte mit den Tests erfasst werden können

Biotest	Organismus	Summarisches Wirkpotential	Substanzbeispiele
Hefereportergergen-Test ISO 19040-1 (YES)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Östrogenes Potential (YES)	E2, EE2, E1, E3, BPA, DEHP, 4-NP, OP, HCH, 2,3,7,8-TCDD, DDT, Isoflavone, Phthalate, PCBs
		Anti-östrogenes Potential (YAES)	4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), HCH, 2,3,7,8-TCDD, Isoflavone
		Androgenes Potential (YAS)	Testosteron, Trenbolon, Hexachlorbenzol, TBT
		Anti-androgenes Potential (YAAS)	Flutamid, HCB, p,p'-DDE, DDT, DEHP
		Dioxinähnliches Potential (YDS)	β-Naphthoflavin, B(a)P, Hexachlorbenzol
Ames-Test OECD 471, ISO/CD 11350:2012	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Rasterschubmutation (TA98)	PAKs wie 2-Nitrofluoren, Phenole, Schwermetalle, 2-Aminoanthracen
		Basenpaarsubstitution (TA100)	PAKs, Phenole, Schwermetalle, Natriumazid, 2-Aminoanthracen
Mikrokern-Test OECD 487, ISO 21427-2:2006	HepG2 (humane Leberkarzinomzellen)	Gentoxizität (Chromosomenschäden, Schäden am Spindelapparat)	Benzo(a)pyren, andere PAKs, Mitomycin C (Antibiotikum, Zytostatikum), andere Zytostatika
Umu-Test DIN 38415-3:1996	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Gentoxizität (u.a. Punktmutation, Rasterschubmutation, Strangbruch)	2-Aminoanthracen, Nitrochinolin-1-oxid, Benzo(a)pyren, andere PAKs

Die Ergebnisse der Biotests beziehen sich immer auf eine Positiv- und Negativkontrolle. Die Ableitung der Äquivalentkonzentrationen erfolgte durch die Verrechnung der in Tabelle 2 erwähnten Anreicherungsfaktoren mit den Werten aus den sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, die mit den jeweiligen Referenzsubstanzen der Positivkontrolle erstellt wurden. Aus der Negativkontrolle (NK) wird das Limit of Quantification (LOQ) berechnet. Dafür wird in jedem Testansatz testspezifisch die dreifache Standardabweichung ermittelt und zum Mittelwert der Fluoreszenz der Negativkontrolle addiert [LOQ = Mittelwert Fluoreszenz NK + (3 x Standardabweichung der Fluoreszenz der NK)].

Tabelle 2: Berechnung des finalen Anreicherungsfaktors der Proben in den Biotests unter Verrechnung der Anreicherung mittels Festphasenextraktion mit der spezifischen testbedingten Verdünnung der Extrakte. (V1 – V3: Verdünnungsstufen)

Matrix	Anreicherung SPE	Biotest	Verdünnung im Test	Finale Anreicherung
Gewässer	10.000	Hefereportergergen-Test	1:480	20,8-fach
		Ames-Test	1:250	40,0-fach
		Mikrokern-Test	1:1.000 (V1)	10,0-fach
			1:2.000 (V2)	5,0-fach
			1:4.000 (V3)	2,5-fach
		Umu-Test	1:500	20,0-fach
1:1.000	10,0-fach			

Als Positivkontrolle für diesen Hefereportergergen-Test wurde die Substanz 17β-Östradiol (E2; CAS: 50-28-2; > 99% Reinheit;

Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. Im Ames-Test mit dem Stamm TA100 wurde die Positivkontrolle Nitrofurantoin (NF; Antibiotikum; CAS 67-20-9; Sigma Aldrich PHR1191) verwendet. Für den Stamm TA98 wurde als Positivkontrolle 4-Nitro-Phenylendiamin (4-NOPD, CAS 99-56-9, Reinheit 98%, Sigma Aldrich) verwendet. Als Positivkontrolle wurde Ethylmethansulfonat (EMS, CAS 62-50-0 Merck) verwendet.

Ergebnisse

Bestimmung der Äquivalentkonzentration in den Hefe-Tests

Zur Erfassung endokrin wirksamer Substanzen werden die in der Festphasenextraktion aufgereinigten Extrakte der Gewässerproben in die Hefereportergergen-Tests eingesetzt.

Die Bestimmung der Äquivalentkonzentration wurde in jedem Hefe-Test mit der jeweiligen Referenzsubstanz für die Positivkontrolle aus der Konzentrations-Wirkungs-Aktivität erfasst. In Abbildung 1 ist das Ergebnis für den YES-Test dargestellt. Mit 17β-Östradiol (E2) als Positivkontrolle im YES-Test zeigt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, an den eine nicht-lineare Regression (4-Parameter Hill Funktion) angepasst wurde. Mit Hilfe dieser Funktion kann aus der Stärke des Fluoreszenzsignals einer Probe eine 17β-Östradiol-äquivalente Konzentration berechnet werden. Diese muss mit den in Tabelle 2 dargestellten Verdünnungsfaktoren dem Volumen der Originalprobe angepasst werden. Die Berechnung der Standardkurven der Referenzsubstanzen erfolgte mittels nicht-linearer Regres-

sion (4-Parameter Hill Funktion). Aus diesen Kurven wurden anschließend die Äquivalentkonzentrationen abgeleitet.

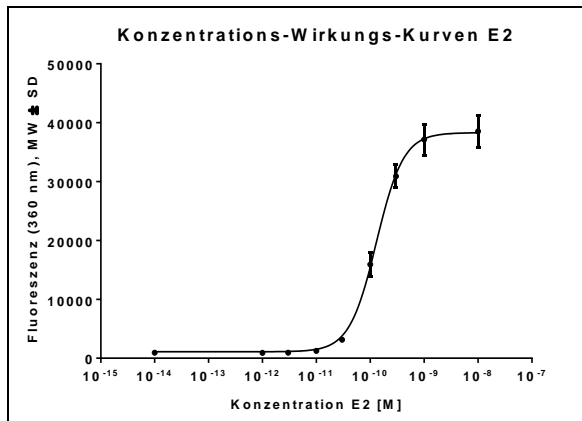


Abb. 1: Sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Positivkontrolle 17β-Östradiol (E2) zum Nachweis von östrogenem Potential im YES-Test; Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

Die Ableitung der Äquivalentkonzentrationen sowie die Verrechnung des Anreicherungsfaktors der extrahierten Proben wird auf internationaler Ebene kritisch diskutiert (Könemann et al. 2018, Kunz et al. 2017, Völker et al. 2016). Ein entsprechender ISO-Standard ist derzeit in Vorbereitung zur Veröffentlichung. Die Verrechnung der abgeleiteten Äquivalentkonzentrationen erfolgte für die vorliegende Studie mittels Division durch den finalen Anreicherungsfaktor von 20,8 (Tabelle 2). Die ermittelten Äquivalentkonzentrationen wurden im vorliegenden Bericht als erhöht eingestuft, wenn die mittlere Äquivalentkonzentration größer als das 3-fache des jeweiligen LOQ-Wertes war.

Ergebnisse aus den Hefe-Reporter-Assays

Östrogene Wirkpotentiale (YES-Test)

Die Ergebnisse für das östrogene Potential in den Extrakten der Gewässerproben sind in Abbildung 2 und Abbildung 3 detailliert dargestellt. In 9 der Gewässerproben der Probenahme im Sommer 2020 (Abbildung 3) war das östrogene Potential unterhalb der LOQ. Für 30 Gewässerproben wurde ein moderates östrogenes Potential von 0,07 bis 0,2 ng E-EQ/L festgestellt. Ein erhöhtes östrogenes Potential von > 0,2 ng E-EQ/L wurde in einer Gewässerprobe nachgewiesen.

Für die Gewässerproben der Probenahme im Frühjahr 2021 (Abbildung 4) wurden im Vergleich zu den Gewässerproben aus dem Sommer 2020 insgesamt jeweils ein höheres östrogenes Potential nachgewiesen. Unterhalb des LOQ waren 8 Gewässerproben. Ein erhöhtes östrogenes Potential >0,8 ng E-EQ/L wurde für die 3 Gewässerproben nachgewiesen. Für die weiteren 29 Gewässerproben wurde ein moderates östrogenes Potential festgestellt.

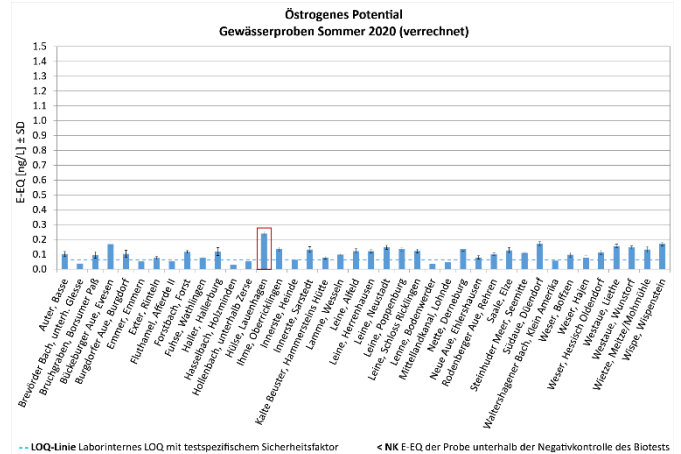


Abb. 2: Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahme Kampagne Sommer 2020 im YES-Test, dargestellt als MW±SD der 17β-Östradiol Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (> 3*LOQ) Äquivalentkonzentration

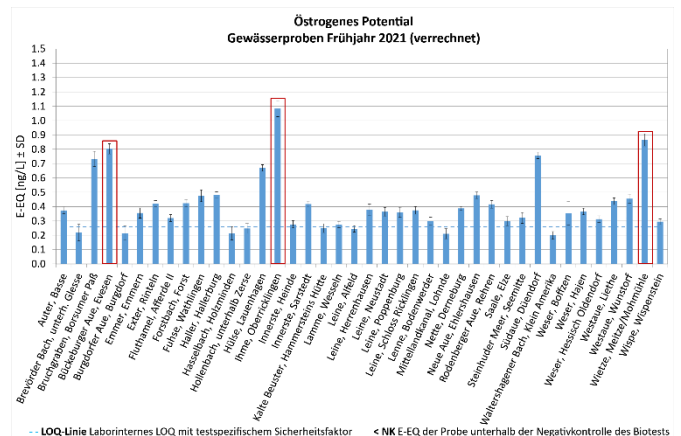


Abb. 3: Östrogenes Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahme Kampagne Frühjahr 2021 im YES-Test, dargestellt als MW±SD der 17β-Östradiol Äquivalente (E-EQ) unter Verrechnung des Anreicherungsfaktors (20,8-fache Anreicherung), n= 8. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter (> 3*LOQ) Äquivalentkonzentration

Weitere Hefereporte-Assays

Alle weitere Hefereporter-Assay – für Anti-östrogene Wirkpotentiale (YAES-Test), Androgene Wirkpotentiale (YAS-Test), sowie Anti-androgene Wirkpotentiale (YAAS), wurden nach dem gleichen Schema ausgewertet und sind in der zusammenfassenden Auswertung in Tabelle 5 zusammengefasst.

Dioxinähnliche Wirkpotentiale (YDS-Test)

Die Bestimmung des dioxinähnlichen Potentials (YDS – Yeast Dioxin-like Screen) der angereicherten Gewässerproben ist in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt. Die Analyse der Gewässerproben der Probenahme Kampagne im Sommer 2020 (Abbildung 4) ergab, dass das dioxinähnliche Potential unterhalb des LOQ an den 5 Messstellen waren. In 20 der untersuchten Gewässerproben wurde ein moderates dioxinähnliches Potential von 0,15 bis 0,44 µg β-Naphthoflavon-EQ/L nachgewiesen. In 15 der untersuchten Gewässerproben wurde

ein erhöhtes dioxinähnliches Potential von $>0,44 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ festgestellt. Das höchste nachgewiesene dioxinähnliche Potential in diesem Monitoring zeigte dabei die Gewässerprobe Bruchgraben (Borsumer Paß) mit $1,19 \pm 0,18 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$.

und in den übrigen Hefetests hinsichtlich der Zytotoxizität nicht auffällig waren, ist ein chemisches Monitoring hinsichtlich Substanzen, die eine dioxinähnliche Wirkung haben, hier empfehlenswert.

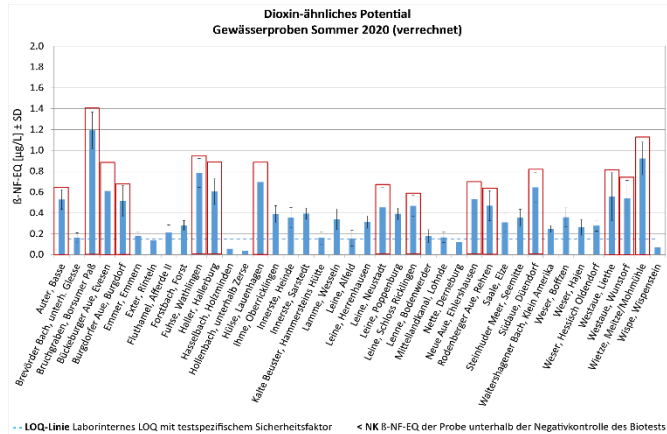


Abb 4: Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Sommer 2020 im YDS-Test, dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der β -Naphthoflavin-Äquivalente ($\beta\text{-NF-EQ}$) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($>3 \cdot \text{LOQ}$) Äquivalentkonzentration

Ames-Tests zur Erfassung mutagener Substanzen

Mutagenität durch Rasterschubmutationen (Ames TA98)

Die Extrakte wurden generell bei 40-facher Anreicherung getestet und auf Mutagenität geprüft. Sowohl für die Probenahme im Sommer 2020 als auch für die Probenahme im Frühjahr 2021 konnte im Ames-Test mit dem Stamm TA98 keine Mutagenität in den untersuchten Gewässerproben der verschiedenen Standorte festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt, zusammengefasst in Tabelle 5).

Dabei ist anzumerken, dass für einzelne Proben das Validitätskriterium von mindestens 25 von 48 Wells mit Revertantenzunahme bei der Positivkontrolle auch bei wiederholter Testdurchführung nicht eingehalten wurde. Aus Erfahrungswerten deuten die Ergebnisse dieser Gewässerproben aber ebenfalls nicht auf Mutagenität hin.

Mutagenität durch Basenpaarsubstitutionen (Ames TA100)

Die Extrakte für den Ames-Test mit dem Stamm TA100 wurden ebenfalls generell bei 40-facher Anreicherung getestet und auf Mutagenität geprüft. Die untersuchten Gewässerproben der Probenahme Sommer 2020 der verschiedenen Standorte zeigten in den höchsten Anreicherungsstufen keine Mutagenität. Drei Gewässerproben zeigten eine erhöhte Anzahl an Revertanten und wurden deshalb nochmals in 10-facher und 5-facher Verdünnungsstufe wiederholt gemessen. Hier zeigte sich wiederum eine erhöhte Anzahl an Revertanten für die Gewässerproben Exter (Rinteln) und Leine (Poppenburg), welche laut der OECD 471 jedoch noch nicht als mutagen eingestuft wird (Tabelle 3). Beide Proben wurden im Ames TA100 als kritisch eingeschätzt. (Ergebnisse nicht dargestellt, zusammengefasst in Tabelle 5).

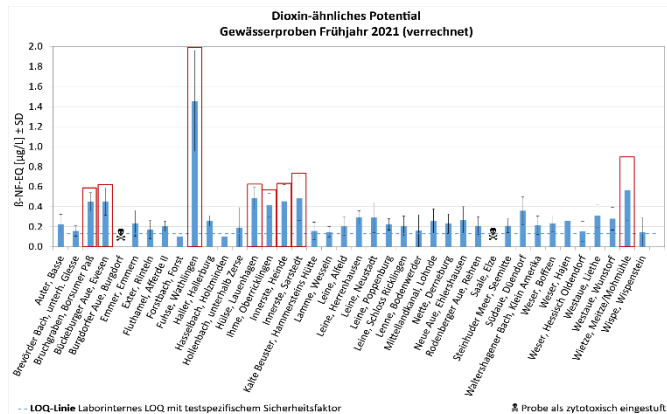


Abb 5: Dioxinähnliches Potential der untersuchten Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 in YDS-Test dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ der β -Naphthoflavin Äquivalente ($\beta\text{-NF-EQ}$) unter Verrechnung des Anreicherungs-faktors (20,8-fache Anreicherung), $n = 8$. Ein roter Rahmen entspricht einer Probe mit erhöhter ($>3 \cdot \text{LOQ}$) Äquivalentkonzentration

Auch für die Gewässerproben der Probenahme Frühjahr 2021 zeigen die Ergebnisse des Ames TA100 keine Mutagenität an. Aber auch für diese Probenahmekampagne wurden Gewässerproben, aufgrund ihrer erhöhten Anzahl an Revertanten im Vergleich zur Negativkontrolle und den übrigen Gewässerproben, als kritisch eingestuft. Dabei handelt es sich um die Gewässerproben der Messstellen Ihme (Oberrickingen), Leine (Herrenhausen), Leine (Poppenburg) und Neue Aue (Ehlershausen). Die Messstelle Leine (Poppenburg) wurde bereits für die Probenahme Sommer 2020 als kritisch eingestuft, die übrigen Messstellen waren 2020 hingegen nicht auffällig. (Ergebnisse nicht dargestellt, zusammengefasst in Tabelle 5).

Die Analyse der Gewässerproben der Probenahmekampagne Frühjahr 2021 (Abbildung 5) zeigten nur für zwei Messstellen ein dioxinähnliches Potential unterhalb des LOQ. Für 28 Messstellen konnte in den Gewässerproben ein moderates dioxinähnliches Potential zwischen $0,13$ und $0,4 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ nachgewiesen werden. Ein erhöhtes dioxinähnliches Potential von $>0,4 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ wurde in 8 Gewässerproben nachgewiesen. Zwei Gewässerproben waren nach dem oben beschriebenen Kriterium im Test zytotoxisch. Das heißt, das optimale Wachstum der im Test verwendeten Hefezellen wurde durch toxische Substanzen in den Proben gestört. Da die Proben trotz verringertem Zellwachstum ein dioxinähnliches Potential von $0,40$ bzw. $0,32 \mu\text{g } \beta\text{-NF-EQ/L}$ aufwiesen

Tabelle 3: Mutagenität entsprechend den Resultaten der Ames-Tests mit den Salmonella-Stämmen TA98 und TA100 für die je 40 Gewässerproben der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 bei 40-facher Anreicherung.

Gewässer, Messstelle	Mutagenität (Ames)					
	Sommer 2020			Frühjahr 2021		
	TA98	TA100	mutagen	TA98	TA100	mutagen
Auter, Basse	-	-	-	*	-	-
Brevörder Bach, unterhalb Glesse	-	-	-	-	-	-
Bruchgraben, Borsumer Paß	-	-	-	*	-	-
Bückerburger Aue, Evesen	-	-	-	-	-	-
Burgdorfer Aue, Burgdorf	-	-	-	-	-	-
Emmer, Emmern	-	-	-	-	-	-
Exter, Rinteln	-	kritisch	?	*	-	-
Fluthamel, Afferde II	-	-	-	-	-	-
Forstbach, Forst	-	-	-	-	-	-
Fuhse, Wathlingen	-	-	-	*	-	-
Haller, Hallerburg	-	-	-	*	-	-
Hasselbach, Holzminden	-	-	-	-	-	-
Hollenbach, unterhalb Zerse	-	-	-	*	-	-
Hülse, Lauenhagen	-	-	-	-	-	-
Ihme, Oberricklingen	-	-	-	-	kritisch	?
Innerste, Heinde	-	-	-	*	-	-
Innerste, Sarstedt	-	-	-	-	-	-
Kalte Beuster, Hammersteins Hütte	-	-	-	*	-	-
Lamme, Wesseln	-	-	-	-	-	-
Leine, Alfeld	-	-	-	-	-	-
Leine, Herrenhausen	-	-	-	-	kritisch	?
Leine, Neustadt	-	-	-	-	-	-
Leine, Poppenburg	-	kritisch	?	-	kritisch	?
Leine, Schloss Ricklingen	-	-	-	-	-	-
Lenne, Bodenwerder	-	-	-	-	-	-
Mittellandkanal, Lohnde	-	-	-	-	-	-
Nette, Derneburg	-	-	-	*	-	-
Neue Aue, Ehlershausen	-	-	-	-	kritisch	?
Rodenberger Aue, Rehren	-	-	-	*	-	-
Saale, Elze	-	-	-	*	-	-
Steinhuder Meer, Seemitte	-	-	-	*	-	-
Südaue, Düendorf	-	-	-	-	-	-
Waltershagener Bach, Klein Ameril	-	-	-	-	-	-
Weser, Boffzen	-	-	-	-	-	-
Weser, Hajen	-	-	-	-	-	-
Weser, Hessisch Oldendorf	-	-	-	*	-	-
Westaue, Liethe	-	-	-	-	-	-
Westaue, Wunstorf	-	-	-	*	-	-
Wietze, Meitze/Mohmühle	-	-	-	-	-	-
Wispe, Wispenstein	-	-	-	-	-	-

* Validitätskriterium der Positivkontrolle mit mind. 25 von 48 wells mit Revertantenwachstum nicht erfüllt.

Mikrokern-Test zur Erfassung gentoxischer Substanzen

Zur Erfassung gentoxischer Substanzen werden die in der Festphasenextraktion aufgereinigten Extrakte der Oberflächengewässerproben in den Mikrokern-Test eingesetzt. Der Mikrokern-Test erfasst Chromosomenschäden und andere Störungen während der Mitose, die durch Substanzen wie beispielsweise Benzo(a)pyren ausgelöst werden.

Entsprechend der Anreicherungsfaktoren in Tabelle 2 wurden die Gewässerproben 10-fach, 5-fach und 2,5-fach angereichert analysiert und bewertet. Die Anzahl an Mikrokernen/1000 Zellen wurde als erhöht eingestuft, wenn der Mittelwert pro Verdünnungsstufe signifikant höher im Vergleich zur Negativkontrolle (Fisher-Test, $p < 0,05$) war und der Mittelwert größer als die Spannweite der institutsinternen historischen Negativkontrollen war. Proben wurden als gentoxisch eingestuft, wenn sich auch in der höchsten Verdünnungsstufe noch eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Mikrokernen feststellen ließ. Proben wurden als kritisch eingestuft, wenn in den Verdünnungsstufen VS1 und VS2 eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen festzustellen war, nicht aber in der höchsten Ver-

dünnungsstufe VS3 oder eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen festgestellt wurde, die Bewertung aber schwierig war (z.B. aufgrund eines zu niedrigen Mitoseindex).

Die Ergebnisse des Mikrokern-Tests für die untersuchten Proben aus den Probenahmekampagnen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 sind in Tabelle 4 dargestellt. Für die Proben vom Sommer 2020, konnte, abgesehen von der Probe der Messstelle Leine (Poppenburg), keine signifikante Erhöhung mikrokernhaltiger Zellen festgestellt werden. Bei den Proben der Probenahme 2021 zeigte sich bei 10 von 40 Proben eine Erhöhung der Anzahl von Mikrokernen im Vergleich zur Negativkontrolle. Zwei dieser 10 Proben wurden als gentoxisch eingestuft: Burgdorfer Aue (Burgdorf) und Leine (Poppenburg). Auffällig ist die Messstelle Leine (Poppenburg) zudem, da hier sowohl für die Probe vom Sommer 2020 als auch für die Probe vom Frühjahr 2021 eine Erhöhung des Anteils mikrokernhaltiger Zellen festgestellt wurde.

Tabelle 4: Mikrokernrate und Bewertung der Gentoxizität (GT) mittels Mikrokern-Test in 3 Verdünnungsstufen (VS1-3) für die Gewässerproben (1-40); Anreicherungsstufe: 10-fach (VS1), 5-fach (VS2) und 2,5-fach (VS3). n.a.=Proben nicht auswertbar, *Proben mit erhöhter Anzahl von Mikrokernen, aber geringem Mitoseindex im Testansatz

Gewässer, Messstelle	Sommer 2020				Frühjahr 2021			
	Mikrokern / 1.000 Zellen			GT	Mikrokern / 1.000 Zellen			GT
	VS1	VS2	VS3		VS1	VS2	VS3	
Auter, Basse	-	-	-	-	-	n.a.	-	-
Brevörder Bach, u. Glesse	-	-	-	-	-	-	-	-
Bruchgraben, Borsumer Paß	-	-	-	-	-	-	-	-
Bückerburger Aue, Evesen	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-
Burgdorfer Aue, Burgdorf	-	-	-	-	n.a.	erhöht	erhöht	erhöht
Emmer, Emmern	-	-	-	-	-	-	-	-
Exter, Rinteln	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluthamel, Afferde II	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-
Forstbach, Forst	-	-	-	-	-	-	erhöht*	-
Fuhse, Wathlingen	-	-	-	-	-	-	-	-
Haller, Hallerburg	-	-	-	-	-	-	-	-
Hasselbach, Holzminden	-	-	-	-	-	-	-	-
Hollenbach, unterhalb Zerse	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-
Hülse, Lauenhagen	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-
Ihme, Oberricklingen	-	-	-	-	erhöht*	-	erhöht*	-
Innerste, Heinde	-	-	-	-	cytotoxisch	cytotoxisch	cytotoxisch	erhöht
Innerste, Sarstedt	-	-	-	-	erhöht	erhöht	-	erhöht
Kalte Beuster, Hamm. Hütte	-	-	-	-	erhöht	-	erhöht	-
Lamme, Wesseln	-	-	-	-	-	-	-	-
Leine, Alfeld	-	-	-	-	n.a.	-	n.a.	-
Leine, Herrenhausen	-	-	-	-	erhöht*	erhöht*	erhöht*	erhöht
Leine, Neustadt	-	-	-	-	-	-	-	-
Leine, Poppenburg	erhöht	erhöht	erhöht	erhöht	-	*erhöht	erhöht	erhöht
Leine, Schloss Ricklingen	-	-	-	-	erhöht*	-	-	-
Lenne, Bodenwerder	-	-	-	-	-	-	-	-
Mittellandkanal, Lohnde	-	-	-	-	erhöht*	erhöht*	erhöht*	erhöht
Nette, Derneburg	-	-	-	-	-	-	-	-
Neue Aue, Ehlershausen	-	-	-	-	-	-	-	-
Rodenberger Aue, Rehren	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-
Saale, Elze	-	-	-	-	-	-	-	-
Steinhuder Meer, Seemitte	-	-	-	-	-	-	-	-
Südaue, Düendorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Waltershagener Bach, Kl.Am	-	-	-	-	-	-	-	-
Weser, Boffzen	-	-	-	-	erhöht	-	-	-
Weser, Hajen	-	-	-	-	erhöht*	erhöht*	erhöht*	erhöht
Weser, Hessisch Oldendorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Westaue, Liethe	-	-	-	-	-	-	-	-
Westaue, Wunstorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Wietze, Meitze/Mohmühle	-	-	-	-	erhöht*	erhöht	-	erhöht
Wispe, Wispenstein	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-

Gentoxizität im Umu-Test

Die Extrakte wurden in den Umu-Tests bei 20-facher und 10-facher Anreicherung getestet und auf erbgutveränderndes Potential geprüft. Die Tests wurden sowohl unter Zugabe einer S9-Fraktion zur metabolischen Aktivierung von Gentoxinen als auch ohne durchgeführt. Als Positivkontrollen kamen Aminoanthracen (CAS: 613-13-8) und 4-Nitrochinolin-1-oxid (CAS: 56-57-5) zum Einsatz.

Es wurden ausschließlich die angereicherten Gewässerproben der Probenahme Sommer 2020 untersucht. Keine der untersuchten Proben erwies sich in der höchsten getesteten Anreicherungsstufe als potenziell erbgutverändernd.

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse des effektbasierten Monitorings für 2020 und 2021 für endokrines Potential (YES, YAES, YAS, YAAS, YDS; 20,8-fache Anreicherung), Mutagenität (TA98, TA100; 40-fache Anreicherung) und Gentoxizität (MN-Test; 10-fache, 5-fache und 2,5-fache Anreicherung); n.a. nicht auswertbar

Gewässer, Messstelle	Hefereportergergen-Tests					Ames-Tests			MK-Test	
	YES	YAES	YAS	YAAS	YDS	TA98	TA100	20	21	
Auter, Basse										
Brevörder Bach, unterhalb Glesse										
Bruchgraben, Borsumer Paß										
Bückeburger Aue, Evesen										
Burgdorfer Aue, Burgdorf										
Emmer, Emmern										
Exter, Rinteln										
Fluthamel, Afferde II										
Forstbach, Forst										
Fuhse, Wathlingen										
Haller, Hallerburg										
Hasselbach, Holzminden										
Hollenbach, unterhalb Zerse										
Hülse, Lauenhagen										
Ihme, Oberrickingen										
Innerste, Heinde										
Innerste, Sarstedt										
Kalte Beuster, Hammersteins Hütte										
Lamme, Wesseln										
Leine, Alfeld										
Leine, Herrenhausen										
Leine, Neustadt										
Leine, Poppenburg										
Leine, Schloss Ricklingen										
Lenne, Bodenwerder										
Mittellandkanal, Lohnde										
Nette, Dorneburg										
Neue Aue, Ehlershausen										
Rodenberger Aue, Rehren										
Saale, Elze										
Steinhuder Meer, Seemitte										
Südaue, Düendorf										
Waltershagener Bach, Klein Amerika										
Weser, Boffzen										
Weser, Hajen										
Weser, Hessisch Oldendorf										
Westaue, Liethe										
Westaue, Wunstorf										
Wietze, Meitze/Mohmühle										
Wispe, Wispenstein										

Zusammenfassung und Diskussion

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Gewässerproben der 40 Messstellen der Probenahmen Sommer 2020 und Frühjahr 2021 ist in Tabelle 5 dargestellt und kann als Unterstützung für ein weiteres fokussiertes (chemisches) Monitoring dienen. Die Untersuchungen verfolgten zwei übergeordnete Ziele. Zum einen sollten für die Ergebnisse aus den *in-vitro*-Tests Bewertungsmaßstäbe angewandt werden, die einen qualitativen Vergleich der Probenahmestellen sowie verschiedener Probenahmekampagnen ermöglichen. Darüber hinaus sollte die in vorangegangenen Monitoringkampagnen des NLWKN gesammelten Erfahrungen genutzt werden, um die erhaltenen Ergebnisse umfassender interpretieren zu können. Zunächst handelt es sich bei den Ergebnissen um effectbasierte Nachweise, das heißt beispielsweise, dass östrogene Substanzen in den Proben mit dem humanen Östrogenrezeptor in einem genetisch modifizierten Organismus interagieren und eine nachgeschaltete Reaktionskaskade auslösen. Die dadurch erhaltene Menge an Reaktionsprodukt,

in diesem Fall ein Farbstoff, ist direkt proportional zur Intensität der Rezeptoraktivität (Routledge und Sumpter, 1996). Es ist eine summarische Reaktion, ausgelöst durch alle in der Probe vorhandenen östrogen wirksamen Substanzen. Mit der Berechnung der Bio-Äquivalent-Konzentration (BEQ) ist ein Vergleich unterschiedlicher Wasserproben möglich. Dies ist detailliert im internationalen Standardverfahren ISO 23196 (2022) dargestellt.

Das effectbasierte Monitoring mit *in-vitro*-Test kann die Belastung von Probenahmestellen integral und semi-quantitativ erfassen und Substanzklassen eingrenzen. Es erlaubt jedoch keine Rückschlüsse auf die verursachenden Einzelsubstanzen. Dies muss durch ein chemisches Monitoring erfolgen. Der Vorteil des chemischen Monitorings ist die qualitative und quantitative Auswertung der Probe; ein Nachteil, dass man i. d. R. nur findet, was im Rahmen der analytischen Methode erfasst wird. Ein Effektmonitoring erfasst hingegen alle in einer Probe vorhandenen Schadstoffe mit Hilfe ihrer korrespondierenden Wirkung. Somit ist es generell sinnvoll, beide Methoden zu kombinieren und Hinweise aus dem Effektmonitoring in die Auswahl der zu untersuchenden Substanzen eines chemischen Monitorings zu integrieren.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass der Vergleich der Ergebnisse der Hefezell-basierten Tests in dieser Arbeit nur mit Auswertungen gleicher Verdünnungsstufe erfolgte. Die Berechnung des Limit of Quantification (LOQ) erfolgte aus der Negativkontrolle (NK) über die 3-fache Standardabweichung, wie es in vielen Analyseverfahren etabliert ist. Das LOQ wird für jeden Testansatz neu berechnet; es gilt also nicht für die Methode allgemein, sondern für alle innerhalb einer Probenahmekampagne durchgeführten Analysen. Wie bereits bei den Angaben zu den Validitätskriterien erwähnt, wird die dreifache Standardabweichung ermittelt und zum Mittelwert der Fluoreszenz der Negativkontrolle addiert.

Mit diesen etablierten Werkzeugen zur Analyse der Ergebnisse ist ein wichtiger Schritt für die Vergleichbarkeit verschiedener Probenahmestellen und verschiedener Probenahmekampagnen gegeben. Damit kann nachfolgend diskutiert werden, wie die Belastungssituation der unterschiedlichen Probenahmestellen ist und welche Handlungsanweisungen daraus abgeleitet werden können. Die Durchführung der Probenahmekampagne an 40 Gewässern und die anschließende Extraktion sowie Durchführung der Biotests mit den Gewässerproben war erfolgreich. Die Proben konnten im Hinblick auf endokrine, mutagene und größtenteils auch gentoxische Potentiale untersucht und eingeschätzt werden.

Einzig die Probenahmestelle Hasselbach Holzminden war in keinem der angewandten Biotests auffällig. Somit kann diese Probenahmestelle als unbelastet eingestuft werden. Dies ist auch plausibel, da das Bacheinzugsgebiet sich komplett im Naturpark Solling-Vogler (Weserbergland) befindet und fast ausschließlich (nachhaltig) forstlich genutzt wird. Dieser

Befund entspricht somit den Erwartungen (keine bekannten Abwassereinträge an dieser Probenahmestelle) und der bisherigen Befundlage aus anderen Monitoringprojekten. An allen anderen Probenahmestellen gab es bei mindestens einem Bio-test einen Nachweis einer entsprechenden Aktivität. Die Auswertung der Analyseergebnisse ergab, dass an insgesamt 5 Probenahmestellen eine hohe Belastung mit endokrin wirksamen Substanzen gefunden werden konnte. An 17 Probenahmestellen war ein Dioxin-ähnliches und an 2 Probenahmestellen waren genotoxische Potentiale nachweisbar. Dabei konzentrieren sich die endokrinen Potentiale hauptsächlich auf die östrogenen Potentiale. Die deutlichsten genotoxischen Potentiale zeigten sich dabei im Mikrokerntest. Es gab nur 4 Probenahmestellen, an denen keine östrogenen Potentiale nachgewiesen werden konnten. Für die östrogenen Potentiale ergaben sich beim Vergleich der Probenahmen 2020 und 2021 an 7 Probenahmestellen unterschiedliche Analyseergebnisse. Diese Unterschiede können mehrere Ursachen haben. Zum einen kann es sein, dass potentielle Einleitungen mit entsprechenden Stoffen, z.B. über das Abwasser, zu dem entsprechenden Probenahmezeitpunkt nicht stattgefunden haben. Zum anderen, dass Abbauprozesse saisonal unterschiedlich ablaufen und damit die Ergebnisse u.a. in Abhängigkeit zur Wassertemperatur stehen. Die Herkunft endokrin wirksamer, speziell östrogen wirkender Substanzen ist vielfältig. Einleitungen über Kläranlagen aus häuslichen Abwässern beispielsweise Ethinylestradiol als Kontrazeptiva der „Pille“ aber auch industrielle Einleitungen wie beispielsweise aus Kunststoffrecycling oder der Farbstoffindustrie können genauso wie diffuse Einträge aus der Landwirtschaft dafür verantwortlich sein. Mögliche Maßnahmen in Bezug auf die Reduzierung des Eintrags müssten über eine genaue Analyse des Einzugsgebietes, der Abwasseranteile im Gewässer und einem Abgleich mit der chemischen Analytik erfolgen.

Dioxinähnliche Potentiale konnten an fast allen Probenahmestellen nachgewiesen werden. Auch hier zeigen sich Unterschiede im Vergleich der Probenahmejahre 2020 und 2021, die in diesem Fall möglicherweise über die Eintragspfade besser zu erklären sind als über die Temperaturunterschiede. Substanzen mit dioxinähnlichem Potential, wie beispielsweise β -Naphthoflavon, B(a)P oder Hexachlorbenzol stammen häufig aus Einträgen aus dem Verkehr, wie beispielsweise Abrieb von Reifen oder von Abgasen. Bei Regenereignissen können diese Substanzen auch von Dächern und Straßen abgewaschen werden, auf denen sie sich im Laufe der vorangegangenen trockenen Zeiten akkumuliert haben. In Untersuchungen sächsischer Gewässer mit Kläranlageneinfluss zeigte sich, dass dioxinähnliche Effekte teilweise bereits vor Kläranlagenabläufen in Gewässern nachgewiesen werden konnten (Schubert et al. 2020). Weitere Quellen von Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen sind Industriezweige wie papier- und metallverarbeitende Industrie, Betriebe für Abfallentsorgung und Abwasserbehandlung sowie diesel-, kohle- und holzverbrennende Betriebe (Kurwadkar et al. 2020). Auch Waldbrände oder natürliche photolytische Prozesse

können Quellen für den Eintrag an dioxinähnlichen Substanzen in Gewässer sein (Kurwadkar et al. 2020). Mit dem Umu-Test sowie dem AMES-Test können Mutationen an der DNA festgestellt werden. Weder im Umu-Test noch im AMES-Test mit dem Stamm TA 98 konnten Mutationen festgestellt werden; lediglich mit dem AMES-Test und dem Stamm TA 100 wurden an 5 Probenahmestellen Mutationen erfasst. Dabei gab es auch Unterschiede zwischen den Probenahmejahren 2020 und 2021. Neben PAKs und Phenolen gibt es zahlreiche andere Substanzen, die für Mutationen verantwortlich sein können wie beispielsweise Schwermetalle, aber auch Azide und Anthracene.

Die Proben konnten in Hinblick auf endokrine Potentiale, mutagene Potentiale und genotoxisches Potential untersucht und eingeschätzt werden. Hierbei wurden insgesamt 12 Proben bzw. Gewässer identifiziert, auf welche sich weitere Effektbasierte Untersuchungen fokussieren sollten. Die Proben 1 (Poppenburg) und 13 (Rinteln) wurden ausgewählt, da hier Hinweise auf mutagenes Potential festgestellt wurden. Probe 16 (Rehren) wurde aufgrund von anti-östrogenem Potential, Proben 19 (Hammersteins Hütte) und 30 (Wathlingen) aufgrund von androgenem Potential und Probe 31 (Borsumer Paß) aufgrund von dioxinähnlichem Potential ausgewählt. Die Proben 2 (Oberricklingen), 7 (Düendorf), 10 (Steinhuder Meer, Seemitte), 15 (Lauenhagen), 17 (Wunstorf) und 18 (Basse) wurden schließlich ausgewählt, da hier mindestens jeweils 3 Nachweise erfolgten.

Danksagung

Die Autoren möchten Lea Hilbert und Shari Reckmann für die Unterstützung der mikroskopischen Auswertung der Mikrokerntests und Juliane Isler für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken. Zudem danken wir Nicolino Anthony und Carina Landauer für die Mitwirkung bei der Anreicherung der Wasserproben und Fabian Palis für die Unterstützung bei der Durchführung der Umu-Tests. Ein großer Dank gilt außerdem dem Probenahme-Team des NLWKN.

Literaturverzeichnis

- Brack, W., Aissa, S.A., Backhaus, T. et al. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Science Europe* 31, 10
- ISO 11350:2012 Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water -Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). <https://iso.org/standard/50393.html>
- ISO 19040-1:2018 Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*). <https://iso.org/standard/64450.html>
- ISO 21427-2:2006 Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei (Micronucleus test). <https://iso.org/standard/39681.html>

- Könemann, S. et al. (2018). Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 102: 225-235.
- Kunz, P.Y. et al. (2017). Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Research* 110: 378-388.
- Kurwadkar, S., Mandal, P.K., Soni, S. (Eds.). (2020). *Dioxin: Environmental Fate and Health/Ecological Consequences* (1st ed.). CRC Press London.
<https://doi.org/10.1201/9781315170961>
- OECD Test No. 471 (2020). Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
<https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>
- OECD Test No. 487 (2016). In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
<https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.
- Proposal for effect-based monitoring and assessment in the Water Framework Directive. Report to the WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018. Draft December 2018.
- Schubert, S., Rosolowski, J.M., Jungmann, D. (2019). *Schadstoffe - Ermittlung von Belastungspfaden Teil: Biotests für ein effektbasiertes Monitoring. Abschlussbericht. Auftraggeber: Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie LfULG, über GWT TUD GmbH*
- Schubert, S., Rosolowski, J.M., Isler, J., Jungmann, D. (2020). *Biotests für ein effektbasiertes Monitoring von kommunalen Abwasseranlagen an kleinen Gewässern Monitoring 2019/2020 (Abschlussbericht). Auftraggeber: Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie LfULG, über GWT TUD GmbH*
- Vermeirssen, E.L.M. (2018). Vortrag "Standardisierung der Datenanalyse von in vitro Biotests - Beispiel Östrogene Wirkung YES", Ökotoxzentrum, Dübendorf.
- Völker, J. et al. (2016). Advancing biological wastewater treatment: extended anaerobic conditions enhance the removal of endocrine and dioxin-like activities. *Environmental Science & Technology* 50: 10606-10615.

Korrespondenzadresse:

Dr. Dirk Jungmann
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Umweltwissenschaften
Technische Universität Dresden
01062 Dresden
E-Mail: Dirk.Jungmann@tu-dresden.de